

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

**Ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί
με φαινότυπο νυκτερινής παροξυντικής
αιμοσφαιρινουρίας σε ασθενείς με
αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού**

ΣΚΟΠΟΣ Η εκτίμηση της παρουσίας CD55 ή και CD59 αρνητικών πληθυσμών ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού και η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, τις κλινικές ή τις εργαστηριακές παραμέτρους, καθώς και τη θεραπευτική προσέγγιση. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Η έλλειψη των CD55 και CD59 εκτιμήθηκε στα ερυθροκύτταρα 113 ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού, 121 φυσιολογικούς αιμοδότες και 10 ασθενείς με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) με τη μέθοδο μικροτυποποίησης με γέλη serhasryl. Επίσης, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Ham και σουκρόζης. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Από τους 113 ασθενείς, οι 104 (92%) παρουσίασαν «τύπου ΝΠΑ» ερυθροκυτταρικούς κλώνους: 47 (41,6%) με σύγχρονη ανεπάρκεια του CD55 και του CD59, 50 (44,2%) με μεμονωμένη έλλειψη του CD55 και 6 (6,2%) με έλλειψη του CD59. Στους φυσιολογικούς αιμοδότες, μόνο οι 2 (1,6%) παρουσίασαν σύγχρονη έλλειψη των δύο μορίων CD55/CD59 και 3 (2,4%) είχαν μεμονωμένη έλλειψη είτε του CD55 είτε του CD59. Όλοι οι ΝΠΑ ασθενείς είχαν ταυτόχρονη CD55/CD59 έλλειψη. Θετικές δοκιμασίες Ham και σουκρόζης εμφάνισαν μόνο οι ασθενείς με ΝΠΑ. Δεν σημειώθηκε συσχέτιση με την εμφάνιση κυτταροπενιών ή το είδος της χορηγηθείσας θεραπείας. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την παρουσία ερυθροκυτταρικών πληθυσμών «τύπου ΝΠΑ» σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Μάλιστα, η αιμοσφαιρίνη των ασθενών αυτών συσχετίστηκε αντιστρόφως με την έλλειψη του CD55 από τα ερυθρά τους. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για διευκρίνιση των υποκείμενων μηχανισμών.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(6):714–729
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(6):714–729

**Ι.Β. Ασημακόπουλος,¹
Ε. Τέρπος,²
Λ. Παπαγεωργίου,¹
Ο. Καμπουροπούλου,³
Δ. Χριστούλας,²
Α. Γιακουμής,³
Μ. Σαμάρκος,³
Γ. Βαϊόπουλος,³
Κ. Κωνσταντόπουλος,³
Μ.Κ. Αγγελοπούλου,¹
Θ.Π. Βασιλακόπουλος,¹
Γ.Χ. Μελέτης¹**

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

“PNH-like” erythrocyte populations in patients with autoimmune connective tissue disorders

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

DAF
MIRL
Αυτοάνοσα νοσήματα
Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία
Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
CD55
CD59

Υποβλήθηκε 7.5.2013
Εγκρίθηκε 3.6.2013

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττά-

ρου, η οποία εκδηλώνεται με τη χαρακτηριστική κλινική τριάδα της χρόνιας ενδαγγειακής αιμόλυσης με παροξυσμούς αιμοσφαιρινουρίας και αιμοσιδηρινουρίας, των

διαλειπόντων θρομβωτικών επεισοδίων σε ασυνήθεις θέσεις, καθώς και μυελικής ανεπάρκειας ποικίλου βαθμού. Η αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων και σπανιότερα η εκτροπή σε οξεία λευχαιμία σχεδόν συμπληρώνουν το κλινικό πλαίσιο της νόσου.¹⁻⁴ Μια σωματική μετάλλαξη στο φυλοσύνδετο γονίδιο *PIG-A* (phosphatidyl inositol glycan group A), που είναι απαραίτητο στη βιοσυνθετική οδό της γλυκοσυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI), αποτελεί το μοριακό υπόβαθρο της νόσου, οδηγώντας στην πλήρη απουσία ή ανεπαρκή έκφραση από την κυτταρική μεμβράνη όλων των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτή μέσω της GPI σε όλες τις αιμοποιητικές σειρές, καθώς οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε κλώνους αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.⁴⁻⁶ Σύμφωνα με τη «διπλή θεωρία» (dual theory) των Rotoli και Luzzatto, εκτός από τη σωματική μετάλλαξη του *PIG-A* γονιδίου, για την ανάπτυξη της ΝΠΑ απαιτείται ένα μικροπεριβάλλον μυελικής ανεπάρκειας στο οποίο ο *PIG-A(-)* κλώνος πιθανόν να κατέχει πλεονέκτημα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού σε σχέση με το φυσιολογικό αιμοποιητικό ιστό.^{3,4,7} Η εμφάνιση πληθυσμών ΝΠΑ έχει αναφερθεί σε πολλές αιματολογικές διαταραχές,^{4,8-14} καθώς και σε φυσιολογικά άτομα.¹⁵

Παρά το γεγονός ότι το συμπλήρωμα αποτελεί ένα θεμελιώδες συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος, η διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την ενεργοποίησή του μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική ιστική καταστροφή, όπως συμβαίνει στο πλαίσιο των αυτοάνοσων διαταραχών.¹⁶⁻¹⁸ Ρυθμιστικά και ανασταλτικά ένζυμα, είτε συνδεδεμένα σε κυτταρικές μεμβράνες, είτε διαλυτά στο πλάσμα, προστατεύουν τους ομόλογους ιστούς από την ανεξέλεγκτη δράση του, σε όλα τα επίπεδα.^{19,20} Οι παράγοντες CD55 ή DAF ή HRF (decay-accelerating factor ή homologous restriction factor), CD59 ή MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis), CD46 ή MCP (membrane co-factor protein) και CD35 ή CR1 (complement receptor 1) είναι οι κύριες συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος (membrane complement regulatory proteins, mCRPs ή mCregs).²¹ Τόσο το CD55 όσο και το CD59 είναι GPI-συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνες,²² στα κυκλοφορούντα κύτταρα του αίματος και στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Ο DAF επιταχύνει την αποδόμηση των ενζυμικών συμπλεγμάτων της C3- και C4-κονβερτάσης, ενώ παράλληλα αποτρέπει το σχηματισμό νέων. Ο MIRL παρεμβαίνει στο σχηματισμό του MAC (membrane attack complex) κατά το στάδιο της ενσωμάτωσης των πολυμερών του C9 στο σύμπλεγμα C5b-C8, αναστέλλοντας έτσι την κυτταρική λύση.¹⁶

Πολλαπλές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων διαταραχών (όπως σπειραματονεφρίτιδα, αγγειίτιδα κ.ά.)

έχουν επικεντρωθεί στη συμμετοχή των CD55 και CD59 στην εξέλιξη των νοσημάτων αυτών.²³⁻³⁴ Όσον αφορά στο αιμοποιητικό σύστημα, καθώς η φλεγμονή στα αυτοάνοσα νοσήματα εκδηλώνεται σε «συστηματικό επίπεδο», οι αιματολογικές εκδηλώσεις –κυρίως κυτταροπενίες– που εμφανίζονται συχνά στις εν λόγω διαταραχές οφείλονται είτε στη μυελική ανεπάρκεια είτε στην εκτεταμένη περιφερική καταστροφή των κυττάρων του αίματος, καθμιά από τις οποίες μπορεί να είναι ανοσολογικής αρχής,³⁵⁻⁴² χωρίς να παραβλέπεται και η κυτταροτοξική δράση της θεραπείας.⁴³ Η αναιμία χρόνιας νόσου και η λεμφοπενία αποτελούν τις πλέον συνήθεις εκδηλώσεις, ενώ η τελευταία έχει συσχετιστεί με την κλινική επιδείνωση, όπως σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ).⁴²⁻⁴⁴ Αν και έχουν ήδη διεξαχθεί μελέτες για την έκφραση των CD55 και CD59 στην επιφάνεια των κυττάρων του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΣΕΛ⁴⁵⁻⁵² και ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ),⁵³⁻⁵⁵ δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί επαρκώς ο ρόλος των μορίων αυτών στην παθογένεια των αιματολογικών εκδηλώσεων και στη βαρύτητα της νόσου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της παρουσίας ερυθρών αιμοσφαιρίων «τύπου ΝΠΑ» στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού, εφαρμόζοντας τη μέθοδο μικροτυποποίησης με γέλη sephacryl (sephacryl gel test microtyping system, SGT), μια απλή, ημιποσοτική και ταχεία μέθοδο ανίχνευσης της έλλειψης «τύπου ΝΠΑ» στα ερυθρά,¹⁵ καθώς και η αξιολόγηση πιθανών συσχετίσεων με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, τις διάφορες παραμέτρους της γενικής αίματος και τη χορηγηθείσα θεραπεία.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ασθενείς

Σε αυτή τη μελέτη εκτιμήθηκαν 113 ασθενείς με αυτοάνοση νόσο του συνδετικού ιστού (connective tissue disorder, CTD) (94 γυναίκες, 19 άνδρες), προερχόμενοι από το Ρευματολογικό Ιατρείο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, το χρονικό διάστημα από το Φεβρουάριο του 2009 έως το Φεβρουάριο του 2013: 38 με ρευματοειδή αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA), 25 με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (systemic lupus erythematosus, SLE), 17 με σύνδρομο Sjögren (Sj), 7 ασθενείς με συστηματικό σκληρόδερμα (scleroderma, Sc), 12 ασθενείς με αγγειίτιδα (vasculitis, Vsc), 2 με δερματομυοσίτιδα (dermatomyositis, Dm), 1 με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ankylosing spondylitis, ASp) και 11 με μικτή νόσο του κολλαγόνου (mixed tissue disease, MCTD). Τη στιγμή της εκτίμησης, οι ασθενείς υποβάλλονταν σε ανοσοκατασταλτική (immunosuppressive, IS) ή σε ανοσοτροποποιητική (immunomodulatory, IM) θεραπεία, είτε σε συνδυασμό των δύο (combination, C). Είκοσι επτά από αυτούς δεν λάμβαναν κάποια θεραπεία (no treatment, N). Τα

βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, φύλο, νόσημα, θεραπεία) και οι παράμετροι της γενικής αίματος (αιμοσφαιρίνη: Hb, ουδετερόφιλα: Neu, λεμφοκύτταρα: Lym, αιμοπετάλια: PLT) απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Αναιμία (Hb <12 g/dL) εμφανίστηκε σε 43 (38,1%), ουδετεροπενία (ουδετερόφιλα <2,0×10⁹/L) σε 14 (12,7%), λεμφοπενία (λεμφοκύτταρα <1,0×10⁹/L) σε 21 (18,9%) και θρομβοπενία (αιμοπετάλια <150×10⁹/L) σε 13 (11,6%) από αυτούς τους ασθενείς, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Εκατόν είκοσι ένας φυσιολογικοί αιμοδοτές παρόμοιας ηλικίας και φύλου και 10 ασθενείς με ΝΠΑ μελετήθηκαν επίσης ως ομάδα ελέγχου.

Μέθοδος

Η ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη των CD55 και CD59 πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου του συστήματος μικροτυποποίησης με γέλη serhacryl (DiaMed-ID Micro Typing System-PNH test, DiaMed AG, Switzerland). Χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα σε EDTA-K3 και η δοκιμασία διενεργήθηκε μέσα στις πρώτες 2 ώρες από τη λήψη του δείγματος. Αρχικά, παρασκευαζόταν εναιώρημα ερυθροκυττάρων 0,8% (v/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος 0,8% (ID-diluent 2, modified LISS) σε θερμοκρασία δωματίου. Πενήντα μL του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων τοποθετούνταν στην άνω επιφάνεια τριών μικροσωληναρίων, που περιείχαν γέλη ser-

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού.

Χαρακτηριστικό/ CTD (n)	Φύλο (Α/Γ)	Ηλικία (έτη) (διάμεσος/εύρος)	Hb (g/dL) (μέση/εύρος)	Neu (×10 ⁹ /L)* (διάμεσος/εύρος)	Lym (×10 ⁹ /L) (μέση/εύρος)	PLT (×10 ⁹ /L) (μέση/εύρος)	Θεραπεία
RA (38)	7/31	70 (41–88)	12,1 (8–20)	4,8 (1,4–20,5)	2,0 (0,57–4,9)	259 (26–471)	N (3), IM (7) IS (6), C (22)
SLE (25)	7/18	45 (18–71)	11,7 (5,7–16,3)	3,3 (1,2–7,4)	1,67 (0,37–3,5)	231 (114–532)	N (8), IM (4) IS (5), C (8)
Sj (17)	1/16	69 (43–79)	12,7 (9,2–14,5)	3,6 (1,6–17,5)	1,69 (1,2–2,2)	199 (74–347)	N (10), IM (4) IS (3)
Sc (7)	0/7	59 (43–87)	10,7 (7,2–13)	4,75 (3,1–8,5)	1,7 (0,96–3,1)	250 (160–518)	N (2), IS (5)
Vsc (12)	4/8	66,5 (48–80)	12,9 (10,6–15,7)	6,8 (3,7–10,9)	0,8 (0,26–1,7)	274 (155–393)	N (1), IS (11)
Drm (2)	2/2	65 (54–76)	11,1 (8,1–14)	4,45 (4,3–4,6)	1,89 (0,9–2,8)	288 (247–328)	IM (1), IS (1)
ASp (1)	0/1	50	13,9	5,6	2,78	222	IM (1)
MCTD (11)	0/11	59 (47–73)	11,7 (8,8–13)	2,0 (0,3–5,2)	1,35 (0,46–2,5)	207 (9–330)	N (3), IM (4) IS (1), C (3)
Σύνολο (113)	19/94	64 (18–88)	12,03 (5,7–20)	4,3 (0,3–20,5)	1,68 (0,26–4,9)	222 (9–532)	N (27), IM (21) IS (32), C (33)

* Η κατανομή των ουδετεροφίλων δεν προσέγγιζε την κανονική. Έτσι, για τις παραμετρικές δοκιμασίες εφαρμόστηκε ο λογαριθμικός μετασχηματισμός CTD: Αυτοάνοση νόσος του συνδετικού ιστού, Hb: Αιμοσφαιρίνη, Neu: Ουδετερόφιλα, Lym: Λεμφοκύτταρα, PLT: Αιμοπετάλια, RA: Ρευματοειδής αρθρίτιδα, SLE: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, Sj: Σύνδρομο Sjögren, Sc: Σκληρόδερμα, Vsc: Αγγειίτιδα, Drm: Δερματομυοσίτιδα, ASp: Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, MCTD: Μικτή νόσος του κολλαγόνου, N: Χωρίς θεραπεία, IM: Ανοσοτροποποιητική, IS: Ανοσοκατασταλτική, C: Συνδυασμός

Πίνακας 2. Κυτταροπενίες σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού.

CTD/Κυτταροπενία (n)	Αναιμία -/+ (n), [%]	Ουδετεροπενία -/(n), [%]	Λεμφοπενία -/(n), [%]	Θρομβοπενία -/(n), [%]
RA (38)	(21/17) [55,3/44,7]	(34/4) [89,5/10,5]	(35/3) [92,1/7,9]	(31/6) [83,8/16,2]
SLE (25)	(13/12) [52/48]	(19/4) [82,6/17,4]	(19/5) [79,2/20,8]	(21/4) [84/16]
Sj (17)	(14/3) [82,4/17,6]	(15/2) [88,2/11,8]	(17/0) [100/0]	(16/1) [94,1/5,9]
Sc (7)	(4/3) [57,1/42,9]	(6/0) [100/0]	(5/1) [83,3/16,7]	(7/0) [100/0]
Vsc (12)	(9/3) [75/25]	(12/0) [100/0]	(4/8) [33,3/66,7]	(12/0) [100/0]
Drm (2)	(1/1) [50/50]	(2/0) [100/0]	(1/1) [50/50]	(2/0) [100/0]
ASp (1)	(1/0) [100/0]	(1/0) [100/0]	(1/0) [100/0]	(1/0) [100/0]
MCTD (11)	(7/4) [63,6/36,4]	(7/4) [63,6/36,4]	(8/3) [72,7/27,3]	(9/2) [81,8/18,2]
Σύνολο (113)	(70/43) [62/38]	(96/14) [87,3/12,7]	90/21 [81,1/18,9]	99/13 [88,4/11,6]

CTD: Αυτοάνοση νόσος του συνδετικού ιστού, RA: Ρευματοειδής αρθρίτιδα, SLE: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, Sj: Σύνδρομο Sjögren, Sc: Σκληρόδερμα, Vsc: Αγγειίτιδα, Drm: Δερματομυοσίτιδα, ASp: Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, MCTD: Μικτή νόσος του κολλαγόνου

hacryl με κονίκλειο ανοσοσφαιρίνη κατά ποντικού. Στη συνέχεια, 50 μL μονοκλωνικού αντι-ανθρώπινου CD55 (clone BRIC 216), CD59 (clone MEM 43) και ID-ΝΠΑ αρνητικού μάρτυρα (dilution buffer for anti-CD55 and anti-CD59) τοποθετούνταν στα προαναφερθέντα μικροσωληνάρια, αντίστοιχα. Ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 15 min, φυγοκέντρηση στα 126 g για 10 min σε μια ID-φυγόκεντρο 245 (CE conform, DiaMed-Hellas Ltd), ενώ τα αποτελέσματα αξιολογούνταν μετά τη φυγοκέντρηση.

Οι φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί, που έφεραν στην επιφάνειά τους τα CD55 και CD59, συνδέονταν με τα σωματίδια της γέλης, μέσω της σύνδεσης CD55/αντι-CD55/κονίκλειος ανοσοσφαιρίνη ή CD59/αντι-CD59/κονίκλειος ανοσοσφαιρίνη και παρέμεναν στην κορυφή των μικροσωληναρίων («θετικοί πληθυσμοί»). Σε αντίθεση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια που εμφάνιζαν απουσία των αντιγόνων DAF ή MIRL δεν παρουσίαζαν συγκόλληση με τα σωματίδια της γέλης και καθίζαναν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων («αρνητικοί πληθυσμοί»). Όταν ανιχνεύονταν θετικοί και αρνητικοί πληθυσμοί, ένα μόνο τμήμα του αριθμού των ερυθροκυττάρων εμφάνιζε την έλλειψη του μελετώμενου αντιγόνου. Επίσης, παρατηρούνταν και πληθυσμοί με μερική απουσία του υπό μελέτη αντιγόνου, με αποτέλεσμα τα ερυθροκύτταρα να σχηματίζουν στοιβάδα στο σημείο μεταξύ της επιφάνειας και του πυθμένα του μικροσωληναρίου.

Σε αρχικά πειράματα, χρησιμοποιώντας διάφορα μείγματα (75%, 50%, 25% και 10%) ερυθρών αιμοσφαιρίων ασθενών με ΝΠΑ με πλήρη απουσία των CD55 και CD59 και συμβατών ερυθροκυττάρων φυσιολογικών ατόμων, βρέθηκε ότι μπορούσαν να ανιχνευτούν πληθυσμοί ερυθρών με έλλειψη των CD55 ή και CD59 σε ποσοστό 10% και άνω του συνολικού αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων.¹⁵ Η παρουσία των επί μέρους υποπληθυσμών των ερυθροκυττάρων αξιολογούνταν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και εκφράζονταν ημιποσοτικά ως 100%, 75%, 50%, 25% και 10% του συνόλου των ερυθρών. Σε όλα τα δείγματα με CD55 ή CD59 αρνητικούς πληθυσμούς εκτελέστηκαν οι δοκιμασίες οξυνοισθέντος ορού και σουκρόζης.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η κυτταρομετρία ροής θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς (gold standard) για την ανίχνευση πληθυσμών ΝΠΑ, ειδικά των μικρών κλώνων, το SGT είναι αρκετά ευαίσθητη μέθοδος, εύκολα εφαρμόσιμη, έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία διαλογής (screening test), για τον εντοπισμό ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη του CD55 ή και του CD59.^{56,57}

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό του ηλεκτρονικού προγράμματος MedCalc. Η παρουσία συσχέτισης ανάμεσα στην ηλικία και την παρουσία CD55 και CD59 αρνητικών πληθυσμών διερευνήθηκε με το μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Spearman (r_s). Η επίδραση του φύλου στην παρουσία ερυθροκυττάρων με έλλειψη του CD55 ή και του CD59 μελετήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 (χ^2 -test). Η σχέση μεταξύ της παρουσίας ή του ποσοστού έλλειψης του DAF ή/και του MIRL από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων

και την παρουσία κυτταροπενιών εξετάστηκε με το χ^2 -test ή με τη δοκιμασία Fisher. Η διακύμανση των διαφόρων αιματολογικών παραμέτρων (αιμοσφαιρίνη, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια) ανάλογα με την έλλειψη ή όχι του CD55 ή/και του CD59, καθώς και το CD55/CD59 φαινότυπο, μελετήθηκε με τις εξής δοκιμασίες: Την ανάλυση της μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way analysis of variance ή one-way ANOVA), την ανάλυση της μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way analysis of variance, two-way ANOVA), τη δοκιμασία του Student ή t-test για παρατηρήσεις χωρίς αντιστοιχία (t-test for unpaired measurements) και Mann-Whitney U test για παρατηρήσεις χωρίς αντιστοιχία (Mann-Whitney test for unpaired measurements). Η συσχέτιση μεταξύ των αιματολογικών παραμέτρων στις διάφορες κατηγορίες έλλειψης CD55 ή/και CD59 εκτιμήθηκε με τον παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Pearson (r_p), ενώ η ύπαρξη εξάρτησης των παραμέτρων της γενικής αίματος από το ποσοστό έλλειψης του CD55 ή και του CD59 μελετήθηκε με το μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Spearman (r_s) και την πολλαπλή γραμμική εξάρτηση (multiple linear regression). Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι, ενώ οι κατανομές της αιμοσφαιρίνης, των λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων δεν διέφεραν από την κανονική κατανομή, αυτή των ουδετεροφίλων δεν ήταν κανονική. Έτσι, ο λογαριθμικός μετασχηματισμός χρησιμοποιήθηκε στις παραμετρικές δοκιμασίες.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p ήταν διπλής κατεύθυνσης και ορίστηκε το επίπεδο $<0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις. Επίσης, το διάστημα εμπιστοσύνης αναφέρεται στα 95% όρια αξιοπιστίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι μόνο 9 από τους 113 (8,0%) ασθενείς με ρευματολογικά νοσήματα δεν εμφάνισαν πληθυσμούς ερυθρών αιμοσφαιρίων «τύπου ΝΠΑ», CD55(+)/CD59(+). Συνεπώς, ερυθρά αιμοσφαίρια με έλλειψη του CD55 ή/και του CD59 ανευρέθηκαν στους 104 ασθενείς (92%) (92,0% έναντι 8,0%, $p<0,0001$). Έλλειψη του CD55 παρατηρήθηκε σε 97 εκ του συνόλου των ασθενών (85,8% έναντι 14,2%, $p<0,0001$), όταν, αντίστοιχα, έλλειψη του CD59 παρουσιάστηκε στους 54 (47,8%) από τους 113 ασθενείς (47,8% έναντι 52,2%, $p=0,707$). Μάλιστα, η διαφορά της συχνότητας μεταξύ των CD55- και CD59-αρνητικών πληθυσμών ήταν στατιστικά σημαντική (38,0%, McNemar test, $p<0,0001$). Το ποσοστό των ερυθροκυτταρικών κλώνων «τύπου ΝΠΑ» δεν υπερέβη ποτέ το 25% του συνόλου του πληθυσμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ το πλέον συχνό ποσοστό έλλειψης και για τα δύο μόρια ήταν 10% (CD55: 88/113, 77,9%, CD59: 48/113, 42,5%). Επί πλέον, σε κανέναν ασθενή με μεμονωμένη έλλειψη του CD59 στα ερυθροκύτταρα, αυτή δεν υπερέβη το 10% του συνολικού πληθυσμού των ερυθρών. Ομοίως, δεν εντοπίστηκε ταυτόχρονη ερυθροκυτταρική έλλειψη των μορίων CD55 και CD59 της τάξης του 25% του ολικού αριθμού των ερυθρών. Έτσι

λοιπόν, τρεις διαφορετικοί φαινότυποι ερυθροκυτταρικών πληθυσμών «τύπου ΝΠΑ» (“PNH-like” red-cell populations) ανιχνεύτηκαν σε αυτή τη μελέτη: (α) Ένας με μεμονωμένη έλλειψη του CD55 (50/113, 44,2%) ή CD55(-)/CD59(+), (β) ένας με μεμονωμένη έλλειψη του CD59 (7/113, 6,2%) ή CD55(+)/CD59(-), (γ) ένας με ταυτόχρονη έλλειψη των CD55 και CD59 αντιγόνων (47/113, 41,6%) ή CD55(-)/CD59(-) (εικ. 1). Αυτή η ετερογένεια στην εμφάνιση των τριών φαινοτύπων ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001$).

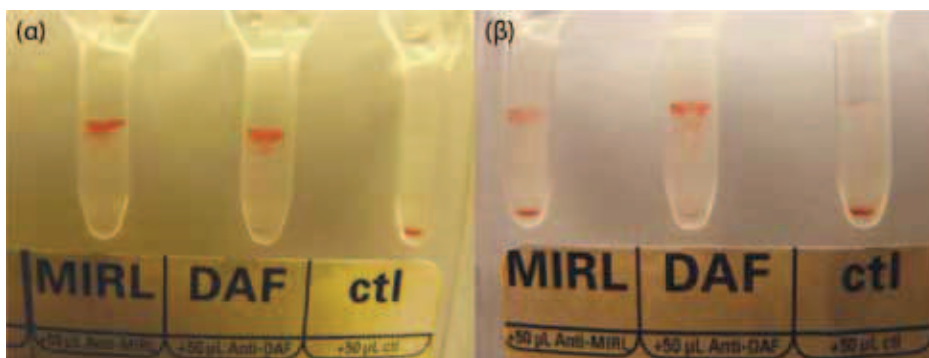
Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις έξι κύριες –σε αυτή τη μελέτη– κατηγορίες νοσημάτων του συνδετικού ιστού (RA, SLE, Sj, Scl, Vsc και MCTD), όσον αφορά στην παρουσία και στο ποσοστό έλλειψης του CD55 ή και του CD59 από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Με βάση το ποσοστό έλλειψης του κάθε αντιγόνου από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, οι πιο συχνοί CD55/CD59 φαινότυποι ήταν οι εξής: (α) 10%/0% (44/113, 42,5%) και 10%/10% (34/114, 30,1%). Λεπτομερής περιγραφή των ευρημάτων όσον αφορά στην έλλειψη του CD55 και του CD59 αντιγόνου από τα ερυθροκύτταρα, του ποσοστού αυτής της έλλειψης στο σύνολο των ερυθροκυττάρων, καθώς και της παρουσίας ή όχι των διαφόρων ερυθροκυτταρικών πληθυσμών «τύπου ΝΠΑ» παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 4 παρατίθενται οι συχνότητες εμφάνισης των διαφόρων ερυθροκυτταρικών φαινοτύπων «τύπου ΝΠΑ» στους ασθενείς με ρευματολογικά νοσήματα.

Όσον αφορά στις αιματολογικές παραμέτρους, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η στατιστική ανάλυση δεν συσχέτισε την παρουσία ερυθρών «τύπου ΝΠΑ» με την εμφάνιση οποιασδήποτε μορφής κυτταροπενίας. Ωστόσο, αν και δεν υπήρξε σημαντική επίδραση της παρουσίας φαινοτύπου «τύπου ΝΠΑ» των ερυθροκυττάρων στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ρευματολογικά νοσήματα ($F=2,874$, $p=0,093$), η απουσία ή όχι του CD55 αντιγόνου στα ερυθρά αποδείχθηκε ως ένας σημαντικός παράγοντας καθορισμού της διακύμανσης της Hb, στους ασθενείς αυτούς ($F=6,092$, $p=0,015$), ενώ

το ποσοστό της έλλειψής του στα ερυθρά αιμοσφαίρια είχε «οριακή» επίδραση, αντίστοιχα ($F=3,040$, $p=0,052$). Πράγματι λοιπόν, η διαφορά της μέσης τιμής της Hb των ασθενών με CD55 «αρνητικούς» πληθυσμούς έναντι εκείνων με φυσιολογική έκφραση του CD55 ήταν στατιστικά σημαντική ($\delta=-1,4534$ g/dL, 95% όρια αξιοπιστίας: -0,2866 έως -2,6202 g/dL, $p=0,0151$). Έτσι, αναδείχθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό της έλλειψης του CD55 από τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και στη συγκέντρωση της Hb ($r_s=-0,205$, $p=0,0296$). Όταν εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής εξάρτησης, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της ποσοστιαίας έλλειψης του CD55 και του CD59 από τα ερυθροκύτταρα στη διακύμανση της Hb (*multiple correlation coefficient, πολλαπλός συντελεστής συσχέτισης*=0,2192, $F=2,7766$, $p=0,067$), μόνο το CD55 αποδείχθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της Hb (*μερικός συντελεστής συσχέτισης, $r_{\text{partial}}=-0,1887$, $p=0,0463$*). Στις εικόνες 2 και 3 παρουσιάζονται τα διαγράμματα συσχέτισης (στικτόγραμμα, scatter diagram) σε συνδυασμό με τη γραμμή συνάρτησης (regression line) μεταξύ της ποσοστιαίας έλλειψης είτε του CD55 (CD55%) (εικ. 2), είτε του CD59 (CD59%) (εικ. 3), στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στην Hb.

Όταν υπολογίστηκε ο παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης του Pearson (r_p) μεταξύ των διαφόρων αιματολογικών παραμέτρων προκειμένου να ανευρεθούν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάλογα με την παρουσία ή όχι «τύπου ΝΠΑ» ερυθρών αιμοσφαιρίων, την έλλειψη του DAF ή του MIRL από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, καθώς και το CD55/CD59 φαινότυπο των ερυθρών, ήταν αξιοσημείωτο ότι μόνο οι ασθενείς με CD55(-)/CD59(-) πληθυσμούς ερυθρών στο περιφερικό τους αίμα παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της Hb και του αριθμού των λεμφοκυττάρων ($r_p=+0,315$, $p=0,032$) (εικ. 4).

Όσον αφορά στην ομάδα ελέγχου (control groups) (πίν. 5), ανάμεσα στους 121 φυσιολογικούς αιμοδότες, δύο (1,6%) είχαν ερυθροκυτταρικούς κλώνους με ταυτόχρονη



Εικόνα 1. (α) Ασθενής με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και μεμονωμένη έλλειψη του CD55 (DAF) (10%) στα ερυθρά του αιμοσφαίρια, φαινότυπος πληθυσμού ερυθρών «τύπου ΝΠΑ»: CD55(-)/CD59(+). (β) Ασθενής με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (SLE) και συσπάρχουσα έλλειψη CD55 (DAF) και CD59 (MIRL) στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (10–25%, αντίστοιχα), φαινότυπος πληθυσμού ερυθρών «τύπου ΝΠΑ»: CD55(-)/CD59(-). Κανένας από τους ασθενείς δεν εμφάνισε θετική δοκιμασία οξεισθέντος ορού ή σουκρόζης.

Πίνακας 3. Η έκφραση των CD55 και CD59 στα ερυθρά, το ποσοστό έλλειψης του κάθε αντιγόνου στο σύνολο των ερυθροκυττάρων, καθώς και η παρουσία ή όχι πληθυσμών «τύπου ΝΠΑ», σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα.

Κλώνιο ΝΠΑ/ CTD (n)	CD55(+/-)* (n), [%]	CD55%* (n), [%]	CD59(+/-)* (n), [%]	CD59%* (n), [%]	Ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί «τύπου ΝΠΑ»** (-/+ (n), [%]
RA (38)	(5/33) [13,2/86,8]	0: (5) [13,2] 10: (30) [79] 25: (3) [7,8]	(22/16) [57,9/42,1]	0: (22) [57,9] 10: (15) [39,5] 25: (1) [2,6]	(3/35) [7,9/92,1]
SLE (25)	(1/24) [4/96]	0: (1) [4] 10: (21) [84] 25: (3) [12]	(12/13) [48,0/52]	0: (12) [48] 10: (11) [44] 25: (2) [8]	(0/25) [0/100]
Sj (17)	(3/14) [17,6/82,4]	0: (3) [17,6] 10: (13) [76,5] 25: (1) [5,9]	(11/6) [64,7/35,3]	0: (11) [64,7] 10: (4) [23,5] 25: (2) [11,8]	(2/15) [11,8/88,2]
Sc (7)	(1/6) [14,3/85,7]	0: (1) [14,3] 10: (6) [85,7] 25: (0) [0]	(1/6) [14,3/85,7]	0: (1) [14,3] 10: (6) [85,7] 25: (0) [0]	(0/7) [0/100]
Vsc (12)	(2/10) [16,7/83,3]	0: (2) [16,7] 10: (8) [66,6] 25: (2) [16,7]	(5/7) [41,7/58,3]	0: (5) [41,7] 10: (7) [58,3] 25: (0) [0]	(0/12) [0/100]
Drm (2)	(1/1) [50/50]	0: (1) [50] 10: (1) [50] 25: (0) [0]	(1/1) [50/50]	0: (1) [50] 10: (1) [50] 25: (0) [0]	(1/1) [50/50]
ASp (1)	(0/1) [0/100]	0: (0) [0] 10: (1) [100] 25: (0) [0]	(0/1) [0/100]	0: (0) [0] 10: (1) [100] 25: (0) [0]	(0/1) [0/100]
MCTD (11)	(3/8) [27,3/72,7]	0: (3) [27,3] 10: (8) [72,7] 25: (0) [0]	(7/4) [63,6/36,4]	0: (7) [63,6] 10: (3) [27,3] 25: (1) [9,1]	(3/8) [27,3/72,7]
Σύνολο (113)	(16/97) [14,2/85,8]	0: 15 [13,6] 10: 86 [78,2] 25: 9 [8,2]	(59/54) [52,2/47,8]	0: 59 [52,2] 10: 48 [42,5] 25: 6 [5,3]	(9/104) [8/92]

* (+): Φυσιολογική έκφραση του CD55 ή του CD59 στα ερυθροκύτταρα του ασθενούς, (-): Παρουσία CD55- ή CD59-«αρνητικών» ερυθροκυτταρικών πληθυσμών στους ασθενείς

♦ CD55% ή CD59%: Ποσοστό των CD55- ή CD59-«αρνητικών» ερυθρών στο σύνολο του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού του κάθε ασθενούς, στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα

** Φαινότυπος «τύπου ΝΠΑ»(+): Η παρουσία ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη του CD55 ή και του CD59 αντιγόνου
 ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία, CTD: Αυτοάνοση νόσος του συνδετικού ιστού, RA: Ρευματοειδής αρθρίτιδα, SLE: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, Sj: Σύνδρομο Sjögren, Sc: Σκληρόδερμα, Vsc: Αγγειίτιδα, Drm: Δερματομυοσίτιδα, ASp: Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, MCTD: Μικτή νόσος του κολλαγόνου

έλλειψη του CD55 και του CD59, CD55(-)/CD59(-), ενώ τρεις (2,4%) είχαν ερυθρά αιμοσφαίρια με μεμονωμένη έλλειψη είτε του CD55 είτε του CD59. Αυτά τα ερυθροκύτταρα δεν υπερέβησαν, ωστόσο, το 10% του συνολικού ερυθροκυτταρικού πληθυσμού στο περιφερικό αίμα. Όλοι οι ασθενείς με ΝΠΑ είχαν ταυτόχρονη έλλειψη του DAF και του MIRL στο περιφερικό αίμα (εικ. 5). Θετικές δοκιμασίες Ham και σουκρόζης βρέθηκαν μόνο σε ασθενείς με ΝΠΑ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

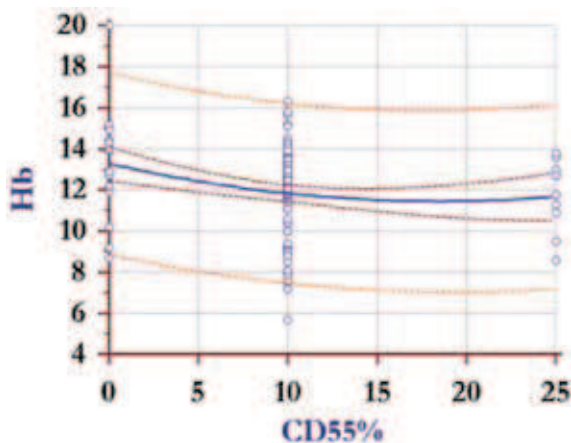
Ο ρόλος του συμπληρώματος και των ρυθμιστικών του πρωτεϊνών στις αυτοάνοσες διαταραχές

Ο θεμελιώδης ρόλος του συστήματος του συμπληρώματος στην παθοφυσιολογία των αυτοάνοσων διαταραχών αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι η γενετική έλλειψη του C1q ή του C4, καθώς και άλλων κλασμάτων του καταρράκτη, είναι σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την

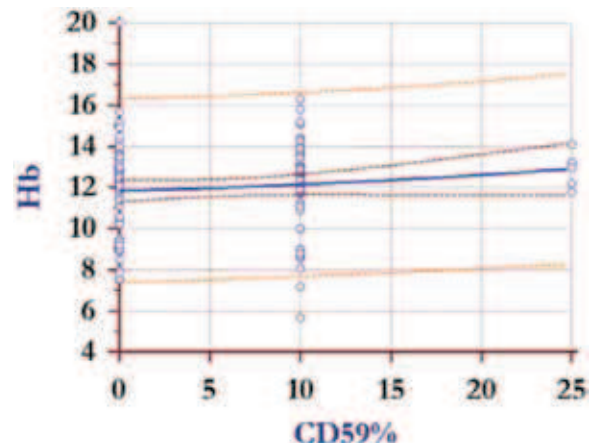
Πίνακας 4. Τύποι CD55/CD59 «αρνητικών» ερυθροκυτταρικών πληθυσμών (φαινότυποι «τύπου ΝΠΑ») και η συχνότητα της συνυπάρχουσας ποσοστιαίας CD55/CD59 έλλειψης στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού.

Φαινότυπος/ CTD (n)	CD55(-)/CD59(+) (n) [%]	CD55%/ CD59% (n) [%]	CD55(+)/CD59(-) (n) [%]	CD55%/ CD59% (n) [%]	CD55(-)/ CD59(-) (n) [%]	CD55%/ CD59% (n) [%]
RA (38)	(19) [50]	10%/0% (18) [47,4] 25%/0% (1) [2,6]	(2) [5,3]	0%/10% (2) [5,3]	(14) [36,8]	10%/10% (11) [28,9] 25%/10% (2) [5,3] 10%/25% (1) [2,6]
SLE (25)	(12) [48]	10%/0% (11) [44] 25%/0% (1) [4]	(1) [4]	0%/10% (1) [4]	(12) [48]	10%/10% (8) [32] 25%/10% (2) [8] 10%/25% (2) [8]
Sj (17)	(9) [52,9]	10%/0% (9) [52,9]	(1) [5,9]	0%/10% (1) [5,9]	(5) [29,4]	10%/10% (2) [11,8] 25%/10% (1) [5,9] 10%/25% (2) [11,8]
Sc (7)	(1) [14,3]	10%/0% (1) [14,3]	(1) [14,3]	0%/10% (1) [14,3]	(5) [71,4]	10%/10% (5) [71,4]
Vsc (12)	(5) [41,7]	10%/0% (5) [41,7]	(2) [16,6]	0%/10% (2) [16,7]	(5) [41,7]	10%/10% (3) [25] 25%/10% (2) [16,7]
Drm (2)	(0) [0]	10%/0% (0) [0]	(0) [0]	0%/10% (0) [0]	(1) [50]	10%/10% (1) [50]
ASp (1)	(0) [0]	10%/0% (0) [0]	(0) [0]	0%/10% (0) [0]	(1) [100]	10%/10% (1) [100]
MCTD (11)	(4) [36,4]	10%/0% (4) [36,4]	(0) [0]	0%/10% (0) [0]	(4) [36,4]	10%/10% (3) [27,3] 25%/10% (0) [5,3] 10%/25% (1) [9,1] 25%/25% (0) [0]
Σύνολο (113)	(50) [44,2]	10%/0% (48) [42,5] 25%/0% (2) [1,7]	(7) [6,2]	0%/10% (7) [6,2] 0%/25% (0) [0]	(47) [41,6]	10%/10% (34) [30,1] 25%/10% (7) [6,2] 10%/25% (6) [5,3] 25%/25% (0) [0]

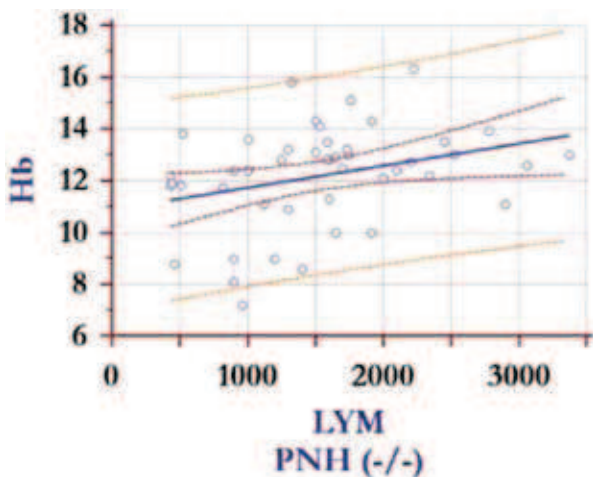
ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαινουρία, CTD: Αυτοάνοση νόσος του συνδετικού ιστού, RA: Ρευματοειδής αρθρίτιδα, SLE: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, Sj: Σύνδρομο Sjögren, Sc: Σκληρόδερμα, Vsc: Αγγειίτιδα, Drm: Δερματομυοσίτιδα, ASp: Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, MCTD: Μικτή νόσος του κολλαγόνου.



Εικόνα 2. Διάγραμμα συσχέτισης και γραμμή συνάρτησης ανάμεσα στο ποσοστό της ερυθροκυτταρικής έλλειψης του CD55 (CD55%) και την αιμοσφαιρίνη (Hb). Εξίσωση συνάρτησης: $y=13,2812 - 0,1974x + 0,005348x^2$, συντελεστής καθορισμού (coefficient of determination), $R^2=0,05237$, $F=3,0398$, $p=0,052$.



Εικόνα 3. Διάγραμμα συσχέτισης και γραμμή συνάρτησης ανάμεσα στο ποσοστό της ερυθροκυτταρικής έλλειψης του CD59 (CD59%) και την αιμοσφαιρίνη (Hb). Εξίσωση συνάρτησης: $y=11,8458 + 0,02284x + 0,0007997x^2$, συντελεστής καθορισμού (coefficient of determination) $R^2=0,01338$, $F=0,7456$, $p=0,477$.



Εικόνα 4. Διάγραμμα συσχέτισης και γραμμή συνάρτησης ανάμεσα στην αιμοσφαιρίνη (Hb) και στα λεμφοκύτταρα (Lym) στους ασθενείς με CD55(-)/CD59(-), PNH (-/-), φαινότυπο ερυθρών. Εξίσωση συνάρτησης: $y=10,9051+0,0008468 x$, συντελεστής καθορισμού (coefficient of determination) $R^2=0,09902$, $F=4,836$, $p=0,033$.



Εικόνα 5. Ασθενής με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ): 75% ταυτόχρονη έλλειψη τόσο του DAF όσο και του MIRL (75%/75%) από τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο περιφερικό του αίμα. Αυτός ο ασθενής είχε θετική δοκιμασία οξυθισθέντος ορού και σουκρόζης.

εμφάνιση στα άτομα αυτά βαρύτατης κλινικής εικόνας SLE,⁵⁸ ενώ το S αλληλόμορφο γονίδιο του CR1 έχει συνδεθεί γενετικά με την ασθένεια αυτή.⁵⁹ Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους το συμπλήρωμα μετέχει στην παθογένεση των αυτοάνοσων διαταραχών περιλαμβάνουν την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση αυτοαντιγόνων στην κυκλοφορία, λόγω της ανεπαρκούς ρύθμισης της ενεργοποίησης του συμπληρώματος κατά την απόπτωση,^{60,61} καθώς επίσης και το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ αυτοαντισωμάτων και αυτοαντιγόνων, τα οποία εναποτίθενται στους ομόλογους ιστούς και στα όργανα (όπως το νεφρικό σπείραμα), οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κλασικής οδού του συμπληρώματος.^{16,62} Παρ’ όλα αυτά, η συμμετοχή του DAF και του MIRL στη ρύθμιση της βαρύτητας και της έκτασης της εν λόγω βλάβης σε συστηματικό επίπεδο παραμένει αδιευκρίνιστη. Ένα γενικό, αλλά ταυτόχρονα και επισφαλές, συμπέρασμα από προηγούμενες μελέτες

πάνω σε πειραματικά μοντέλα διαφορετικών αυτοάνοσων διαταραχών (εγκεφαλίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα κ.ά.)²³⁻³⁴ θα ήταν ότι οι ιστοί, στην προσπάθειά τους να προστατευτούν από το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα και να περιορίσουν την κυτταρική βλάβη, αυξάνουν την έκφραση των συγκεκριμένων μορίων. Αντίθετα, η μείωσή τους αντανακλά είτε την υψηλή ενεργότητα της νόσου σε τοπικό επίπεδο, οπότε τα μόρια αυτά καταναλώνονται, είτε την οξεία φάση της διαταραχής, οπότε και οι προσαρμοστικοί αυτοί μηχανισμοί, που χρειάζονται χρόνο για να αναπτυχθούν, δεν αναλαμβάνουν άμεσα δράση. Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά στο αιμοποιητικό σύστημα, εφ’ όσον σπάνιες περιπτώσεις GPI-αρνητικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με επιβεβαιωμένες *PIG-A* μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί να συμβαίνουν ακόμη και στο μυελό των οστών φυσιολογικών ατόμων, χωρίς όμως να υπερέρχουν και να αναπτύσσονται σε βάρος της φυσιολογικής αιμοποίησης,⁶³ αναφορές στη

Πίνακας 5. Τύποι CD55/CD59 «αρνητικών» ερυθροκυτταρικών πληθυσμών (φαινότυποι «τύπου ΝΠΑ») και η συχνότητα της συνυπάρχουσας ποσοστιαίας CD55/CD59 έλλειψης από τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε φυσιολογικούς αιμοδότες και ασθενείς με ΝΠΑ.

Ομάδες ελέγχου	CD55(-)/CD59(+) (n) [%]	CD55%/CD59% (n) [%]	CD55(+)/CD59(-) (n) [%]	CD55%/CD59% (n) [%]	CD55(-)/CD59(-) (n) [%]	CD55%/CD59% (n) [%]
Φυσιολογικοί αιμοδότες	(2) [1,6]	10%/0% (2) [1,6]	(1) [0,8]	0%/10% (1) [0,8]	(2) [1,6%]	10%/10% (2) [1,6]
ΝΠΑ	(0) [0]	(0) [0]	(0) [0]	(0) [0]	(10) [100]	25%/10% (3) [30] 25%/25% (3) [30] 75%/50% (1) [10] 75%/75% (1) [10] 100%/100% (2) [20]

ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.

διεθνή βιβλιογραφία σπάνιων περιστατικών αυτοάνοσων διαταραχών (όπως ο SLE και το Sj), που συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη ΝΠΑ κατά την πορεία της νόσου,⁶⁴⁻⁶⁷ ενισχύουν την υπόθεση μιας, πιθανόν, ανοσολογικής αρχής μυελικής ανεπάρκειας.⁶⁸ Έτσι οι GPI-αρνητικοί κλώνοι δραπετεύουν μιας ανοσολογικής επίθεσης από T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα κατά της φυσιολογικής αιμοποίησης, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται και, τελικά, επικρατούν στο μυελό των οστών.^{3,4,7}

Παρουσία ερυθροκυτταρικών πληθυσμών «τύπου ΝΠΑ» σε ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές

Αν και έχουν προηγηθεί μελέτες την τελευταία δεκαετία με στόχο την εκτίμηση της έκφρασης του CD55 και του CD59 στα κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με SLE, RA και Sj,⁴⁵⁻⁵⁵ η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που καταδεικνύει την παρουσία «τύπου ΝΠΑ» ερυθροκυτταρικών πληθυσμών –εκτός από τους ασθενείς με SLE και RA– σε αυτούς με σύνδρομο Sjögren, συστηματικό σκληρόδερμα, αγγειίτιδα, δερματομυοσίτιδα, αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και μικτή νόσο του συνδετικού ιστού. Μάλιστα, η συχνότητα των πληθυσμών αυτών για κάθε νόσημα ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τους φυσιολογικούς αιμοδότες, με εξαίρεση τους ασθενείς με δερματομυοσίτιδα και αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, όπου ο αριθμός των παρατηρήσεων ήταν πολύ μικρός.

Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι μόνο 9 ασθενείς δεν εμφάνισαν ερυθρά αιμοσφαίρια «τύπου ΝΠΑ» στο περιφερικό τους αίμα (9/113, 8,0%), χρησιμοποιώντας το σύστημα μικροτυποποίησης με γέλη sephacryl. Το μέγεθος των ελλειμματικών κλώνων δεν υπερέβη ποτέ το 25% του συνολικού ερυθροκυτταρικού πληθυσμού, ενώ οι πιο συχνόι φαινότυποι ποσοστιαίας έλλειψης CD55/CD59 ήταν ο 10%/0% (48/113, 42,5%) και ο 10%/10% (34/113, 30,1%). Εν τούτοις, αξιοσημείωτο ήταν επίσης το γεγονός ότι η εμφάνιση CD55 αρνητικών ερυθρών αιμοσφαιρίων (97/113, 85,8%) ήταν σημαντικά συχνότερη από τους CD59 αρνητικούς (54/113, 47,8%), καθώς και ότι δεν σημειώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη μειωμένη έκφρασή τους.

Εύλογα λοιπόν ανακύπτει το ερώτημα για το ποιες διεργασίες μεσολαβούν την απώλεια της έκφρασης του DAF και του MIRC από τη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων στους εν λόγω ασθενείς.

Συνοπτική ανασκόπηση προηγούμενων μελετών:
Απουσία κοινού προτύπου έκφρασης του CD55 και του CD59

Από το 1980 περίπου, όταν δημοσιεύτηκαν οι πρώτες

αναφορές για τη μειωμένη έκφραση των mCregs –συγκεκριμένα αυτή του CR1 (C3b υποδοχέα)– στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών με SLE,⁶⁹ διάφορες μελέτες με κυτταρομετρία ροής και ανοσοφθορισμό στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο SLE^{46-48,50-52} και η RA,^{54,55} προσπάθησαν να καθορίσουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης των DAF και MIRC στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Έχοντας, στην πλειοψηφία τους, πραγματοποιηθεί με μικρό δείγμα ασθενών, οι εν λόγω έρευνες αποκάλυψαν, στην πλειονότητα, μια σημαντικά μειωμένη έκφραση των μορίων αυτών στα ερυθρά, είτε μεμονωμένη για κάθε αντιγόνο, είτε σε συνδυασμό. Ωστόσο, δεν μπόρεσε να αναδειχθεί συσχέτιση με την ενεργότητα του συμπληρώματος (επίπεδα C3 και C4 στον ορό του περιφερικού αίματος), την παρουσία αναιμίας ή αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (anti-phospholipid antibodies, aPLA) και την ενεργότητα της νόσου ή την κλινική βαρύτητά της (SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index, SLICC-DI: systemic lupus international collaborating clinics damage index, αντίστοιχα).^{48,50-52,55}

Πρόσφατα, στη μεγαλύτερη κλινική μελέτη για την έκφραση των mCregs –CD55, CD59, CR1– στη μεμβράνη των κυττάρων του περιφερικού αίματος, σε 100 ασθενείς με SLE, οι Alegretti et al ανέφεραν τη σημαντικά μειωμένη έκφραση μόνο του MIRC στα ερυθρά, σε σχέση με τους φυσιολογικούς αιμοδότες, η οποία όμως δεν συσχετιζόταν με την αναιμία (Hb <11 g/dL) ή την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (autoimmune hemolytic anemia, AIHA).⁵² Σε αντίθεση, οι Richaud-Patin et al –σε μικρότερο, βέβαια, αριθμό ασθενών (24 έναντι 100)– είχαν αναδείξει πως παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς με SLE και AIHA, καθώς και αυτοί με πρωτοπαθή AIHA, είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση του CD59 σε σύγκριση με φυσιολογικούς αιμοδότες, οι ασθενείς με SLE χωρίς AIHA δεν παρουσίαζαν διαφορά στην έκφραση του CD59 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς.⁴⁷ Παράλληλα, η σημαντική μείωση του MIRC στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με νεφρίτιδα του λύκου (45 ασθενείς)⁵² ήρθε σε αντίθεση με αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης,⁴⁶ η οποία ανέδειξε σημαντικά υψηλά επίπεδα τόσο του CD55 όσο και του CD59 στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Θα πρέπει να σημειωθεί ο μικρός αριθμός ασθενών της τελευταίας (15 ασθενείς). Στη μελέτη αυτή, εκτός από την ανίχνευση CD55 και CD59 αρνητικών ερυθροκυτταρικών πληθυσμών σε ασθενείς με SLE, δεν αναδείχθηκε κάποια διαφορά όσον αφορά στην έλλειψη των μορίων αυτών ανάλογα με την παρουσία ή μη αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Μάλιστα, τα στατιστικά δεδομένα μας ανέδειξαν ότι η παρουσία κλώνων «τύπου ΝΠΑ» δεν συσχετίζεται με την παρουσία

αναιμίας, ακόμη και όταν το όριο της Hb τοποθετηθεί χαμηλότερα, στη συγκέντρωση <11 g/dL.

Κυτταροπενίες και «τύπου ΝΠΑ» ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί

Αναφορικά με την έκφραση του DAF και του MIRL στα λευκοκύτταρα των ασθενών με SLE, προηγούμενες μελέτες με κυτταρομετρία ροής, εκτός από τη σημαντική παρουσία αντίστοιχων «τύπου ΝΠΑ» λευκοκυτταρικών πληθυσμών –σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς αιμοδότες– ανέδειξαν ότι οι λευκοπενικοί ασθενείς, είτε ουδετεροπενικοί είτε λεμφοπενικοί, είχαν μεγαλύτερη έλλειψη των επιφανειακών αυτών αντιγόνων, ενώ αντίστροφη συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην έκφρασή τους και την ενεργότητα του συμπληρώματος.^{45,48–52} Πράγματι, σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη ήταν η έλλειψή τους από την κυτταρική μεμβράνη, τόσο μεγαλύτερη και η ενεργότητα του συμπληρώματος.^{49,52} Μάλιστα, η μειωμένη έκφρασή τους στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων φάνηκε να συσχετίζεται με την κλινική βαρύτητα της νόσου, γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε όταν εξετάστηκε σε σχέση με τη λεμφοκυτταρική τους έκφραση.⁵²

Στους λεμφοπενικούς ασθενείς, υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό παρουσίας και τίτλος αυτοαντισωμάτων (όπως anti-SSA, anti-dsDNA κ.λπ.), που χαρακτηριστικά δεν συσχετιζόταν με την έλλειψη των CD55 και CD59 από τα λεμφοκύτταρα.^{45,48,50,52} Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η λεμφοπενία όχι μόνο αποτελεί τη συχνότερη αιματολογική διαταραχή του SLE,⁴³ αλλά σχετίζεται και με την κλινική επιδείνωση της νόσου.⁴⁸ Παρά το γεγονός ότι έχει αποδειχθεί η συμμετοχή αντιλεμφοκυτταρικών αντισωμάτων στην εμφάνισή της – ειδικά IgM κρουσφαιρινών– η σημασία της λεμφοπενίας στην παθοφυσιολογία της νόσου και την κλινική της δραστηριότητα παραμένει αμφιλεγόμενη.^{41,42,49} Εν τούτοις, θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι, εκτός της λειτουργίας τους ως ρυθμιστές του καταρράκτη του συμπληρώματος, ο DAF και ο MIRL επιτελούν επιπρόσθετους ρόλους ως σηματοδοτικά μόρια ή μόρια σύνδεσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς του ανοσοποιητικού συστήματος, ανάλογα με το κύτταρο στο οποίο τη μεμβράνη εκφράζονται, συμμετέχοντας έτσι στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, στην τροποποίηση της λειτουργίας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και στη ρύθμιση της έκκρισης κυτταροκινών και προφλεγμονωδών παραγόντων.⁷⁰

Στη μελέτη αυτή, δεν αναδείχθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του CD55 ή του CD59 στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στην παρουσία κυτταροπενιών στις άλλες αιμοποιητικές σειρές. Άλλωστε, υπάρχουν ενδείξεις από

προηγούμενες μελέτες, οι οποίες δεν αμφισβητούν την παρουσία συσχέτισης μεταξύ του μεγέθους του κλώνου ΝΠΑ και της εμφάνισης κυτταροπενιών.⁷¹ Παρ' όλα αυτά, ένα ενδιαφέρον εύρημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης ήταν η περιγραφή στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ Hb και Lym μόνο σε ασθενείς με συνυπάρχουσα έλλειψη του DAF και του MIRL από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, αφού δεν υπήρξε στο παρελθόν παρόμοια αναφορά.

Συσχέτιση της αιμοσφαιρίνης με την ερυθροκυτταρική έλλειψη του CD55 στα αυτοάνοσα νοσήματα

Εξ ίσου σημαντική ήταν η περιγραφή, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, της ύπαρξης αρνητικής συσχέτισης ανάμεσα στη συγκέντρωση της Hb και στην έλλειψη του CD55 από τη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, στους ασθενείς με αυτοάνοσες νόσους ($r_s = -0,205$, $p = 0,0296$). Παρά το γεγονός ότι η έλλειψη του DAF και του MIRL από τα ερυθροκύτταρα δεν συσχετίστηκε με την παρουσία αναιμίας, τα στατιστικά δεδομένα αποκάλυψαν σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς με φυσιολογική έκφραση του CD55 και σε αυτούς με έλλειψη στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, της τάξης του -1,45 g/dL.

Αν και η παθογένεια της αναιμίας στους εν λόγω ασθενείς θεωρείτο παλαιότερα κυρίως αποτέλεσμα της καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων από την αιμολυτική δράση αυτοαντισωμάτων, τα σύγχρονα ευρήματα υποδεικνύουν την αναιμία της χρόνιας νόσου (anemia of chronic disease, ACD) –ήπια προς μέτρια ορθοκυτταρική-υπόχρωμη αναιμία– ως τη συχνότερη μορφή αναιμίας στις αυτοάνοσες διαταραχές. Η ανασταλτική δράση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IL-1, TNF- α , IFN- α , και αυτοαντισώματα κατά της ερυθροποιητίνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ACD. Ωστόσο, η ACD συνυπάρχει συνήθως με άλλες μορφές αναιμίας που προκαλείται από σχετικά συχνούς μηχανισμούς, όπως η σιδηροπενική αναιμία, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, η αναιμία της χρόνιας νεφρικής νόσου και η μυελοτοξικότητα προκαλούμενη από την κυκλοφοσφαιδίδη. Η παρουσία της αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας συνήθως υπερεκτιμάται λόγω ανεύρεσης μιας θετικής άμεσης δοκιμασίας Coombs χωρίς πραγματική αιμόλυση. Η έλλειψη των CD55 και CD59 είναι συνήθως υπεύθυνη για σπάνια επεισόδια αιμόλυσης με αρνητική την άμεση αντίδραση Coombs, επειδή αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στη λύση από το συμπλήρωμα.⁴³ Από την άλλη πλευρά, η μυελική ανεπάρκεια που ευοδώνεται από αυτοαντιδραστικά T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα πιθανόν να αποτελεί έναν επί πλέον παράγοντα που συμβάλλει στην αναιμία των αυτοάνοσων διαταραχών.^{43,68} Η περαιτέρω διαλεύκανση

των υπεύθυνων μοριακών μηχανισμών της συμμετοχής του CD55 στον καθορισμό των επιπέδων της Hb στα αυτοάνοσα νοσήματα υπόσχεται πολλά, τόσο για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της αναιμίας των ασθενών αυτών, όσο και για τη θεραπευτική της αντιμετώπιση.

Πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί της μεταβολής στην έκφραση των DAF και MIRL στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Διάφορες υποθέσεις έχουν προταθεί προκειμένου να ερμηνεύσουν τις μεταβολές της έκφρασης του DAF και του MIRL στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων στα αυτοάνοσα νοσήματα. Αρχικά, η μειωμένη έκφραση των αντιγόνων αυτών στα ερυθρά αιμοσφαίρια θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στη διαταραχή της σύνθεσης της GPI «άγκυρας», είτε σε διαταραχή της σύνδεσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στη μεμβράνη των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς.⁴⁷ Ωστόσο, η εν λόγω πιθανότητα έχει αποκλειστεί από άλλους ερευνητές, εφ' όσον διαφορετικά πρότυπα μειωμένης έκφρασης των mCregs έχουν παρατηρηθεί σε κάθε κυτταρική σειρά, υποδηλώνοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, τη συμμετοχή διαφορετικών παθοφυσιολογικών διεργασιών, ειδικών για κάθε κυτταρική σειρά.⁵² Εν τούτοις, παρόμοια ποικιλομορφία έχει περιγραφεί στο πρότυπο έκφρασης των GPI-συνδεδεμένων πρωτεϊνών (GPI-anchored proteins, GPI-APs) που έχει μελετηθεί ανάμεσα σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυτταρικών σειρών του αιμοποιητικού, σε ασθενείς με ΝΠΑ και σε φυσιολογικούς αιμοδότες.^{71,72} Μάλιστα, οι Hernandez-Campo et al περιέγραψαν ότι η έκφραση του DAF και του MIRL παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς των αιμοποιητικών σειρών, ενώ, παράλληλα, ο MIRL εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, συγκριτικά με τον DAF.³² Έτσι, θα ήταν λογικό να υποτεθεί ότι αυτή η παράμετρος σχετίζεται με τη σημαντική διαφορά ανάμεσα στην έλλειψη του CD55 και του CD59 στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στη δική μας μελέτη.

Σε διάφορες μελέτες έχει περιγραφεί η υπερέκφραση του DAF και του MIRL στους ιστούς και στα εμπύρνηνα κύτταρα που «εκτίθενται» στην παρατεταμένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος, καθώς και σε προφλεγμονώδεις παράγοντες και κυτταροκίνες, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP), ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου-α (tumor necrosis factor α, TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 (interleukin-1, IL-1).^{46,49,73-75} Το γεγονός αυτό έχει θεωρηθεί ως προσαρμοστική απόκριση των ιστών έναντι στο χρόνιο φλεγμονώδες ερέθισμα, λόγω της παρατεταμένης ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η οποία όμως προσαρμογή απουσιάζει κατά την οξεία φάση.⁷⁶ Ωστόσο, η βιολογική

λειτουργία των εν λόγω μορίων ποικίλλει ανάλογα με την κυτταρική μεμβράνη στην οποία εκφράζονται.⁷⁰ Σε αντίθεση με τα λευκοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα υπόλοιπα εμπύρνηνα κύτταρα, η πρωτεϊνική σύνθεση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μεταβάλλεται σπάνια, διατηρώντας σταθερή σύσταση έναντι της κατάστασης ενεργοποίησης του ερυθρού αιμοσφαιρίου.⁴⁹ Δεν θα ήταν αβάσιμο, λοιπόν, να υποστηριχθεί ότι η ανεπάρκεια αυτών των αντιγόνων επιφανείας στα ερυθρά συμβαίνει λόγω της κατανάλωσής τους, κατά την προσπάθειά τους να αποτρέψουν τη λυτική δράση του συμπληρώματος απέναντι στο κύτταρο-στόχο, λειτουργώντας έτσι ως ανασταλτές του καταρράκτη. Εν τούτοις, θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψη τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, όπου σε γενικές γραμμές δεν σημειώθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την έκφραση των αντιγόνων αυτών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Μάλιστα, στη σχετική μελέτη, ο πληθυσμός των ερυθρών «τύπου ΝΠΑ» δεν υπερέβη ποτέ το 25% του συνόλου των ερυθρών σε κάθε ασθενή, ενώ ο πιο κοινός τύπος ποσοστιαίας έλλειψης ήταν 10% και για τα δύο αντιγόνα. Επίσης, υπάρχουν επιστημονικά ευρήματα που υποστηρίζουν ότι οι φαινοτυπικές μεταβολές –στην πλειοψηφία τους υπερέκφραση– των GPI-APs που εμφανίζονται ανάμεσα τόσο στα «παθολογικά» όσο και στα «φυσιολογικά» κύτταρα των ΝΠΑ ασθενών, συγκριτικά με τους φυσιολογικούς αιμοδότες, μπορεί να συμβαίνουν ανεξάρτητα της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, σε συνάρτηση όχι μόνο με τον τύπο της υποκείμενης γονιδιακής διαταραχής (μεταλλάξεις του *PIG-A*) αλλά και το γειτονικό, στο κύτταρο, μικροπεριβάλλον.⁷²

Εφ' όσον δεν σημειώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία ή τον τίτλο των διαφόρων aPLA ή των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (anti-nuclear antibodies, ANA) και στην έκφραση του DAF και του MIRL στη μεμβράνη των κυττάρων του περιφερικού αίματος, καθώς και στην κλινικής εικόνα ή βαρύτητα της νόσου, μερικοί συγγραφείς πρότειναν την ύπαρξη κάποιων «μη ανιχνεύσιμων» ακόμη αυτοαντισωμάτων ή ανοσοσυμπλεγμάτων έναντι συγκεκριμένων κυτταρικών αυτοαντιγόνων, που είτε εμποδίζουν τη σύνδεση των πρωτεϊνών στην GPI «άγκυρα», είτε απομακρύνουν τα συμπλέγματα GPI-πρωτεΐνης από την κυτταρική επιφάνεια.^{47-50,52} Εν τούτοις, η εν λόγω θεωρία έρχεται σε αντίθεση με τα πειραματικά δεδομένα, αφού οι Arora et al δεν παρατήρησαν μεταβολή στην έκφραση του DAF και του MIRL κατά την επώαση φυσιολογικών ερυθροκυττάρων με ορό ασθενών με RA, τα ερυθρά των οποίων παρουσίαζαν σημαντική μείωση της έκφρασης των CD55 και CD59.⁵⁴ Επιπρόσθετα, οι συγγραφείς αυτοί πρότειναν ως πιθανό μηχανισμό την αυτόματη ενδοκυττάρωση που συμβαίνει όταν επωαστούν ερυθροκύτταρα με MAC, τα κυστίδια των

οποίων περιέχουν DAF, MIRL και CR1.^{77,78} Σύμφωνα με άλλη θεωρία, είναι πιθανό να συμβαίνει μια πρωτεολυτική κάθαρση των μορίων αυτών από τη μεμβράνη των ερυθρών, λόγω του ενεργοποιημένου συμπληρώματος, από ένζυμα όπως οι ειδικές για τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη φωσφολιπάσες C και D.^{47,54,79} Εφ' όσον όμως αυτά τα ένζυμα είναι ειδικά για τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, η τελευταία υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, εξ αιτίας όχι μόνο της απουσίας συσχέτισης ανάμεσα στην ερυθροκυτταρική έλλειψη του CD55 και του CD59, αλλά και της σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στην απώλεια της έκφρασής τους.

Επικράτηση των κλώνων «τύπου ΝΠΑ» στο μυελό των οστών: Σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας ανοσολογικής αρχής;

Όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει αποδειχθεί ότι φυσιολογικοί αιμοδότες παρουσιάζουν ελάχιστους «τύπου ΝΠΑ» κλώνους, ενώ μεταλλάξεις του *PIG-A* γονιδίου, χαρακτηριστικές για ΝΠΑ, έχουν ταυτοποιηθεί στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτών.⁸⁰ Πράγματι, ανευρέθηκε ότι 5 από τους 121 φυσιολογικούς αιμοδότες είχαν ερυθροκυτταρικούς πληθυσμούς με έλλειψη του CD55 ή/και του CD59, η οποία δεν υπερέβη το 10% του συνόλου των ερυθρών, σε όλες τις περιπτώσεις. Παρομοίως, έχει περιγραφεί η ύπαρξη «τύπου ΝΠΑ» κλώνων σε πολύ μικρό αριθμό κυττάρων σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, πριν τη θετική επιλογή ανάπτυξής τους από τη χορήγηση αντι-CD52 (Campath-1H).⁸¹ Σύμφωνα με το μοντέλο της «διπλής θεωρίας»,^{3,4,7} τα ευρήματα σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με SLE και κυτταροπενίες, οι οποίες δεν λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία,^{36,37} καθώς και η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι μυελικών πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων σε σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με SLE και απλαστική αναιμία,^{38,39} ενισχύουν τη θεωρία ενός πρωτοπαθούς συνδρόμου αιμοποιητικής ανεπάρκειας ανοσολογικής αρχής. Έτσι, φαίνεται ότι υπάρχει μια ανοσορυθμιζόμενη θετική επιλογή επιβίωσης του GPI-αρνητικού ερυθροκυτταρικού κλώνου, ο οποίος πολλαπλασιάζεται επιλεκτικά, σε σύγκριση με τη φυσιολογική αιμοποίηση, μέσα σε ένα μικροπεριβάλλον ανοσολογικής επίθεσης στο μυελό των οστών, έως ότου καταστεί ανιχνεύσιμος με τη μεθοδολογία του SGT.^{56,57}

Επιπρόσθετα, κανένας από τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη μας δεν παρουσίασε κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα αιμόλυσης, ενώ οι δοκιμασίες Ham και σουκρόζης ήταν αρνητικές σε όλους. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο μικρό αριθμό ερυθροκυττάρων με συνυπάρχουσα έλλειψη του DAF και του MIRL. Από την άλλη πλευρά, μεμονωμένη

έλλειψη του CD55 ή του CD59 δεν μπορεί να οδηγήσει σε αιμόλυση.⁸²

Πράγματι, η υποκλινική ΝΠΑ (subclinical PNH, PNH-sc) ορίζεται ως η παρουσία μικρών πληθυσμών GPI-αρνητικών κυττάρων του αίματος σε ασθενείς με διάφορους τύπους μυελικής ανεπάρκειας που όμως δεν εμφανίζουν κλινικά ή εργαστηριακά σημεία αιμόλυσης, σύμφωνα με το International PNH Interest Group.⁸³ Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι στο 8% των ρευματολογικών ασθενών που δεν παρουσίασε «τύπου ΝΠΑ» φαινότυπο στα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιώντας το SGT, μπορεί να ανιχνευθούν <1% «τύπου ΝΠΑ» κύτταρα, μόνο με υψηλής ευαισθησίας δοκιμασία κυτταρομετρίας ροής.⁶⁸ Σύμφωνα με τους ερευνητές, εφ' όσον η τεχνική αυτή απέτυχε να αναδείξει την παρουσία «τύπου ΝΠΑ» κλώνων περιφερικών κυττάρων του αίματος σε 43 ασθενείς με SLE και 14 με πολλαπλό μυέλωμα –ενώ έχει αποδειχθεί η ύπαρξη τέτοιων κλώνων στους ασθενείς με τα εν λόγω νοσήματα^{–11,47} η αύξηση του μεγέθους των συγκεκριμένων κλώνων, που τους καθιστά ανιχνεύσιμους, θα πρέπει να θεωρηθεί ως χαρακτηριστικό στοιχείο μυελικής ανεπάρκειας.⁶⁸

Περιορισμοί της μελέτης

Αδιαμφισβήτητα, η επίκτητη έλλειψη του CR1 στα ερυθρά⁸⁴ θεωρείται από πολλούς ερευνητές ότι συμβάλλει σημαντικά στην παθοφυσιολογία πολλών αυτοάνοσων διαταραχών, όπως ο SLE και η RA,^{85,86} καθώς επίσης και ότι αντανάκλα την ενεργότητα της νόσου και την κατάσταση της φλεγμονής, κατέχοντας σημαντικό ρόλο στη μεσολαβούμενη από τα C3 και C4 κλάσματα του συμπληρώματος κάθαρση των ανοσοσυμπλεγμάτων από την κυκλοφορία.^{86–89} Εν τούτοις, η έκφραση αυτής της ρυθμιστικής πρωτεΐνης του συμπληρώματος στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν εκτιμήθηκε στους ασθενείς μας, αν και σε προηγούμενες μελέτες συσχέτιστηκε με την ενεργότητα του συμπληρώματος.⁵² Επίσης, δεν εκτιμήθηκαν η βαρύτητα της νόσου, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και το επίπεδο της φλεγμονής σε συνάρτηση με την παρουσία «τύπου ΝΠΑ» ερυθρών αιμοσφαιρίων στην παρούσα μελέτη.

Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση είτε ανοσοκατασταλτικής είτε ανοσοτροποποιητικής θεραπείας δυνητικά θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Παρά το γεγονός ότι δεν αναδείχθηκε σημαντική σχέση ανάμεσα στην έκφραση των CD55 και CD59 και τη θεραπευτική αγωγή, η ετερογένεια αυτής σε συνδυασμό με τα πολλαπλά θεραπευτικά σχήματα μάλλον κατέστησαν αδύνατη την ανάδειξη κάποιας συσχέτισης μεταξύ του είδους της θεραπείας και των αντιγόνων της ερυθροκυτταρικής επιφάνειας ή των αιματολογικών παραμέτρων.

Χωρίς αμφιβολία, συγκριτικά με την κυτταρομετρία ροής, το SGT έχει το μειονέκτημα να μην ανιχνεύει μικρούς ΝΠΑ ερυθροκυτταρικούς κλώνους (<2%), καθώς επίσης και να μην εκτιμά την παρουσία CD55 και CD59 έλλειψης σε άλλες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι αποτελεί ένα σημαντικό χρήσιμο διαγνωστικό μέσο, αρκετά ευαίσθητο, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία διαλογής προκειμένου να ανιχνεύεται η παρουσία ΝΠΑ ερυθροκυτταρικών πληθυσμών.^{56,57}

Καταλήγοντας, αν και δεν καταδεικνύεται σαφώς στην παρούσα μελέτη η κλινική σημαντικότητα της παρουσίας CD55 ή/και CD59 έλλειψης στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα, η παρουσία «τύπου ΝΠΑ» ερυθροκυτταρικού φαινότυπου σε μικρό ποσοστό

(συνήθως <25%), η οποία φαίνεται ανεξάρτητη από την ανάπτυξη αναιμίας ή άλλων κυτταροπενιών, καθώς επίσης η απουσία κλινικών ή εργαστηριακών σημείων αιμόλυσης, ενισχύει την υπόθεση ότι αυτοί οι πληθυσμοί προϋπάρχουν σε ένα μικροπεριβάλλον μυελικής ανεπάρκειας οφειλόμενο στην αυτοάνοση. Έτσι, πιθανόν να τους προσφέρεται ένα θετικό πλεονέκτημα επιβίωσης, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται και να μετατρέπονται σε ανιχνεύσιμους, με τη μεθοδολογία μας, κλώνους. Η βαθύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα θα ήταν θεμελιώδης, εφ' όσον σε ασθενείς με άλλους τύπους μυελικής ανεπάρκειας, όπως για παράδειγμα στην απλαστική αναιμία και στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, η ανίχνευση «τύπου ΝΠΑ» κλώνων έχει προγνωστική αξία για την ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία.^{8,68}

ABSTRACT

“PNH-like” erythrocyte populations in patients with autoimmune connective tissue disorders

J.V. ASIMAKOPOULOS,¹ E. TERPOS,² L. PAPAGEORGIOU,¹ O. KAMPOUROPOULOU,³ D. CHRISTOULAS,² A. GIAKOUMIS,³ M. SAMARKOS,³ G. VAIPOULOS,³ K. KONSTANTOPOULOS,³ M.K. ANGELOPOULOU,¹ T.P. VASSILAKOPOULOS,¹ J. MELETIS¹

¹Hematology Department and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Laikon” General Hospital, Athens, ²Department of Clinical Therapeutics, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Alexandra” General Hospital, Athens,

³First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Laikon” General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(6):714–729

OBJECTIVE To evaluate the presence of CD55 and/or CD59 in the erythrocytes of patients with autoimmune disorders and their possible correlation with the demographic characteristics, clinical features, complete blood count (CBC) and treatment administered. **METHOD** CD55 and CD59 expression was evaluated in the erythrocytes of 113 patients with autoimmune connective tissue disorders using the sephacryl-gel microtyping system. Control groups consisting of 121 healthy blood donors of similar age and gender, and 10 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) were also studied. In all samples with CD55- and/or CD59-negative erythrocytes Ham and sucrose tests were also performed. **RESULTS** Of the 113 patients, 104 (92%) demonstrated “PNH-like” erythrocyte populations: 47 (41.6%) with concomitant deficiency of CD55 and CD59, 50 (44.2%) with isolated deficiency of CD55 and 6 (6.2%) with isolated deficiency of CD59. In healthy donors, only 2 (1.6%) had red cells with concomitant CD55/CD59 negativity and 3 (2.4%) with isolated CD55 or CD59 deficiency. All patients with PNH exhibited simultaneous CD55/CD59 deficiency. There was no clinical or laboratory evidence of hemolysis in any patient. Positive Ham and sucrose tests were found only in patients with PNH. No association was found between the presence of “PNH-like” red cell populations and cytopenia or any specific treatment. **CONCLUSIONS** This study provides evidence supporting the presence of “PNH-like” erythrocytes in patients with autoimmune connective tissue disorders. It was demonstrated that the presence of “PNH-like” population may affect the hematological profile, in these patients. Further studies will be required to clarify the pathophysiological mechanisms of this phenomenon.

Key words: DAF, MIRL, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Rheumatoid arthritis, Systemic lupus erythematosus

Βιβλιογραφία

1. ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ, ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΛΙΛΑΚΟΣ Κ. *Νυκτερινή παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία*. Εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα, 2011
2. ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ, ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΙΒ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυσμικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 2009, 26:206–229
3. LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101–110
4. MELETIS J, TERPOS E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003, 9:RA161–RA172
5. TOMITA M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1455:269–286
6. KINOSHITA T, INOUE N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2000, 4:632–638
7. ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ, ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΙΒ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Κλινική εικόνα και αντιμετώπιση της νυκτερινής παροξυσμικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 2009, 26:454–478
8. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, KONSTANTOPOULOS K, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia (Budap)* 2001, 31:7–16
9. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001, 2:33–37
10. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Red cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-phenotype in patients with acute leukemia. *Hematology* 2002, 7:69–74
11. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol* 2002, 75:40–44
12. 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
13. TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, TSIRONI M, KOROVESIS K ET AL. Unusual association between increased bone resorption and presence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2003, 78:344–348
14. TERPOS E, SARANTOPOULOS A, KOURAMBA A, KATSAROU O, STAVROPOULOS J, MASOURIDI S ET AL. Reduction of CD55 and/or CD59 in red blood cells of patients with HIV infection. *Med Sci Monit* 2008, 14:CR276–CR280
15. 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 micro typing system. *Leuk Lymphoma* 1997, 28:177–182
16. WALPORT MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001, 344:1140–1144
17. SONG WC. Complement regulatory proteins and autoimmunity. *Autoimmunity* 2006, 39:403–410
18. KIM DD, SONG WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006, 118:127–136
19. ZIPFEL PF, SKERKA C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009, 9:729–740
20. NANGAKU M. Complement regulatory proteins: Are they important in disease? *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:2411–2413
21. MERI S, JARVA H. Complement regulation. *Vox Sang* 1998, 74(Suppl 2):291–302
22. FRANK MM. Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med* 1987, 316:1525–1530
23. MEAD RJ, NEAL JW, GRIFFITHS MR, LININGTON C, BOTTO M, LASSMANN H ET AL. Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 2004, 84:21–28
24. LIU J, MIWA T, HILLIARD B, CHEN Y, LAMBRIIS JD, WELLS AD ET AL. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity *in vivo*. *J Exp Med* 2005, 201:567–577
25. MEAD RJ, SINGHRAO SK, NEAL JW, LASSMANN H, MORGAN BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002, 168:458–465
26. MATSUO S, NISHIKAGE H, YOSHIDA F, NOMURA A, PIDDLSDEN SJ, MORGAN BP. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats. *Kidney Int* 1994, 46:191–200
27. SOGABE H, NANGAKU M, ISHIBASHI Y, WADA T, FUJITA T, SUN X ET AL. Increased susceptibility of decay-accelerating factor deficient mice to anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Immunol* 2001, 167:2791–2797
28. XIAO H, SCHREIBER A, HEERINGA P, FALK RJ, JENNETTE JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007, 170:52–64
29. LIDINGTON EA, HASKARD DO, MASON JC. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. *Blood* 2000, 96:2784–2792
30. KAMINSKI HJ, KUSNER LL, RICHMONDS C, MEDOF ME, LIN F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Exp Neurol* 2006, 202:287–293
31. WILLIAMS AS, MIZUNO M, RICHARDS PJ, HOLT DS, MORGAN BP. Deletion of the gene encoding CD59a in mice increases disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50:3035–3044
32. HOEK RM, DE LAUNAY D, KOP EN, YILMAZ-ELIS AS, LIN F, REEDQUIST KA ET AL. Deletion of either CD55 or CD97 ameliorates arthritis in mouse models. *Arthritis Rheum* 2010, 62:1036–1042
33. MIWA T, MALDONADO MA, ZHOU L, SUN X, LUO HY, CAI D ET AL. Deletion of decay-accelerating factor (CD55) exacerbates autoimmune disease development in MRL/lpr mice. *Am J Pathol* 2002, 161:1077–1086
34. MIWA T, ZHOU L, MALDONADO MA, MADAIO MP, EISENBERG RA, SONG WC. Absence of CD59 exacerbates systemic autoimmu-

- nity in MRL/lpr mice. *J Immunol* 2012, 189:5434–5441
35. KEELING DM, ISENBURG DA. Haematological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Blood Rev* 1993, 7:199–207
 36. PEREIRA RM, VELLOSO ER, MENEZES Y, GUALANDRO S, VASSALO J, YOSHINARI NH. Bone marrow findings in systemic lupus erythematosus in patients with peripheral cytopenias. *Clin Rheumatol* 1998, 17:219–222
 37. FENG CS, NG MH, SZETO RS, LI EK. Bone marrow findings in lupus patients with pancytopenia. *Pathology* 1991, 23:5–7
 38. BAILY FA, LILLY M, BERTOLI LF, BALL GV. An antibody that inhibits *in vitro* bone marrow proliferation in a patient with systemic lupus erythematosus and aplastic anemia. *Arthritis Rheum* 1989, 32:901–905
 39. BROOKS BJ Jr, BROXMEYER HE, BRYAN CF, LEECH SH. Serum inhibitor in systemic lupus erythematosus associated with aplastic anemia. *Arch Intern Med* 1984, 144:1474–1477
 40. VOULGARELIS M, KOKORI SI, IOANNIDIS JP, TZIOUFAS AG, KYRIAKI D, MOUTSOPOULOS HM. Anaemia in systemic lupus erythematosus: Aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis* 2000, 59:217–222
 41. WINFIELD JB, FERNSTEN PD, CZYZYK JK. Anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1997, 108:127–135
 42. WENZEL J, GERDSEN R, UERLICH M, BAUER R, TUETING T, BIEBER T. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: Close *in vivo* association to autoantibodies targeting nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2004, 150:994–998
 43. GIANNOULI S, VOULGARELIS M, ZIAKAS PD, TZIOUFAS AG. Anemia in systemic lupus erythematosus: From pathophysiology to clinical assessment. *Ann Rheum Dis* 2006, 65:144–148
 44. HEPBURN AL, NARAT S, MASON JC. The management of peripheral blood cytopenias in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010, 49:2243–2254
 45. TSUNODA S, KAWANO M, KONI I, KASAHARA Y, YACHIE A, MIYAWAKI T ET AL. Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 2000, 51:293–299
 46. ARORA M, ARORA R, TIWARI SC, DAS N, SRIVASTAVA LM. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis. *Lupus* 2000, 9:127–131
 47. RICHAUD-PATIN Y, PÉREZ-ROMANO B, CARRILLO-MARAVILLA E, RODRIGUEZ AB, SIMON AJ, CABIEDES J ET AL. Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2003, 88:95–99
 48. RUIZ-ARGÜELLES A, LLORENTE L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007, 6:155–161
 49. GARCÍA-VALLADARES I, ATISHA-FREGOSO Y, RICHAUD-PATIN Y, JAKEZ-OCAMPO J, SOTO-VEGA E, ELÍAS-LÓPEZ D ET AL. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus* 2006, 15:600–605
 50. RUIZ-DELGADO GJ, VÁZQUEZ-GARZA E, MÉNDEZ-RAMÍREZ N, GÓMEZ-ALMAGUER D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009, 14:33–37
 51. ALEGRETTI AP, MUCENIC T, MERZONI J, FAULHABER GA, SILLA LM, XAVIER RM. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Cell Immunol* 2010, 265:127–132
 52. ALEGRETTI AP, SCHNEIDER L, PICCOLI AK, MONTICIELO OA, LORA PS, BRENOL JC ET AL. Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012:725684
 53. JONES J, LAFFAFIAN I, COOPER AM, WILLIAMS BD, MORGAN BP. Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1994, 33:707–712
 54. ARORA M, KUMAR A, DAS SN, SRIVASTAVA LM. Complement-regulatory protein expression and activation of complement cascade on erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1998, 111:102–106
 55. POURAZAR AA, ANDALIB AR, OREIZY F, KARIMZADEH H, GHAVAMINEJAD A, POURNASR-KHAKBAZ B. A flow cytometry study of CD55 and CD59 expression on erythrocytes in rheumatoid arthritis patients. *IJI* 2005, 2:91–96
 56. NATHALANG O, CHUANSUMRIT A, PRAYOONWIWAT W. Rapid screening of PNH red cell populations using the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003, 34:887–890
 57. GUPTA R, PANDEY P, CHOUDHRY R, KASHYAP R, MEHROTRA M, NASEEM S ET AL. A prospective comparison of four techniques for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol* 2007, 29:119–126
 58. CARROLL MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 2000, 74:61–88
 59. CORNILLET P, GREY P, PENNAFORTE JL, MEYER O, KAZATCHKINE MD, COHEN JH. Increased frequency of the long (S) allotype of CR1 (the C3b/C4b receptor, CD35) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1992, 89:22–25
 60. NAUTA AJ, RAASCHOU-JENSEN N, ROOS A, DAHA MR, MADSEN HO, BORRIAS-ESSERS MC ET AL. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003, 33:2853–2863
 61. MUÑOZ LE, LAUBER K, SCHILLER M, MANFREDI AA, HERRMANN M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6:280–289
 62. FERREIRA VP, PANGBURN MK, CORTÉS C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* 2010, 47:2187–2197
 63. WYRICK-GLATZEL J, McDONALD JK, CHEN JJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinemia: A molecular definition of the clinical biology of the disorder. *Lab Med* 2006, 37:237–243
 64. TOOZE JA, MARSH JC, WICKHAM N, DUKE OL, BEHRENS J, GORDON-SMITH EC. Response of aplastic anemia and scleroderma to cyclosporin. *Br J Haematol* 1993, 85:829–831
 65. COZZI F, BOTSIOS C, OSTUNI P, SFRISO P, PIVA E, MARSON P ET AL. Adult Henoch-Schönlein purpura with glomerulonephritis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An uncommon association. *Clin Rheumatol* 2002, 21:408–410
 66. GUPTA A, AL FULAIJ R, GUPTA RK, GUPTA G, MAROUF R. Develop-

- ment of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in systemic lupus erythematosus: An unusual cause of portal vein thrombosis. *Lupus* 2009, 18:743–746
67. NAKAMURA N, SUGAWARA T, SHIRATO K, KUMASAKA R, NAKAMURA M, SHIMADA M ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in systemic lupus erythematosus: A case report. *J Med Case Rep* 2011, 5:550
 68. NAKAO S, SUGIMORI C, YAMAZAKI H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int J Hematol* 2006, 84:118–122
 69. MIYAKAWA Y, YAMADA A, KOSAKA K, TSUDA F, KOSUGI E, MAYUMI M. Defective immune-adherence (C3b) receptor on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1981, ii:493–497
 70. DAS N, BISWAS B, KHERA R. Membrane-bound complement regulatory proteins as biomarkers and potential therapeutic targets for SLE. *Adv Exp Med Biol* 2013, 735:55–81
 71. HERNÁNDEZ-CAMPO PM, ALMEIDA J, SÁNCHEZ ML, MALVEZZI M, ORFAO A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006, 70:71–81
 72. HERNÁNDEZ-CAMPO PM, ALMEIDA J, ACEVEDO MJ, SÁNCHEZ ML, ALBERCA I, VIDRIALES B ET AL. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 2008, 48:1403–1414
 73. CUIDA M, LEGLER DW, EIDSHEIM M, JONSSON R. Complement regulatory proteins in the salivary glands and saliva of Sjögren's syndrome patients and healthy subjects. *Clin Exp Rheumatol* 1997, 15:615–623
 74. LI SH, SZMITKO PE, WEISEL RD, WANG CH, FEDAK PW, LI RK ET AL. C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 2004, 109:833–836
 75. MOUTABARRIK A, NAKANISHI I, NAMIKI M, HARA T, MATSUMOTO M, ISHIBASHI M ET AL. Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells. *Lymphokine Cytokine Res* 1993, 12:167–172
 76. VAN BEEK J, VAN MEURS M, 'T HART BA, BROK HP, NEAL JW, CHATAGNER A ET AL. Decay-accelerating factor (CD55) is expressed by neurons in response to chronic but not acute autoimmune central nervous system inflammation associated with complement activation. *J Immunol* 2005, 174:2353–2365
 77. RIPOCHE J, SIM RB. Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. *Biochem J* 1986, 235:815–821
 78. IIDA K, WHITLOW MB, NUSSENZWEIG V. Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *J Immunol* 1991, 147:2638–2642
 79. PASCUAL M, LUTZ HU, STEIGER G, STAMMLER P, SCHIFFERLI JA. Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes. *J Immunol* 1993, 151:397–404
 80. ARATEN DJ, NAFA K, PAKDEESUWAN K, LUZZATTO L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:5209–5214
 81. RAWSTRON AC, ROLLINSON SJ, RICHARDS S, SHORT MA, ENGLISH A, MORGAN GJ ET AL. The PNH phenotype cells that emerge in most patients after CAMPATH-1H therapy are present prior to treatment. *Br J Haematol* 1999, 107:148–153
 82. SUN X, FUNK CD, DENG C, SAHU A, LAMBRIS JD, SONG WC. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:628–633
 83. 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
 84. LACH-TRIFILIEFF E, MARFURT J, SCHWARZ S, SADALLAH S, SCHIFFERLI JA. Complement receptor 1 (CD35) on human reticulocytes: Normal expression in systemic lupus erythematosus and HIV-infected patients. *J Immunol* 1999, 162:7549–7554
 85. ROSS GD, YOUNT WJ, WALPORT MJ, WINFIELD JB, PARKER CJ, FULLER CR ET AL. Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol* 1985, 135:2005–2014
 86. COHEN JH, LUTZ HU, PENNAFORTE JL, BOUCHARD A, KAZATCHKINE MD. Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1992, 87:422–428
 87. HOLME E, FYFE A, ZOMA A, VEITCH J, HUNTER J, WHALEY K. Decreased C3b receptors (CR1) on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1986, 63:41–48
 88. BIRMINGHAM DJ, GAVIT KF, McCARTY SM, YU CY, ROVIN BH, NAGARAJA HN ET AL. Consumption of erythrocyte CR1 (CD35) is associated with protection against systemic lupus erythematosus renal flare. *Clin Exp Immunol* 2006, 143:274–280
 89. ARORA V, MONDAL AM, GROVER R, KUMAR A, CHATTOPADHYAY P, DAS N. Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex. *Mol Immunol* 2007, 44:1722–1728
- Corresponding author:*
- J. Meletis, Hematology Department and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Laikon" General Hospital, Athens, Greece
 e-mail: imeletis@med.uoa.gr