

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**HABİTÜEL ABORTUSLU HASTALARDA AKKİZ BİR TROMBOFİLİ
NEDENİ OLAN PAROKSİSMAL NOKTÜRNAL
HEMOGLOBİNÜRİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yaren DİRİK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cengiz DEMİR

İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Van - 2016

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**HABİTÜEL ABORTUSLU HASTALARDA AKKİZ BİR TROMBOFİLİ
NEDENİ OLAN PAROKSİSMAL NOKTÜRNAL
HEMOGLOBİNÜRİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yaren DİRİK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cengiz DEMİR

İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Van - 2016

TEŐEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca her konuda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam ve sayın tez danışmanım Doç. Dr. Cengiz DEMİR'e,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, görüşleriyle bana yeni ufuklar açan, çalışkanlıklarını örnek aldığım çok değerli Y.Y.Ü. İç Hastalıkları A.D.'da görev yapan hocalarım Doç.Dr. Erkan DOĞAN,Doç.Dr. Ahmet Cumhur DÜLGER,Doç.Dr.Mehmet ASLAN, Yrd. Doç. Dr. Rıfkı ÜÇLER, Yrd.Doç.Dr.Saliha YILDIZ,Yrd.Doç.Dr. Murat ALAY'a,Yrd.Doç.Dr. Nurhan Önal KALKAN'a

Tezimin hazırlanış aşamasında her konuda bana yardımcı olan ve yol gösteren Yrd Doç. Dr. A. Ufuk KÖMÜROĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. İzzet ÇELEĞEN'e,

Her konuda destek olan sayın hocam Prof. Dr. Ali KOLUSARI ve sevgili eşi Uzm. Dr. Pınar KOLUSARI'ya,

Her konuda bana yardımcı olan sevgili uzmanım Uzm.Dr.Ömer EKİNCİ'ye

Tezimin hazırlanmasında emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen tüm sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tezimde emeği geçen başta biyolog Murat ALTINBAŐAK olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına, hemşirelere ve hastane personeline,

Bu süreçte en büyük desteği ve sabrı gösteren, mutluluk kaynağım biricik kızım Derin Nil DİRİK ve sevgili eşi Deniz DİRİK'e,

Haklarını ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Yaren DİRİK

İÇİNDEKİLER

TABLolar.....	II
ŞEKİLLER.....	III
KISALTMALAR.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MATERYAL VE METOD.....	20
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA.....	36
SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	40

TABLÖLAR

Tablo 1. PNH sınıflaması	6
Tablo 2. PNH taraması gerektiren durumlar	7
Tablo 3. PNH tedavi endikasyonları	12
Tablo 4. HA'da etyolojik faktörler	16
Tablo 5. Trombofili sınıflaması	19
Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve biyokimya sonuçları	25
Tablo 7. Hasta ve Kontrol Gruplarında Yaş ile Hb,Ferritin ve T.bil değerleri arasındaki ilişki	26
Tablo 8. Hasta ve Kontrol Gruplarında Hb ile MCV, WBC, Fe, TDBK, Ferritin, LDH değerleri arasındaki ilişki	27
Tablo 9. Hasta ve Kontrol Gruplarında MCV ile WBC, PLT, Fe, TDBK, Ferritin, LDH değerleri arasındaki ilişki	28
Tablo 10. Hasta ve Kontrol Gruplarında WBC ile PLT,Fe, Ferritin, TDBK değerleri arasındaki ilişki	29
Tablo 11. Hasta ve Kontrol Gruplarında PLT ile TDBK ve LDH değerleri arasındaki ilişki	29
Tablo 12. Hasta ve Kontrol Gruplarında Fe ile TDBK, Ferritin, T.bil., İ.bil. değerleri arasındaki ilişki	30
Tablo 13. Hasta ve Kontrol Gruplarında TDBK ile LDH ve Ferritin değerleri arasındaki ilişki	30
Tablo 14. Hasta ve Kontrol Gruplarında T.bil., ile İ.bil. ve LDH değerleri arasındaki ilişki	31
Tablo 15. Hasta Grubunda İ.bil. ve LDH değerleri arasındaki ilişki	31
Tablo 16. Düşük sayısına göre hasta grubundaki parametreler	32
Tablo 17. PNH klonu pozitif tespit edilen hastaların klon yüzdesi ve düşük sayıları	33
Tablo 18. PNH klonu pozitif tespit edilen hasta grubu ile PNH klonu negatif hasta grubunun düşük sayısı ve yaş değerleri	33
Tablo 19. PNH klonu pozitif tespit edilen hasta grubu ile PNH klonu negatif hasta grubunun laboratuvar değerleri	34
Tablo 20. PNH klonu yüksek titrede pozitif tespit edilen hastanın kan değerleri	35

ŞEKİLLER

Şekil 1. PNH hastalığının moleküler temeli	1
Şekil 2. PNH hastalığının patofizyolojisi	4
Şekil 3. PNH hastalığında komplement sisteminin regülasyonu	5
Şekil 4. Eritrositlerin yüksek-sensitif akım sitometrik analizi	9
Şekil 5. FLAER yöntemi ile PNH klonunun saptanması	9



KISALTMALAR

PNH	: Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri
PIG-A	: Fosfatidilinositolglikan sınıf A
HA	: Habituel abortus
FLAER	: Floresan aerolizin
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
AFAS	: Antifosfolipid antikor sendromu
GPI	: Glikozilfosfatidilinozitol
DAF	: Decay Accelerating Factor
MIRL	: Membran İnhibitor Of Reactive Lysis
MAK	: Membran Atak Kompleksi
AA	: Aplastik Anemi
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
GPI-AP	: Glikozilfosfatidilinozitol - Çapa Protein
RA-MDS	: Refrakter anemi-Miyelodisplastik sendrom
RCMD-MDS	: Refrakter sitopeni çoklu seri displazi.
NO	: Nitrik Oksit
ECFC	: Endotel koloni oluşturan hücreler
TFPI	: Doku faktörü yolağı inhibitörü
PR3	: Proteinaz 3
u-PA	: Ürokinaz plazminojen aktivatörü

u-PAR	: Ürokinaz plazminojen aktivator reseptörü
PAP	: Plazmin-antiplazmin
PAI-1	: Plazminojen aktivator inhibitör-1
tPA	: Doku tipi plazminojen aktivatoru
AKHN	: Allojeneik hematopoetik kök hücre nakli
FSM	: Flow Sitometri
INR	: Uluslar Arası Normalizasyon Oranı
ASRM	: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
SVO	: Serebrovasküler olay

ÖZET

Amaç: Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH), damar içi hemoliz bulguları, kemik iliği yetersizliği ve tromboz ile seyreden, edinsel klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Habituel abortus (HA) öyküsü olan hastalarda hereditör ve akkiz trombofili nedenlerinin etyolojide önemli rol aldığı bilinmektedir. HA etyolojisindenadir de olsa yer alabilecek akkiz trombofili bir neden olan PNH açısından şimdiye kadar yapılan herhangi bir çalışma bulunmadığından bu çalışmada HA öyküsü olan hastaların etyolojisinde PNH hastalığının varlığının araştırılmasını amaçladık.

Materyal ve Metod: Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya hasta grubu olarak Hematoloji polikliniğine 21.07.2016 –05.11.2016 tarihleri arasında başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden, yaşları 18-55 yaş arasında değişen, toplam 150 (yüz elli) nedeni bilinmeyen, kadın doğumsal nedenlerin dışlandığı habitüel abortus hastası dahil edildi. Kontrol grubu olarak ise başka nedenlerle polikliniğine başvuran habitüel abortus öyküsü olmayan 18-55 yaş arası 150 (yüz elli) kadın hasta dahil edildi. Çalışma prospektif, kontrollü ve tek merkezli olarak yapıldı. Katılımcılardan serum örnekleri alındı. Venöz kan antekübital venden alındı. Çalışmaya alınan bütün katılımcılardan PNH klonu FLAER yöntemiyle hastanemiz Hematoloji BD Akım Sitometri laboratuvarında bakıldı.

Bulgular: Hasta grubumuzdaki 5 (%3,3) hastada pozitif PNH klonu tespit edildi. PNH klonu pozitif tespit edilen hastalarımızdan 4 tanesinin klon pozitifliği çok düşük düzeyde (%0,05, %0,24, %0,12, %0,21), 1 tanesinin klon pozitifliği yüksek düzeyde (%30) bulundu. Ayrıca hasta grubundaki 10 kadında (%6,6) tromboz öyküsü mevcuttu. PNH klon pozitifliği olan hastalarımızda tromboz öyküsü yoktu. Kontrol grubunda ise tromboz öyküsü ve PNH klon pozitifliği mevcut değildi.

Sonuç: Sonuç olarak kontrol grubuna göre, HA grubunda PNH klon pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edilmiş olması HA etyolojisinde PNH'nın rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akkiz trombofili, habitüel abortus, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri

ABSTRACT

Objectives: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal hematopoietic stem cell disease with intravascular haemolysis, bone marrow failure and thrombosis. It is known that hereditary and acquired thrombophilic states play an important role in etiology in patients with a history of habitual abortus (HA). PNH is an acquired thrombophilic reason which might rarely take part in HA etiology. Since there is no study conducted so far about this subject, in this study we aimed to investigate the presence of PNH in the etiology of patients with a history of HA.

Material and Method: This study was carried out at Van Yüzüncü Yıl Medical School, Department of Internal Medicine. Patient group included 150 habitual abortus patients, where the reason of HA was not known and gynaecological reasons were excluded, between ages 18 and 55, who accepted to participate the research and has applied to hematology polyclinic between the dates 21.7.2016 and 5.11.2016. The control group was composed of 150 female patients aged 18-55 years who had no habitual abortus history and applied to the polyclinic for different reasons. The research was prospective, controlled and single-centered. Serum samples were collected from participants. Venous blood was obtained from antecubital vein. FLAER method was used to search PNH clone in participants and it was examined in Department of Hematology, Flow Cytometry Laboratory of our hospital.

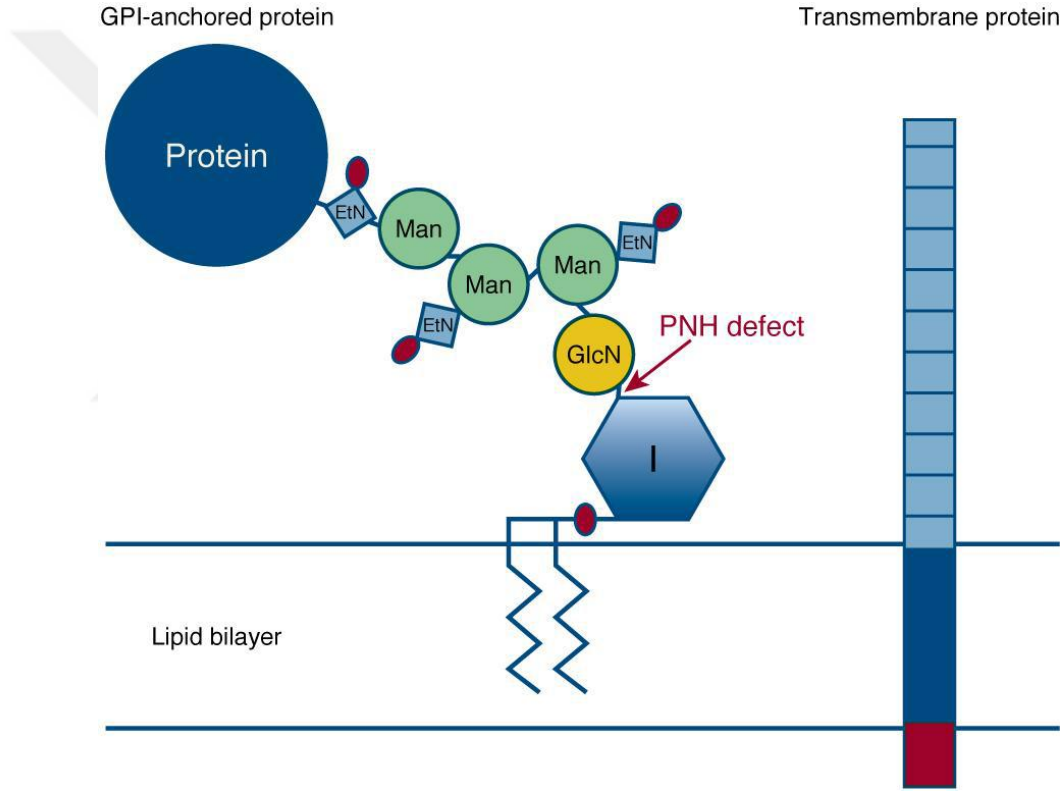
Outcomes: Positive PNH clones were detected in 5 (3.3%) patients in our case group. Clone positivity level of 4 cases were very low (0,05%, 0,24%, 0,12%, 0,21%) and clone positivity of one case was very high (30%) in the PNH clone positive patients. Moreover 10 patients (6.6%) had a thrombosis history in the patient group. Our patients with PNH clone positivity did not have thrombosis history. The control group patients neither had thrombosis history nor PNH clone positivity.

Conclusion: As a conclusion, regarding that PNH clone positivity was higher in the HA group compared to the control group, it is thought that PNH might play a role in HA etiology.

Key words: Acquired thrombophilia, habitual abortus, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

1.GİRİŞ VE AMAÇ

PNH, damar içi hemoliz bulguları, kemik iliği yetersizliği ve tromboz ile seyreden, edinsel klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Hastalık prevalansı 1/200000'den daha düşüktür(1). PNH her iki cinste de aynı sıklıkta görülür. Hastalığın her yaşta görülebildiği bilinmektedir. Görülme yaşı ortalama olarak 42'dir (2). X kromozomuna bağlı fosfatidilinositolglikan sınıf A (PIG-A) geninde oluşan mutasyonlar sonucu bu gen tarafından kodlanan gliserolfosfatidilinositol-çapa proteinlerinin(GPI-AP) kan hücreleri üzerindeki eksikliği hastalığın ana bulgusu hemolizden sorumlu tutulmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. PNH hastalığının moleküler temeli(1).

Tromboembolik durumların hastalık ilişkili mortalitede önemli rol aldığına dikkati çeken Crosby olmuştur.Trombozun altındaki neden henüz net olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu konuyla alakalı olarak pek çok sayıda farklı mekanizma sorumlu tutulmuştur (3).

HA son menstruasyon tarihinden itibaren 20. gebelik haftasından önce klinik olarak fark edilen 2 veya daha fazla gebelik kaybı olarak kabul edilir. İki ardışık düşük %5, üç ardışık düşük %1 oranında oluşmaktadır (4). HA nedenleri olarak; idiyopatik %40-50, immünolojik faktörler %20-40, anatomik faktörler %10-15, endokrin faktörler %10-15, genetik faktörler %5, enfeksiyöz faktörler %5, diğer faktörler (trombotik faktörler, çevresel faktörler v.s) %10 olarak sıralanabilmektedir (5).

Bu çalışmamızda, 21.07.2016 ile 05.11.2016 tarihleri arasında Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı hematoloji polikliniğine başvuran, çalışmaya katılmayı kabul eden, yaşları 18-55 arasında değişen nedeni bilinmeyen, kadın doğumsal nedenlerin dışlandığı HA öyküsü olan 150 (yüz elli) hasta ile başka nedenlerle hematoloji polikliniğine başvuran çalışmaya katılmayı kabul eden HA öyküsü olmayan yaşları 18-55 arası değişen 150 (yüz elli) kişilik kontrol grubu üzerinde, Floresan aerolizin (FLAER) yöntemi ile PNH klon varlığını araştırdık. HA öyküsü olan hastalarda herediter ve akkiz trombofili nedenlerinin etyolojide önemli rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle etyolojiye yönelik herediter trombofili açısından genetik incelemeler ve akkiz trombofili açısından özellikle sistemik lupus eritematozus (SLE) ve antifosfolipid antikor sendromuna (AFAS) yönelik tetkikler klinisyenler tarafından yapılmaktadır. Ancak HA etyolojisinde, akkiz trombofilik bir neden olan PNH açısından şimdiye kadar yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu araştırmadaki amacımız; HA öyküsü olan hastaların etyolojisinde nadir de olsa yer alabilecek akkiz bir trombofili sebebi olan PNH hastalığının varlığının araştırılmasıdır. Tespit edildiği durumda ise hastanın tedavi olması açısından yönlendirilmesi ve hastalığın yönetiminin sağlanmasıdır. Ayrıca nadir görülmesi nedeni ile tanı koymakta gecikilen PNH'a yönelik farkındalık oluşturmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

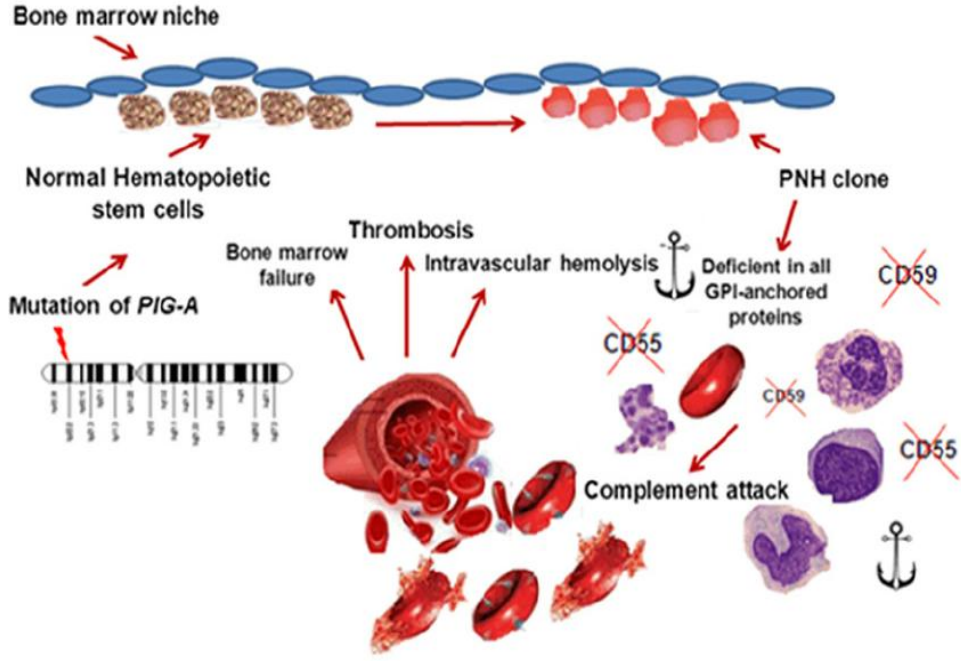
2.1. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri:

PNH, damar içi hemoliz bulguları, kemik iliği yetersizliği ve tromboz ile seyreden, edinsel klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır (1). Hastalık ilk olarak 1866 yılında William Gull tarafından tanımlanmış fakat paroksizmal soğuk hemoglobinüriyle ayırıcı tanısı yapılamamıştır. PNH hastalığını 1882 yılında ayrı bir başlık olarak Paul Strübing tanımlamıştır. Geceleri gelişen hemoglobinürinin uykuda solunumun yavaşlamasından dolayı gelişen karbondioksit ve laktik asit birikimi sonucu geliştiğini kanıtlamaya yönelik deneyler planlamıştır(6, 7).

2.1.1. Etyopatogenez:

Klasik olarak gece hemoglobinürisi ve kronik damar içi hemoliz bulguları ile kendini gösteren PNH, hematopoetik kök hücrenin edinsel, somatik bir mutasyonu sonucu oluşur. Hastalığın karakteristik bulgularından biri eritrositlerin, komplemanın hemolitik etkisine karşı duyarlı hale gelmesi ve böylece düşük pH'da intravasküler hemolizin gelişmesidir (8).

PNH hastalığında hemolizin asıl nedeni, doğal bağışık cevabın bir bileşeni olan komplement sisteminin alternatif yolağıdır(9,10). Bu sistem kişiyi patogenmikroorganizmalardan korunma işlevini oluşturur. Normal şartlarda sürekli saldırı halinde olan komplement sisteminden hücreleri koruma için bulunan proteinler hücre zarına GPI çapası ile bağlıdır(Şekil 2). Hücre zarının yüzeyinde olan CD55, CD59 bu proteinlerden ilk tanımlananlarıdır (11-14). Bu proteinlerin olmayışı kan hücrelerinin komplement sistemi karşısında savunmasız kalmasına sebep olur. Bunun sonucunda kronik damar içi hemoliz olur.

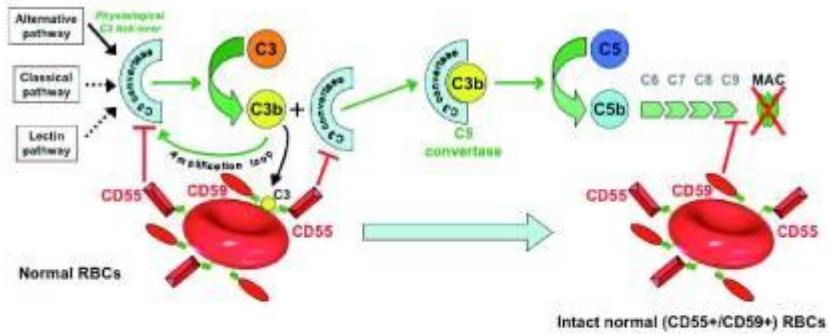


Şekil 2. PNH hastalığının patofizyolojisi(15).

X kromozomunda yer alan phosphatidylinositol PIGA geninde gerçekleşen somatik bir mutasyon PNH patofizyolojisinden sorumlu tutulmaktadır (16, 17). PIGA geni glycosyl phosphatidylinositol (GPI) proteinin kodlanmasında görev alır. GPI çapası ile hücre zarına tutunan bazı proteinler GPI-AP (Anchor Protein) (CD55, CD59) PNH'lı mutasyona uğramış hematopoetik kök hücrelerden gelişen olgun hücrelerde eksiktir. Normal hematopoetik hücreler tarafından eksprese edilen CD55 (Decay accelerating factor-DAF) komplemanın aktivasyonunu ve CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis-MIRL) komplemanın sitolitik fonksiyonunu bloke eder(10).

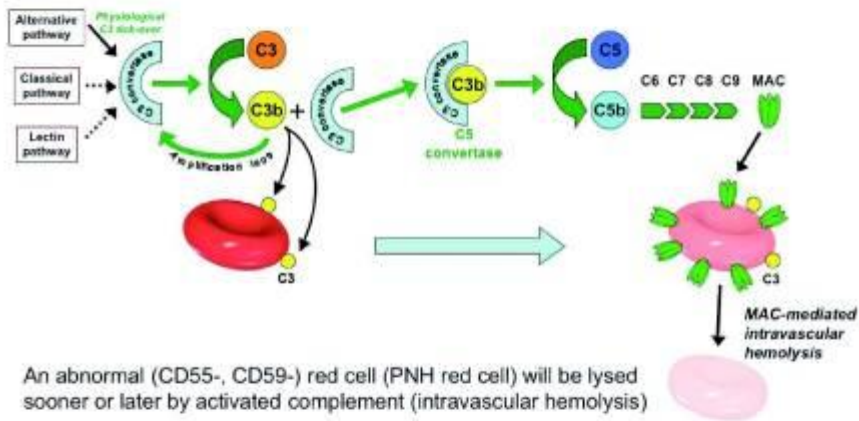
CD55 ve CD59 eksikliği olan PNH'lı hücreler komplemanın aktivasyonuna ve sitolitik etkilerine karşı koyamadıklarından intravasküler hemolize uğrarlar. Kompleman düzenleyici yüzey proteinleri (GPI-AP) olarak bilinen CD55 ve CD59'un ana işlevi C3b, C4b ve Membran Atak Kompleksi (MAK, C5b,C6, C7, C8 ve C9'un multiple molekülleri) öncelikli olmak üzere kompleman proteinleri ile ilişkiye girmek ve konvertaz enzimini parçalamaktır (Şekil 3). Bu düzenleyici proteinlerin bulunmadığı PNH hastalarında kompleman sistemi kontrolsüz şekilde aktive olarak hücre membran hasarı ve intravasküler hemolize yol açmaktadır (18-20).

A Normal, steady state



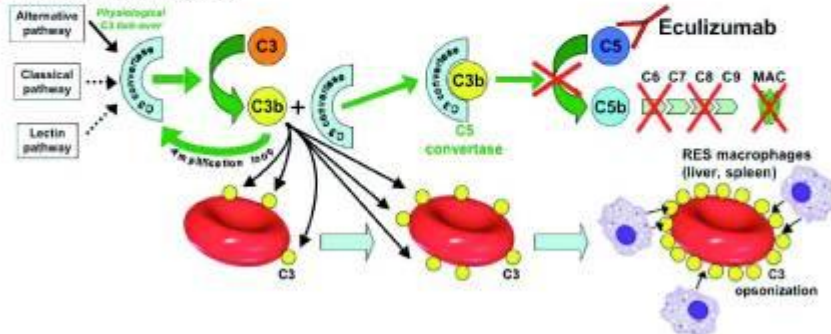
A normal (CD55+, CD59+) red cell can withstand the hazard of complement activation

B PNH, steady state



An abnormal (CD55-, CD59-) red cell (PNH red cell) will be lysed sooner or later by activated complement (intravascular hemolysis)

C PNH, on eculizumab



With C5 blocked, a PNH red cell will be protected from undergoing intravascular hemolysis, but once opsonized by C3 it will become prey to macrophages

Şekil 3. PNH hastalığında komplement sisteminin regülasyonu(21).

2.1.2. Sınıflama:

PNH başlangıç belirtileri, klinik bulgular ve doğal seyir açısından 3 alt gruba ayrılmıştır(22).

1. Klasik PNH:İntravasküler hemoliz bulguları(artmış retikülosit ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri, hemoglobinüri) ile seyreden, diğer kemik iliği anormalliklerinin bulunmadığı hasta grubudur. Kemik iliğinde normal selülarite, eritroid hiperplazi ve normal morfolojik özellikler görülür.

2. Diğer kemik iliği yetmezliklerinin eşlik ettiği PNH:Bu hastalarda klinik ve laboratuvar olarak hemoliz bulgularının yanında altta yatan bir kemik iliği anormalliği vardır. Bu gruptaki altta yatan kemik iliği anormalliği aplastik anemi(AA), myelodisplastik sendrom(MDS) ya da daha az oranda myelofibrozistir.

3. Subklinik PNH:Diğer kemik iliği yetmezliklerinin eşlik ettiği, klinik ve laboratuvar olarak hemoliz görülmeyen, küçük boyutta klonu sahip PNH alt grubudur.

Tablo 1. PNH sınıflaması

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri Sınıflaması			
PNH Tip	İntravasküler hemoliz oranı	Kemik iliği	Akım sitometrik analiz
Klasik	Belirgin	Eritroid hiperplazi	GPI-AP eksik PMN hücre oranı %50-100
Kemik iliği yetmezliği sendromu ile seyreden	Hafif	AA, RA-MDS, RCMD-MDS	GPI-AP eksik PMN hücre oranı %25-50
Subklinik	Yok	AA, RA-MDS, RCMD-MDS	GPI-AP eksik PMN hücre oranı <%25

GPI-AP: Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchor Protein, **AA:** Aplastik anemi, **RA-MDS:** Refrakter anemi-Miyelodisplastik sendrom, **RCMD-MDS:** Refrakter sitopeni çoklu seri displazi.

2.1.3. Tanı:

PNH tanısı intravasküler hemoliz bulguları içeren,kanında sferositoz olmayan, Coombs testi negatif olan her hastada düşünülmelidir. Ayrıca aplastik anemi tanısı olan her hastada tanıda PNH klonutaranmalı ve aralıklı olarak(6 ayda bir) izleme alınmalıdır. MDS hastalarında, refrakter sitopeni alt grubunda klon taramasının yapılması tartışmalı olarak önerilmektedir(23). PNH tetkiki endikasyonları Tablo 2’de özetlenmiştir(1).

Tablo 2. PNH taraması gerektiren durumlar

Tekrarlayan hemoglobinüri

Non-sferositik, Coombs negatif, intravasküler hemoliz

Aplastik anemi

Myelodisplastik sendrom-refrakter anemi ya da –multilineage displazi

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

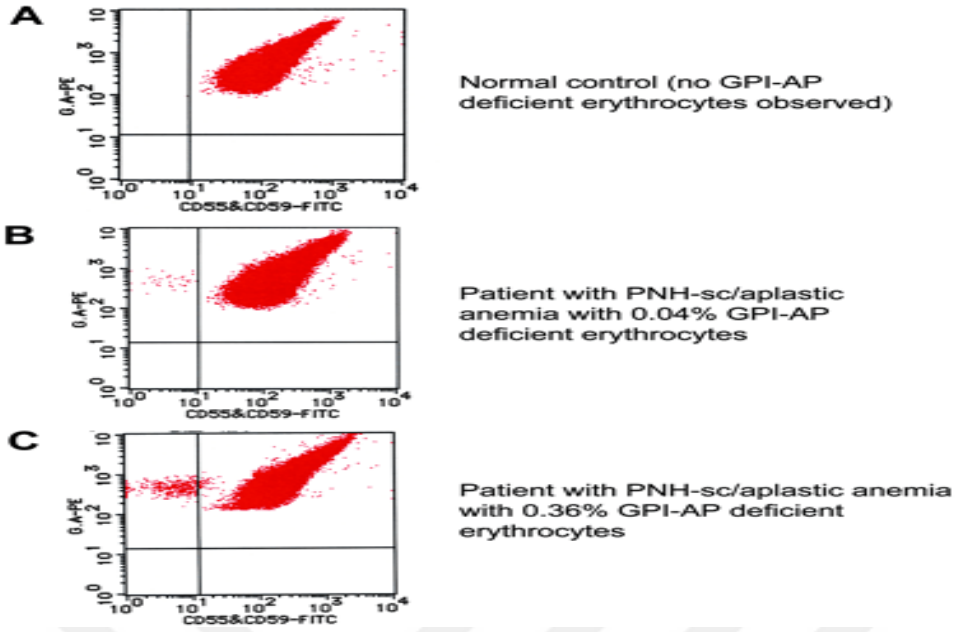
- Budd-Chiari sendromu
- Diğer abdominal bölgeler
- Serebral venler
- Deri venleri

Hastalık tanısı için günümüze gelene kadar çok farklı tetkik yöntemleri kullanılmıştır. Bunlardan ilki, hastaların yıkanmış eritrositlerinin aynı kan grubundan asitlenmiş serum ile inkübe edilmesinden kaynaklanan Ham testidir. Bu testin geliştirilmesi bir takım aşamalardan geçmiştir. Hastaların gündüz uyumasını sağlayan Strübing hemoglobinürinin uyku sonrası oluştuğunu gözlemlemiştir. Hemoliz ile uyku arasındaki ilişkiden yola çıkan Strübing, hemoglobinürinin uyku halinde solunumun ve kan dolaşımının yavaşlaması ile artan arteriyel karbondioksitin kan pH'ını azaltması nedeni ile oluştuğu sonucuna ulaşmıştır. Strübing tarafından ortaya atılan bu fikir test aşamasında başarıya ulaşmamıştır. Aynı fikri savunan Thomas H. Ham hastalara sodyum bikarbonat verilmesiyle hemoglobinemi ve hemoglobinürinin azaldığını, sodyum klorit verilmesiyle ise arttığını göstermiştir(6, 24). Sonrasında yayınladığı iki makale Ham testinin temelini belirlemiştir (25, 26). Ardından Hartmann tarafından şeker-su testi geliştirilmiştir(27).1990 yılında ilk olarak van der Schoot ve ark. tarafından önerilen akım sitometri diğer tetkiklerin önüne geçmiştir (22, 28-30). Bu teknik diğerlerine göre daha duyarlı bir test olduğu gibi kantitatif değer verdiği için aynı zamanda izlemde de kullanılabilir. Akım sitometri yöntemi ile edilen sonuçlar hastalık bulguları, oluşankomplikasyonlar ile ilgili bilgi verir. Ayrıca AA ile birlikte saptanan PNH klonunun aralıklı izlenmesi klinik yaklaşımda önemli rol almaktadır(23).

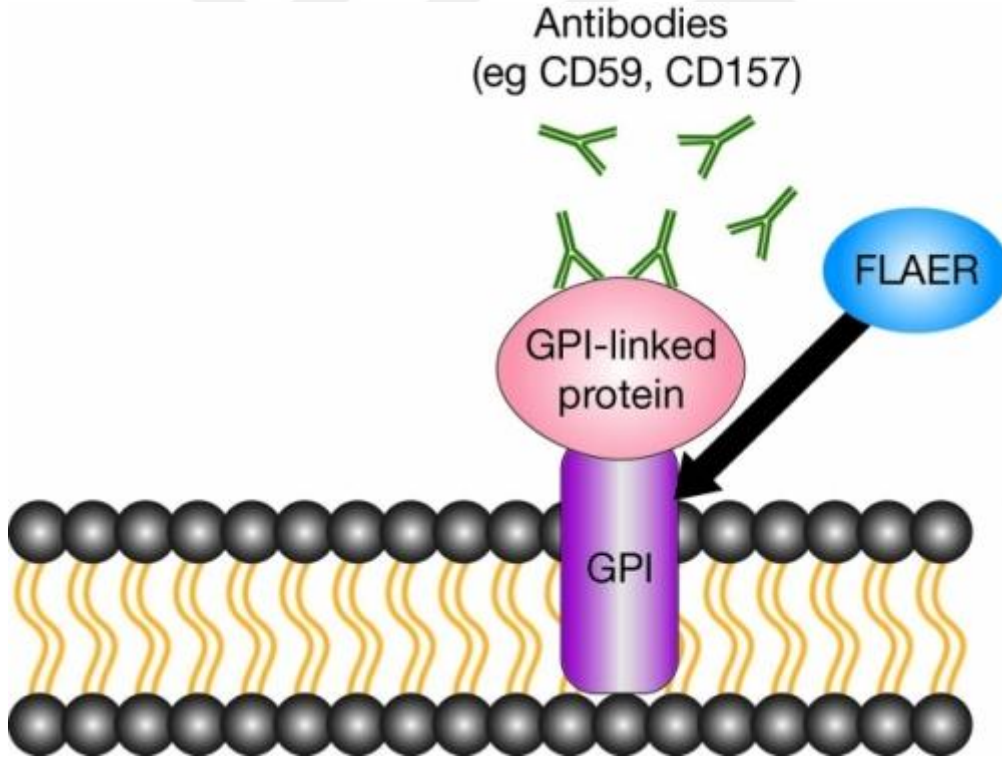
PNH hastalığına X kromozomuna bağlı PIG-A geninde oluşan mutasyonların yol açtığı bilinmektedir. Bu gende 100'den fazla mutasyon çeşidi bildirilmiştir(31-33). Hastalıkta anormal kan hücreleri monoklonal olmakla birlikte aynı hastada birden fazla mutasyon bulunabilmektedir. Bunun klinik pratikte önemi bulunamamıştır (34). Mutasyon analizi tetkiki günümüzde rutin kullanıma girmemiştir.

Akım sitometri CD55 ve CD59 eksikliğinin bulunmasında en yaygın kullanılan tanı yöntemidir. Akım sitometrisinin sık kullanımı ile birlikte PNH'lı eritrositler üzerinde GPI ile membrana bağlı bulunan CD55 ve CD59'un yokluğu gösterilmiştir. PNH klonu periferik kanda granülosit ve lenfositler üzerinde de aynı yöntemle ortaya konabilmektedir (35). Akım sitometrisi ile granülositlerdeki eksiklik daha erken (hemolizden de önce) bulunabilmektedir.

Akım sitometrik inceleme özellikle periferik kan ile yapılmalıdır. Genç hematopoietik hücrelerde GPI çapa proteinlerinin ekspresyonları az olduğundan kemik iliği örneklerinde inceleme önerilmemektedir. Akım sitometrik incelemede en yaygın kullanılan monoklonal antikolar anti-CD59 ve anti-CD55'tir (35). Akım sitometrik olarak hücrelerde CD59 (MIRL), CD55 (DAF) ekspresyonunun yokluğunun gösterilmesi tanı için önemlidir. Doğru değerlendirme için CD55 ve CD59 yüzey antijenlerinin beraber çalışılması gereklidir (36,37). PNH hastalarında serum LDH ve retikülosit sayısında artma, haptoglobulin değerinin bazı hastalarda 0 (sıfır) değerine kadar azalması, hemoglobüri ve hemosiderinüri varlığı bulunabilir. Hastalarda lökosit alkalin fosfataz düzeyi azalmıştır. Ancak bu testler PNH tanısı için spesifik olmamakla birlikte tanı koydurucu da değildir (37). PNH'da CD55 ve CD59 klonu %10'un altında olan vakalarda hemoliz görülmemekle beraber bu vakalar yakın takibe alınmalıdır (38). GPI antijenleri için en uygun belirleme yöntemlerinden biri FLAER'dir. FLAER oldukça yüksek sensitiviteye sahiptir. %0.01 oranındaki PNH klonlarını belirleyebilir. Diğer bir avantajı ise anormal ve normal kan elemanları ayırımını çok belirgin yapması ve lizise sebep olmamasıdır (23).



Şekil 4. Eritrositlerin yüksek-sensitif akım sitometrik analizi (22).



Şekil 5. FLAER yöntemi ile PNH klonunun saptanması (39)

2.1.4. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobininüri ve Tromboz:

PNH hastalığında en önemli mortalite sebebi tromboembolik olaylardır(2, 19, 40-41). Genellikle klasik tipte gelişen bir komplikasyon olmakla birlikte Peffault de Latour ve ark. tarafından değerlendirilen hasta serisinde AA/MDS PNH hastalarında da anlamlı oranda belirlenmiştir (42).

Trombozun nedeni olarak ortaya çıkan görüşlerden biri endotel hücrelerinin bu olayda üstlendiği roldür. Eritrositlerin hemolizi sonucu ortama çıkan serbest hemoglobin ve yıkıma uğrayan monositlerden salınan mikropartiküllerin(örneğin doku faktörü) endotel hücrelerine direkt zarar verebileceği bilinmektedir (43). Yapılan araştırmalarda bunu destekleyen veriler bildirilmiştir (44-48). Endotel hücrelerinin tromboz patogenezindeki rolü ile ilgili bir başka iddia bu hücrelerin de kan hücreleri gibi PIG-A mutasyonu nedeniyle hasarlı olduğu ve komplement ilişkili yıkıma karşı savunmasının olmadığı görüşüdür. Endotel öncül hücrelerinin kemik iliğinden köken aldığı bilinmektedir (49). PNH hastalarında endotel koloni oluşturan hücrelerde(ECFC) CD55 ve CD59 yokluğunu gösteren ve MDS hastalarında kanda dolaşan endotel hücrelerinin hematopoetik öncül hücrelerle benzer sitogenetik özellikler gösterdiğini bildiren çalışmalar bu iddiayı desteklemektedir (48, 50). Bunla beraber allojenik nakil yapılan hastalarda verici tipi endotel hücrelerini araştırdıkları çalışmalarında Mueller ve ark. endotel hücrelerinin çok az bir kısmının vericiden kaynaklandığını belirtmişlerdir (51). Başka bir araştırmada ise, karaciğer nakli hastalarında alıcı tipi, kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerinin özellikle karaciğerde(diğer organlardan farklı olarak) çoğaldığı bildirilmiştir (52). PNH hastalığında trombotik hadiselerin belirli bölgelerde(özellikle intraabdominal venlerde ve en sık hepatik vende) daha sık görüldüğü de düşünülürse GPI eksikliği olan, kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerinin trombozda rol aldığı sonucu ortaya çıkarılabilir.

PNH hastalığında tromboz oluşum mekanizması ile ilgili başka bir görüş ise, pıhtılaşma yolu inhibitörlerinden olan doku faktörü yolağı inhibitörü(TFPI) ve proteinaz 3(PR3) eksikliğinin tromboza sebep olduğu yönündedir. Her iki protein de hücre zarına GPI çapası ile bağlanır (53-55). Aynı zamanda Jankowska ve ark. çalışmalarında GPI eksikliği olan nötrofillerde PR3 olmadığını ve dolaşımdaki PR3 miktarının PNH granülosit klon boyutu ile ters orantılı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada PR3 ile trombosit etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir(56).

Damar içi hemoliz serbest hemoglobinin ortaya çıkmasına sebep olur. Prooksidan etkisi bulunan serbest hemoglobin direkt endotel hücrelerine toksik etki oluşturur. Ayrıca nitrik oksit(NO) ile bağlanarak doku düzeyinde NO'nun azalmasına sebep olur. NO düz kas gevşemesi, trombositlerin inhibisyonu ve antiinflamatuvar etkiden primer sorumludur. Bu nedenle NO eksikliği tromboza eğilim oluşturmaktadır (43, 44).

Trombositlerin kontrolsüz şekilde uyarılması bir diğer olası sebeptir. Trombosit yüzeyinde normalde varolan CD55 ve CD59, PNH klonu taşıyan trombositlerde bulunmamaktadır(57, 58). PNH hastalarında trombosit yaşam süresinin değişmediğini bu nedenle trombositlerin komplement sistemi tarafından yıkılmadığını gösteren araştırmalar bulunmaktadır (59, 60). Bu bilgiler PNH hastalığında trombositopeninin sebebinin kemik iliği yetmezliği olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Komplement sistemi tarafından CD59 aracılığı ile uyarılan trombositlerden protrombinaz salınımının artması, bu GPI çapa proteininin eksikliğini protrombinaz yetersizliğine ve sonuç olarak tromboz oluşumuna eğilim oluşturduğunu düşündürmektedir(61). Wiedmar ve ark.da trombositlerin membran atak kompleksi(MAC) ile uyarıldıklarında yüzeylerinde daha fazla faktör 5 bağlanma bölgesi geliştiğini ve trombin üretimini arttırdıklarını bildirmişlerdir (62).

Komplement sisteminin GPI bulandırmayan hücreleri uyararak prokoagulan mikropartiküller salınmasına yol açması başka bir hipotezdir(44). Yine Wiedmar ve ark. tarafından yapılan çalışmada MAC uyarısı ile PNH klonu taşıyan trombositlerin normal trombositlere göre daha çok mikropartikül salgıladığını bildirmişlerdir (62). Sonuç olarak komplement uyarısı ile salınan mikropartiküllerin trombozu tetiklediği de akla gelmektedir.

Fibrinoliz ve antikoagülasyonun engellenmesi de tromboza yol açabilir (44). Ürokinaz plazminojen aktivatör(u-PA) reseptörüne(u-PAR) bağlanarak plazminojeni plazmine dönüştürür. Böylece fibrinolizde görev alır. PNH hastalığında lökositlerde ve trombositlerde u-PAR eksiktir(63, 64). Diğer fibrinoliz inhibitörleri olan α 2-antiplazmin, plazmin-antiplazmin (PAP) kompleksleri, plazminojen aktivatör inhibitör-1(PAI-1) ve fibrinolizi tetikleyen doku tipi plazminojen aktivatörü(tPA) PNH hastalarda normal düzeylerde bildirilmiştir (48, 65).

PNH hastalığında tromboz beklenenin dışındaki bölgelerde oluşur. Sıklıkla intraabdominal, intrakranyal bölgelerde belirlenir. En sık hepatik vende (Budd-Chiari Sendromu) tromboz görülür(41, 42, 44, 66).

Hastalarda mortalite ve morbiditede önemli yere sahip olan bu komplikasyonun sıklığının artan klon boyutu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (40-42, 67). Bu sebeple büyük klona sahip hastalarda(granülosit klon boyutu>%50) warfarin ile primer profilaksi önerilmiştir. Fakat bu yaklaşım da hastaların hepsinde trombozu önlemekte yeterli değildir(41). Ekulizumab komplement kaskadında görevli olan C5'i bloke eden bir tür monoklonal antikordur. Ekulizumab PNH hastalarında tromboembolik komplikasyonların riskini azalttığı bilinmektedir (68, 69).

2.1.5. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri ve Akut Lösemi:

Bir klonal kök hücre hastalığı olan PNH seyri sırasında akut lösemi gelişebilmektedir. Bu komplikasyonun sıklığı bir seride %1 olarak gösterilmiştir (70). Literatürde bildirilmiş vakalar mevcuttur (71-75).

2.1.6. Tedavi:

Tablo 3. PNH tedavi endikasyonları

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüride Tedavi Endikasyonları
Tromboz varlığı
Transfüzyon bağımlı hemolitik anemi
İleri derecede güçsüzlük ve sık gelişen düz kas spazmı (yutma güçlüğü, karın ağrıları).
Böbrek yetmezliği ve pulmoner hipertansiyon gibi PNH'ya bağlı organ hastalarının varlığı

PNH hastalığına yaklaşımda ilk temel ilke destek tedavisi ve komplikasyonların(tromboz, akut lösemi) tedavisidir. PNH klon sayısı %10'un altındaki asemptomatik veya hafif semptomları bulunan hastalarda herhangi bir tedavi verilmeden klon büyüklüğü ve progresyon açısından 6–12 ayda bir takip edilmesi uygundur. PNH'da küratif tedavi Allojeneik hematopoetik kök hücre nakli (AKHN)'dir. AKHN mortalite ve morbiditesi yüksek bir tedavi yöntemidir. PNH tedavisinde kompleman inhibitörü olan Ekulizumab'ın kullanılması bu vakaların AKHN ihtiyacını epeyce ortadan kaldırmıştır. PNH'da heparin ve warfarin profilaksisi

trombozu önlemek için yararlı ise de yetersizdir (38). Yapılan çalışmalar aspirin profilaksisinin etkinliğinin olmadığını bildirmektedir (76). PNH hastalarında tromboz geliştiğinde uygulanacak antikoagulan tedavi klasik tedavi ile aynıdır (18). Ancak bu hastalarda trombositopeninin bulunması antikoagulasyon için bir risk faktörüdür. Trombosit sayısı $50 \times 10^9/l$ 'nin üstünde olan hastalarda INR düzeyi 2.0-3.0 arasında tutacak şekilde oral antikoagulan tedavi verilmelidir (35). PNH'lı hastalarda devamlı bir intravasküler hemoliz olduğu için; hemoglobinüri ve hemosiderinüri sebebiyle ciddi bir demir kaybı oluşabilir (77). Bu sebeple demir tedavisinin PNH klon sayısını arttırarak hemolitik atakları uyardığı yönünde çalışmalar olsa da özellikle oral olarak demir desteği gerekli olabilir. Ön planda hemoliz ile seyreden olgularda kemik iliğinde yıkım ve yapım arttığından bu hastalar için folik asit desteği uygun bir yaklaşım olur. Hem kofaktör olarak anemik hastaların hiperplastik olan kemik iliğinde kullanılması sebebiyle hem de eksikliğin önlenmesi amacıyla folik asit desteği de verilmelidir. PNH'da semptomatik anemi mevcutsa; periyodik kan transfüzyonları, eritropoezi stimüle eden ajanlar, androjenler ve glukokortikoidler anemi derecesi ve semptomlarını azaltmak açısından yarar sağlarlar (38). Eritrosit transfüzyon desteği PNH hastaları için önemlidir ve dönem dönem transfüzyon gerekebilmektedir (36).

Hastalığın etyopatogenetik temelini oluşturan komplement sistemi üzerine bilinen bir etkisi olmayan steroid tedavide kullanılmaktadır. Steroid tedavisinin etkili bir yöntem olduğu yönünde bir kanıt bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda bu ilacın tedavideki yerini destekler yönde sonuçlara ulaşılamamıştır (22, 78-81). Bununla beraber yan etkileri de ele alındığında steroid tedavisinin PNH tedavisinde etkin ve yararlı bir yaklaşım olmadığı sonucuna ulaşılabilmektedir.

Klasik PNH'da kortikosteroid dışında immunosupresif tedavinin yeri bulunmamaktadır. Ancak klasik PNH'lı hastaların izlemi sırasında aplastik anemi gelişebileceği akılda tutulmalıdır. İzlem sırasında hemolizi kontrol altına alındığı halde sitopenileri düzelmeyen hastalarda kemik iliğinde hiposellülarite bulunursa aplastik anemide olduğu gibi immunosupresif tedavi verilebilir. Eritropoietin tedavisi PNH klonunun artışı da uyararak hemolizin artmasına neden olabilmektedir. PNH tedavisinde böbrek yetersizliği olmadıkça yararı gösterilememiştir (35).

Androjen tedavisinin yararını gösteren çalışmalar mevcuttur (81, 82). Karaciğer toksisitesi, prostat hipertrofisi, virilizasyon gibi yan etkileri bulunmaktadır. Tedavi süresince karaciğer testlerinin izlemi önerilmektedir.

PNH hastalığı komplement ilişkili hemolizin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Monoklonal antikor olan ekulizumab komplement sisteminin alternatif yolağında görevli C5'i bloke eder. Ekulizumab tedavisinin hastalığın tedavisinde etkin olduğunu ve tromboz komplikasyonunu engellediğini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır(68, 69, 83-86). Ekulizumab komplement sistemini engellediği için tedavi alan hastalarda kapsüllü mikroorganizmalara karşı bağışık yanıtta yetersizlik mevcuttur. Bu hastalarda özellikle meningokok enfeksiyonu riski artmıştır. Bu nedenle hastalara tedavi başlamadan önce aşı yapılmalıdır.

AKHN küratif tedavi seçeneğini oluşturmaktadır. Etkin ama yan etkileri sebebi ile yüksek mortalite riski taşıyan bir tedavidir. Myeloablatif ve non-myeloablatif hazırlama rejimlerinin her ikisi ile de iyi sonuçlar alındığı gösterilmiştir (87-91). Peffault de Latour ve ark. tarafından 211 hasta ile yapılan bir çalışmada tromboz öyküsü bulunan olguların daha yüksek mortalite riski taşıdığı bildirilmiştir(87).

2.2. Habituel Abortus

Spontan abortus, gebelikte görülen en sık komplikasyondur. İnsanlarda gebeliklerin yaklaşık %70'i canlılık kazanamaz ve yaklaşık % 50'si ilk geciken menstrüel dönemden önce kaybedilir. Bu gebelik durumu çoğu zaman farkedilmez. Son menstrüel dönemden sonra, klinik olarak farkedilen gebeliklerin %15'i 20 haftadan önce kayıp edilir. HA, kadınların tümünün %1-3'ünü etkileyen bir durumdur (92).

Spontan abortus, 20. gebelik haftasından önce veya fetal ağırlık 500 gr.'ın altında iken gebeliğin istemsiz sonlanması olarak bilinir. Spontan ardarda 2 veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanan HA gebeliklerin %1-3'ünde görülür (93). Bazı kaynaklarda HA arka arkaya 3 veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır (94). Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından yapılan yeni tanımlamalara göre ise bu sayı en az 2 veya daha fazla abortus olarak değerlendirilmiştir ve hastaların 2 abortustan sonra tekrar yeni bir travma yaşamamaları için araştırma yapılmasını önermiştir (95).

Altta yatan çok farklı nedenler bulunmakla birlikte HA öyküsü olan vakaların %50'sinde belirgin bir neden bulunamamaktadır ve hiçbir tedavi verilememesine rağmen bu vakaların % 70-75'inin sonra başarılı bir gebelik elde etmeleri dikkat çekicidir (96). HA'nın etyolojisinde genetik, anatomik, endokrin, enfeksiyon, çevresel ve immünolojik faktörler bulunmaktadır (97). Gebelik, doğal antikoagülanların azalması ve koagülasyona neden olan faktörlerin artması nedeniyle koagülasyona yatkınlık yaratan bir durumdur. Bununla birlikte pıhtılaşma bozuklukları HA'nın ortalama % 55-62'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kan proteinleri ya da trombosit bozukluklarının, kanamaya veya pıhtılaşmaya yatkınlık yaratarak iki ayrı mekanizma ile HA'ya yol açtığı bilinmektedir. Trombotik bozukluklar, kanama bozukluklarına göre HA'ya daha fazla yol açmaktadır (98). Trombofili, hastanın tromboza eğilimini artıran bir durum olup uteroplental damarlarda trombozlarla seyrederek ve fetomaternal beslenmeyi etkileyerek intrauterin gelişme geriliği, preeklampsi, dekolman plasenta ve tekrarlayan gebelik kayıplarına sebep olmaktadır (99).

2.2.1 Habituel Abortus Nedenleri

HA etiyolojisi çok çeşitli ve aynı zamanda tartışmalıdır. Genelde birden fazla etyolojik faktör saptanmaktadır, bunlardan en sık rastlananlar tablo 4 de listelenmiştir.

Tablo 4. HA'da etyolojik faktörler

Habituel abortusta etyolojik faktörler	
Genetik dengeli parental translokasyonlar	Endokrin
Mendelyan	Luteal Faz Defekti
Multifaktöryel	Diğer endokrin hastalıklar
Diğer	Antitiroid antikolarlar
Robertsonyan	Artmış LH sentezi
Resiprokal	Enfeksiyöz
Uterin Konjenital Anomaliler	Hematolojik
Mülleryan anomali	Çevresel
Dietilstilbestrol'a bağlı	
Kazanılmış defektler	
Iyatrojenik	
Uterin septum	
Hemiuterus	
Asherman Sendromu	
Çift uterus	
Servikal yetmezlik	
Leiomyomlar	
İmmün-otoimmün	
Alloimmün	
Hümmoral immünite ile ilgili	
Hüccresel immünite ile ilgili	

2.2.2 Habituel Abortus ve Trombofili

Hamilelik koagülasyon eğiliminde artışa yol açan bir durumdur. Hemostazın evrimsel değişiminin avantajı insan için benzeri olmayan hemokoryal plasenta ile alakalı doğal kararsızlığı önlemektir. Tromboemboli antepartum ve postpartum anne ölümlerinin öncelikli sebebidir. Hemostatik sistemin hem gebelik oluşturulması hem de bakımında önemli bir rol aldığı görülmektedir. Bazı yazarlar trombotik eğilimler ve HA arasında bir ilişki bildirmişlerdir. Fetal kayıp için önerilen mekanizmalar trombolitik sistemin engellenmesini, plasental tromboz, plasental enfarktüs, anormal prostasiklin

metabolizmasını ve direkt sitotoksik etkileri içine alır (100). Maternal intervillöz kan akımı gebeliğin 8. haftasından önce önemli ölçüde oluşmadığı göz önüne alındığında, birinci trimester abortuslarında trombofilik kusurların teorik rolü bazıları tarafından sorgulanmıştır. Trombofili ve erken tekrarlayan gebelik kaybı arasında belirgin bir ilişki doğrudan kurulmuştur. Gebelik ile hiperkoagülebilirlik patofizyolojisi hamilelik süresince yaygın damar içi pıhtılaşmada ilerleyici bir durumu kapsamaktadır. Pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu, plasentada artan trombin üretiminin kaynağı olan uteroplazental dolaşım seviyesinde başlatılmaktadır. Trombosit aktivasyonu ve artmış trombosit yıkımı normal biçimde oluşur ve gebe kadınların yaklaşık %10'unda hafif trombositopeni mevcuttur. Aynı zamanda, fibrinolitik sistem plasental plazminojen aktivatör inhibitör tip 2 tarafından sürekli olarak engellenmektedir. Bacaklarda ve gebe uterusunda protrombotik mekanik ve kan akımı değişiklikleri de birlikte olmak üzere vasküler durağanlık gelişmektedir. Genel etki tromboz riski artışı ile olan bir hiperkoagülebilirlik durumunun gelişmesidir.

Gebelikte birlikte antitrombin eksikliği ve aktive protein C direnci olan kişilerde, daha sık venöz tromboz gelişebilir. Oral kontraseptif kullanımı ile antitrombin ve protein S düzeylerinde azalma meydana gelir. Gebelik sırasında aktive protein C direnci, fibrinojen ve faktör II, VII, VIII, X ve XII'de artma olurken protein S düzeylerinde azalma meydana gelir. Bu net değişim pıhtı oluşumunu, uzamasını ve stabilitesini arttırmaktadır.

Hamile olmayan HA olan kadınların da protrombotik durumu olabilir. Bu kadınların trombin antitrombin kompleksi daha yüksek düzeydedir ve bunlar pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu için endotelin kronik uyarıcısı halindedir. 4-7 hafta arasında aşırı tromboksan üretimi bildirilmiştir ve 8 ila 11 hafta arasında, bu kadınların prostasiklin düzeyleri HA öyküsü olmayan kadınlara kıyasla daha düşüktür.

Trombofilinin genel olarak kabul görmüş bir tanımı mevcut değildir. Yıllar boyu bu terim tromboza eğilim yaratan hemostaz hastalıklarını tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Daha sonraları genetik veya akkiz tromboz gelişimine yatkınlık oluşturan faktörlerin ortaya konması ile bu terim tromboz gelişimine eğilim olarak kullanılmaya başlanmıştır. Olumsuz gebelik öyküsü olan kadınlarda pıhtılaşma bozukluklarının prevalansının ilk çalışmaları 1990'ların ortalarında ortaya çıkmıştır (101). Sık rastlanan

üç trombofilik mutasyon tespit edilmiştir: Faktör V (Leiden) G1691A; faktör II (protrombin) G20210A ve metilentetrahidrofolat redüktaz C677T mutasyonlarıdır. O zamandan itibaren pek çok yayın bireysel tekrarlayan HA öyküsü olan kadınlarda koagülasyon defektlerinin kontrol gruplarından daha sık olduğunu bildirmişlerdir. En sık trombofilisi ile ilişkili obstetrik komplikasyonlar abortus, ölü doğum ve ablasyo plasentadır. Erken ve tekrarlayan fetal kayıp insidansında Faktör V Leiden eksikliği, aktive protein C direnci, protrombin G20210A ve protein S eksikliği gibi herediter trombofilisi olan kadınlarda artış olduğu ortaya atılmıştır ancak, diğer yazarlar maternal trombofilisi ile 10. haftadan önceki abortus arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (102). Oysa başka bir çalışmada partnerlerin birden fazla genetik trombofilik mutasyonların bir sonraki gebeliğin abortus ile sonuçlanma riskini artırdığı bildirmiştir (103).

Bireysel genetik trombofilik bozukluklar gebelik sonucunu tahmin etmede az bir değere sahip olduğundan, tekrarlayan düşük olan kadınların değerlendirmek için hemostatik fonksiyonunun sözde küresel markırları kullanılmaktadır. Bu testler HA öyküsü olan kadınların gebelik dışında bir protrombotik durumda olduğunu göstermiştir. Araştırmalar, protrombotik durumun sadece uteroplazental damar trombozuna ve sonraki fetal kaybına yol açan gebelik sırasında abartılı bir hemostatik yanıt ile sonuçlanmadığını (101,104) ve daha sonra da hayatında iskemik kalp hastalığı riskinin arttığını bildirmişlerdir (105). Farelerdeki in-vitro çalışmalar trombozun trombofilik kusurları olan kadınlarda reproduktif yetmezlik için tek mekanizma olmadığını ortaya koymaktadır. Mürin trofoblastları pıhtılaşmayı destekleyen (doku faktörü) ve engelleyen (trombomodülin) birçok glikoproteinlerini eksprese edmektedir. Isermann ve arkadaşları trombomodülin eksikliği olan embriyoların fetal kaybının fetomaternal arayüzde, kan koagülasyon kaskadının doku faktörü ile başlatılan aktivasyonun neden olduğunu göstermişlerdir (106). Kan koagülasyon kaskadı, (a) trofoblast apoptosisini arttırmak için aktive edilmiş bir proteaz reseptörler sinyal yoluyla ve (b) trofoblastların apoptozu hızlandıran fibrinojen yıkım ürünlerinin üretimini stimüle ederek aşırı trombin oluşumuna sebep olur (106).

En sık kalıtsal trombofililer faktör V Leiden (G1691A) mutasyonu, faktör II protrombin mutasyonu (G20210A) ve MTHFR C677T ve A1298C gen mutasyonu'dur. Olumsuz gebelik sonuçları ile ilişkili en sık edinsel hiperkoagülabilité

faktörleri ise antifosfolipid antikorları, aktive protein C direnci ve hiperhomosisteinemidir. HA ile ilişkili olan hiperkoagülabilité durumuna neden olan diğer olası anormallikler; antitrombin eksikliği, protein C eksikliği, protein S eksikliğidir. Bütün bu birinci ve ikinci hiperkoagülabilité halleri venöz tromboz ile ilişkilendirilmiştir. Arteriyel tromboz hiperhomosisteinemi, AFAS ve lupus antikoagülan ile birlikte bildirilmiştir. Trombofilik durumlarının kombinasyonu HA riskini artırdığı bilinmektedir (101).

Tablo 5. Trombofili sınıflaması

Hereditör Trombofililer	Akkiz Trombofililer
Aktive Protein C Rezistansı (APCR)	Antifosfolipid sendromu
FV Leiden mutasyonu	Fizyolojik/Trombojenik durumlar
Protein C ve Protein S sistemindeki anormallikler	(gebelik, travma, ileri yaş,..)
Protein C eksikliği	Diğer (malignansi, nefrotik sendrom, hiperlipidemi, PNH,..)
Protein S eksikliği	
Anormal trombomodulin	
Antitrombin III eksikliği	
Protrombin gen mutasyonu	
Hiperprotrombinemi	
Disfibrinojenemi	
Hiperhomosisteinemi	
Fibrinolitik sistemde anormallikler	
Faktör XII eksikliği	

3.MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya hasta grubu olarak Hematoloji polikliniğine 21/07/2016 - 05/11/2016 tarihleri arasında başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden, yaşları 18-55 yaş arasında değişen, toplam 150 (yüz elli) nedeni bilinmeyen, kadın doğumsal nedenlerin dışlandığı habitüel abortus hastası dahil edildi. Kontrol grubu olarak ise başka nedenlerle polikliniğine başvuran habitüel abortus öyküsü olmayan 18-55 yaş arası 150 (yüz elli) kadın hasta dahil edildi.Çalışma prospektif,kontrollü ve tek merkezli olarak yapıldı.Tüm katılımcılardan çalışmaya katılırken yazılı onam belgesi alındı. Çalışmaya başlamadan önce Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, çalışmanın yapılabilmesi için gerekli etik kurul onayı alındı.

Çalışma grubunu oluşturan kadınları habituel abortus olarak kabul etmek için 20. gebelik haftasından önce 2 veya daha fazla spontan düşük yapmış olması kabul edildi (95). Kontrol grubu olarak aynı yaş grubundan habituel abortus öyküsü ve sistemik hastalığı olmayan sağlıklı kadınlar çalışmaya dahil edildi.Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri arasında; tekrarlayan gebelik kaybına neden olabilecek uterin anomali varlığı, kronik sistemik hastalık varlığı, antifosfolipit ve antikardiyolipin antikorları varlığı kabul edildi.

3.1.Çalışma Protokolü:

Çalışma grubundaki kadınların anamnezlerini takiben fizik muayeneleri yapıldı. Hastaların yaşı, gebelik, parite sayıları, düşük sayıları, tekrarlayan düşüklerin gebelik haftası, jinekolojik öyküsü, geçirilmiş operasyonlar, sistemik hastalık varlığı(Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı, otoimmün hastalıklar, vs), kanama diyatezi veya trombozu şüphelendiren semptomlar ve eşi ile akraba evliliği sorgulandı.

Venöz kan antekübital venden alındı. Her iki gruptaki hastalardan rutin hemogram ve biyokimya tetkikleri yapıldı.

3.2.Serum Ölçümleri:

Çalışmaya alınan hastaların PNH klonu FLAER yöntemiyle hastanemiz Hematoloji BD Akım Sitometri Laboratuvarında bakıldı. PNH klonunun tespiti için aşağıda detaylı olarak anlatılan yöntem kullanıldı.

Üzerinde hastaların kişisel bilgileri bulunan Etilendiamintetraasetik asit'li (EDTA) tüpe 2 ml kan alındı.

Granülositler için; boş bir tüpe 50 µL kan aktarıldı. Bu kanın üstüne anti-monoklonal antikor agonisti CD24'ten 10 µL (PE mauseantihuman 24, BD Pharmingen® Ref:555428),CD45'ten 5 µL, CD15'ten 5 µL veFLAER'den 5 µL (Alexa 488 labeled, Cedarlane® Lot:1606-2A) aktarıldı.Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 1/9 oranında dilüe edilmiş BD-FACS lysing solusyondan 450 µL aktarıldı. Daha sonra lizis olması beklendi. Sonrasında numune Flow Sitometri'de (FSM) BD marka FACS Catto II model cihazda okutuldu. Flow Sitometri'de FSC-SCC dotblot'unda FLAER'e karşılık CD24 grafiğinde negatif kısım PNH klonunu, ortak pozitifkısım ise normal hücreleri gösterdi. Tüm sahada 50.000 hücre okutuldu.

Monsitler için;boş bir tüpe 50 µL kan aktarıldı. Bu kanın üstüne anti-monoklonal antikor agonistiCD14'ten 5µL (MΦPG- PE, BD® Ref:345785),CD45'ten 5 µL, CD64'ten 5 µL ve FLAER'den 5 µL aktarıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 1/9 oranında dilüe edilmiş BD-FACS lysing solusyondan 450 µL aktarıldı. Daha sonra lizis olması beklendi. Sonrasında FCM BD marka FACS Catto II model cihazdaCD64 pozitif olan monosit sahada 5.000 hücre okutuldu.CD14 ve FLAER ortak pozitif kısım normal popülasyonu, ortak negatif kısım ise PNH klonunu gösterdi

Eritrositler için; numuneden 5 µL kan alındı. Üzerine 495 µL PBS (0,01M Ptasyum Fosfat, 0,15 M Sodyum Klorid, 500 ml distile su karışımı) eklendi. Bu karışımdan boş bir tüpe 50 µL aktarıldı. Bunun üzerine anti-monoklonal antikor agonistiCD59'dan 0,5 µL (R-PE Conjugate, İnvitrogen®, Ref:MHCD59044), CD55'den 0,5 µL (CD55-FITC, BecmanCoulter®, Lot:13)ve CD235a'dan 3 µL eklendi. Bu karışım oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1 ml PBS eklenerek 2000 rpm ve 25 °C de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant atıldı. Bu işlem ikinci bir defa daha tekrarlandı. Daha sonra altta oluşan çöküntünün üzerine 500 µL PBS eklenerek agregasyonun önlenmesi amacıyla tüp 20 defa pürüzlü bir

yüzeye sürüldü. FCM BD marka FACS Catto II model cihazda 100.000 hücre okutuldu.FSC-SCC dotblot'unda eritrosit kapılandı. Kapı SCC-235a'ya tanıtılarak CD235a pozitif kapılandı. Agregat kapılanıp ayrıldı ve bu kapıda 235a CD59'a tanıtıldı. Burada 235a pozitif CD59 negatif kısım Tip III PNH klonunu ve bunun yanındaki bölge (102-103) ise Tip II PNH klonunu gösterdi. CD235a ve CD59 pozitif bölge ise normal eritrosit popülasyonunu gösterdi. Aynı durum CD59 yerine CD55 için de tekrarlandı



3.3.Çalışma formu

Ad-Soyad:

Yaş:

Tel:

ÖZGEÇMİŞ:

Gebelik Sayısı:

Parite Sayısı:

Düşük Sayısı:

DM:

HT:

HL:

Diğer Sistemik Hast:

KAH:

Akraba Evliliği:

Tromboz Öyküsü:

BİYOKİMYA:

Hb:

MCV:

WBC:

PLT:

Fe:

TDBK:

Ferritin:

T.Bil:

İ.Bil:

LDH:

Flowsitometri:

3.4.İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS for Windows versiyon 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) hazır paket program kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak, devamlı değişkenler ortalama \pm standart sapma, minimum ve maximum olarak belirtildi. Bu değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Pearson korelasyon katsayıları hesaplandı. Gruplar ile kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede ise Ki-kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve biyokimya sonuçları tablo 6'da gösterilmiştir. Hasta grubunun Hb, Fe, Ferritin, LDH değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.02$, $p=0.001$, $p=0.02$). Yaş, MCV, WBC, PLT ve TDBK değerleri açısından hasta grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.27$, $p=0.22$; $p=0.69$, $p=0.57$, $p=0.56$). T.bil., İ.bil. değerleri ise hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.001$).

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve biyokimya sonuçları

Parametreler	Hasta(Ortalama±SS)	Kontrol(Ortalama±SS)	P değeri
Yaş (yıl)	28,97±6,45	28,05±7,37	0,274
Hb	13,34±1,56	12,96±0,93	0,01
MCV	84,34±7,04	83,50±4,50	0,221
WBC	7357,82±1895,70	7435,33±1514,01	0,697
PLT	271,28±68,24	275,89±71,51	0,576
Fe	73,90±32,17	65,92±25,65	0,02
TDBK	376,04±63,31	379,73±44,49	0,560
Ferritin	37,94±22,73	27,00±16,72	0,001
T.bil	0,60±0,34	0,82±0,26	0,001
İ.bil	0,36±0,23	0,49±0,30	0,001
LDH	203,39±70,63	189,27±24,61	0,021

Hasta grubunda yaş ile Hb ve Ferritin değerleri arasında negatif yönlü anlamlı ilişki saptandı (sırasıyla $p:0.012$, $p:0.049$; $r:-0.220$, $r:-0.192$). Kontrol grubunda ise yaş ile T.bil. değeri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon mevcuttu ($p: 0.009$; $r:-0.259$) (Tablo 7).

Tablo 7.Hasta ve Kontrol GruplarındaYaş ile Hb,Ferritinve T.bil değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
Yaş - Hb	p :0.012 r : -0.220	p : 0.211 r :-0.105
Yaş - Ferritin	p :0.049 r : -0.192	p : 0.169 r :-0.120
Yaş – T.bil.	p : 0.189 r :-0.192	p : 0.009 r :-0.259

Hasta grubunda Hb ile MCV, Fe, Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p : 0.006$; $r : 0.519$, $r : 0.332$, $r : 0.248$) ; TDBK ve LDH değerleri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $p < 0.001$, $p : 0.004$; $r : -0.321$, $r : -0.235$). Kontrol grubunda ise Hb ile MCV, WBC, Fe, Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla $p < 0.001$, $p : 0.036$, $p < 0.001$, $p : 0.001$; $r : 0.514$, $r : 0.172$, $r : 0.514$, $r : 0.276$); TDBK ve LDH değerleri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $p < 0.001$, $p : 0.009$; $r : -0.432$, $r : -0.213$) (Tablo 8).

Tablo 8. Hasta ve Kontrol Gruplarında Hb ile MCV, WBC, Fe, TDBK, Ferritin, LDH değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
Hb - MCV	p<0.001 r :0.519	p<0.001 r :0.514
Hb - WBC	p : 0.192 r :0.108	p : 0.036 r :0.172
Hb - Fe	p<0.001 r :0.332	p<0.001 r :0.514
Hb - TDBK	p<0.001 r :-0.321	p<0.001 r :-0.432
Hb - Ferritin	p : 0.006 r :0.248	p : 0.001 r :0.276
Hb - LDH	p : 0.004 r :-0.235	p : 0.009 r :-0.213

Hasta grubunda MCV ile Fe, Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla $p<0.001$, $p: 0.005$; $r: 0.291$, $r: 0.249$) ; TDBK ve PLT değerleri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p: 0.032$; $r: -0.481$, $r: -0.181$). Kontrol grubunda ise MCV ile WBC, Fe ve Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla $p: 0.04$, $p<0.001$, $p<0.001$; $r: 0.168$, $r: 0.654$, $r: 0.482$) ; TDBK ve LDH değerleri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$; $r: -0.528$, $r: -0.348$) (Tablo 9).

Tablo 9.Hasta ve Kontrol Gruplarında MCV ile WBC, PLT, Fe, TDBK, Ferritin, LDH değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
MCV - WBC	p : 0.671 r : 0.035	p : 0.04 r : 0.168
MCV - PLT	p : 0.032 r : -0.181	p : 0.268 r : -0.092
MCV - Fe	p < 0.001 r : 0.291	p < 0.001 r : 0.654
MCV - TDBK	p < 0.001 r : -0.481	p < 0.001 r : -0.528
MCV - Ferritin	p : 0.005 r : 0.249	p < 0.001 r : 0.482
MCV - LDH	p : 0.803 r : -0.021	p < 0.001 r : -0.348

Hasta grubunda WBC ile PLT değeri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (p: 0.011; r: 0.215) ; TDBK değeri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (p: 0.004; r: -0.234). Kontrol grubunda ise WBC ile PLT, Fe, Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla p<0.001, p: 0.031, p<0.001; r: 0.336, r: 0.176, r: 0.313) (Tablo 10).

Tablo 10.Hasta ve Kontrol Gruplarında WBC ile PLT,Fe, Ferritin, TDBKdeğerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
WBC - PLT	p : 0.011 r :0.215	p<0.001 r :0.336
WBC - Fe	p : 0.995 r :0.001	p : 0.031 r :0.176
WBC - Ferritin	p : 0.813 r :-0.022	p<0.001 r :0.313
WBC - TDBK	p : 0.004 r :-0.234	p : 0.396 r :-0.070

Hasta grubunda PLT ile LDH değeri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptandı (p:0.027; r:0.186). Kontrol grubunda ise PLT ile TDBK değeri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (p:0.033; r: 0.176); LDH değeri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (p:0.045; r:-0.165) (Tablo 11).

Tablo 11.Hasta ve Kontrol GruplarındaPLT ile TDBK ve LDH değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
PLT - TDBK	p : 0.146 r :0.123	p : 0.033 r :0.176
PLT - LDH	p : 0.027 r :0.186	p : 0.045 r :-0.165

Hasta grubunda Fe ile T.bil., İ.bil.değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptandı (sırasıyla p<0.001, p<0.001; r: 0.348, r: 0.389).Kontrol grubunda ise Fe ile Ferritin değerleri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla p<0.001; r: 0.536);TDBK değeri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (p<0.001; r:-0.433) (Tablo 12).

Tablo 12.Hasta ve Kontrol Gruplarında Fe ile TDBK, Ferritin, T.bil., İ.bil.değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
Fe - TDBK	p : 0.067 r :-0.156	p<0.001 r :-0.433
Fe - Ferritin	p : 0.184 r :0.123	p<0.001 r :0.536
Fe – T.bil.	p<0.001 r :0.348	p : 0.199 r :0.126
Fe – İ.bil.	p : <0.001 r :0.389	p : 0.174 r :0.183

Hasta grubunda TDBK ile Ferritin değeri arasında negatif yönlü anlamlı ilişki saptandı (p<0.001; r: -0.312). Kontrol grubunda ise TDBK ile LDH değeri arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (p: 0.001; r: 0.264) ; Ferritin değeri arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon saptandı (p<0.001; r: -0.567) (Tablo 13).

Tablo 13. Hasta ve Kontrol GruplarındaTDBK ile LDHve Ferritin değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
TDBK - Ferritin	p<0.001 r :-0.312	p<0.001 r :-0.567
TDBK - LDH	p : 0.989 r :-0.001	p : 0.001 r :0.264

Hasta grubunda T.bil., ile İ.bil. ve LDH değerleri arasında çok güçlü pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanırken (sırasıyla p<0.001, p<0.001; r: 0.971, r: 0.302); kontrol grubunda ise T.bil., ile İ.bil. değeri arasında çok güçlü pozitif yönlü anlamlı ilişki saptandı (p<0.001; r: 0.913) (Tablo 14).

Tablo 14.Hasta ve Kontrol Gruplarında T.bil., ile İ.bil. ve LDH değerleri arasındaki ilişki

	Hasta	Kontrol
T.bil. - İ.bil.	p<0.001 r :0.971	p<0.001 r :0.913
T.bil. - LDH	p<0.001 r :0.302	p : 0.140 r :0.145

Hasta grubunda İ.bil. ve LDH değerleri arasında(p: 0.001; r: 0.261) pozitif yönlü korelasyon saptandı (Tablo 15).

Tablo 15.Hasta Grubundaİ.bil. ve LDH değerleri arasındaki ilişki

	r değeri	p değeri
İ.bil. - LDH	0.261	0.001

Tablo 16.Düşük sayısına göre hasta grubundaki parametreler

Parametreler	Düşük sayısı		
	1-3	4-6	>6
Yaş	28,52±0,623	31,14±1,49	28,75±2,28
Hb	13,48±0,12	12,57±0,41	14,02±0,58
Mcv	84,67±0,64	82,54±1,45	85,5±1,19
Wbc	7274,57±164,78	7720±449,11	7550±1429,16
Plt	268,63±6,32	285±14,81	256,67±40,55
Fe	74,44±3,03	70,52 ±6,59	78,00±20,31
Tdbk	377,88±5,63	375,52±14,39	323,50±6,73 ^{a, b}
Ferritin	37,89±2,21	33,04±4,81	69±18,02 ^{a, b}
T.bil	0,60±0,03	0,61±0,08	0,53±0,09
Ldh	199,40±3,86	223,08±29,12	200,75±15,43

Aynı satırdaki harfler istatistiki farkı belirtmektedir. a: düşük sayısı 1-3 olan grupla karşılaştırıldığında $p<0,05$; b: düşük sayısı 4-6 olan grupla karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Düşük sayısına göre hasta grubundaki parametreler Tablo 16'da gösterilmiştir.TDBK değeri düşük sayısı altıdan fazla (>6)olan grupta; düşük sayısı bir ila üç(1-3) ve dört ila altı (4-6) olan gruplara göre istatistiki olarak anlamlı düşük bulunmuştur($p<0,05$). Ferritin değeri ise yine düşük sayısı altıdan fazla (>6)olan grupta; düşük sayısı bir ila üç (1-3) ve dört ila altı (4-6) olan gruplara göre istatistiki olarak anlamlı yüksek bulunmuştur($p<0,05$).

Hasta grubundaki 10 kadında (%6,6) tromboz öyküsü mevcuttu. Ayrıca hasta grubundaki 5 kadında (%3,3) flowsitometri sonuçlar pozitif. Kontrol grubunda ise tromboz öyküsü yoktu ve flowsitometri sonuçları negatifti.

Tablo 17. PNH klonu pozitif tespit edilen hastaların klon yüzdesi ve düşük sayıları

PNHklonu pozitif hastalar	PNHklon yüzdesi	Düşük sayısı
1.	30	3
2.	0,05	2
3.	0,24	5
4.	0,12	2
5.	0,21	2

PNH negatif hasta ve PNH pozitif hasta gruplarının yaş ve düşük sayısı sonuçları tablo 18’de gösterilmiştir. PNH negatif hasta ve PNH pozitif hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark düşük sayısı ve yaş açısından saptanmadı (sırasıyla $p=0.956$, $p=0.393$).

Tablo 18. PNH klonu pozitif tespit edilen hasta grubu ile PNH klonu negatif hasta grubunun düşük sayısı ve yaş değerleri

Parametreler	PNH negatif hasta (Ortalama±SS)	PNH pozitif hasta (Ortalama±SS)	P değeri
Düşük sayısı	2,83±1,38	2,80±1,30	0,956
Yaş	28,87±6,40	31,40±7,98	0,393

PNH negatif hasta ve PNH pozitif hasta gruplarının laboratuvar sonuçları tablo 19’da gösterilmiştir. PNH negatif hasta ve PNH pozitif hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark Hb, MCV, WBC, PLT, Fe, TDBK, Ferritin, T.bil., İ.bil., LDH parametrelerinde saptanmadı (sırasıyla $p=0.719$, $p=0.294$, $p=0.316$, $p=0.750$, $p=0.426$, $p=0.779$, $p=0.285$, $p=0.800$, $p=0.723$, $p=0.128$).

Tablo 19. PNH klonu pozitif tespit edilen hasta grubu ile PNH klonu negatif hasta grubunun labaratuvar değerleri

Parametreler	PNH negatif hasta (Ortalama±SS)	PNH pozitif hasta (Ortalama±SS)	P değeri
Hb	13,35±1,54	13,10±2,11	0,719
MCV	84,23±6,85	87,60±12,01	0,294
WBC	7387,32±1901,58	6520,00±1672,42	0,316
PLT	271,60±68,39	260,50±71,20	0,750
Fe	73,48±31,58	85,20±48,95	0,426
TDBK	376,23±64,01	370,40±42,27	0,779
Ferritin	38,21±22,79	21,50±12,02	0,285
T.bil	0,60±0,35	0,64±0,30	0,800
İ.bil	0,36±0,24	0,39±0,16	0,723
LDH	202,16±71,17	239,00±42,79	0,128

PNH klonu pozitif tespit edilen hastalarımızdan 4 tanesinin klon pozitifliği çok düşük titrede olduğundan hematoloji polikliniği tarafından takibe alındı. 1 hastamızın ise PNH klon titresi %30 olması nedeniyle tekrar FSM yapıldı. Tekrar PNH klon titresi %40 olarak tespit edilen hastaya PNH teğhisi konuldu ve tedaviye başlandı.

PNH klon titresi yüksek olan hasta 32 yaşında habituel abortus nedeniyle kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvurmuştur. Kadın hastalıkları ve doğum polikliniği tarafından yapılan araştırmalar sonrası herhangi bir jinekolojik patoloji bulunamayan hasta hematoloji polikliniğimize yönlendirilmiştir. Hastanın 3 kez ard arda düşük öyküsü olup canlı doğumu yoktur. Hastanın alınan anamnezinde daha önce bir çok kez demir eksikliği anemisi tanısı ile demir tedavisi kullandığı bilinmektedir.

Hastanın herhangi bir tromboz öyküsü yoktur. Hastanın laboratuvar tetkiklerinde normositer anemi, trombositopeni mevcuttu. Ayrıca Fe, TDBK ve transferrin saturasyonu normal sınırlarda olup ferritin düzeyi düşük bulundu. LDH ve indirek bilirubin yüksekliği mevcuttu. Hastanın laboratuvar parametreleri toplu olarak Tablo-20’te gösterilmiştir

Tablo 20. PNH klonu yüksek titrede pozitif tespit edilen hastanın kan değerleri

Parametreler	Sonuç	Normal referans aralığı
Hemoglobin (g/dL)	10,5	11-18
MCV (fL)	85	80-100
WBC ($\times 10^9/L$)	5300	5000-10000
Platelet($\times 10^9/L$)	55000	150000-400000
Fe (ug/dL)	62	37 – 145
Total Demir Bağlama Kapasitesi (ug/dL)	316	112 - 346
Ferritin (ng/mL)	10	14-150
Total Billirubin (mg/dL)	1.5	0,2-1,2
İndirek Bilirubin (mg/dL)	1.3	0-0,8
LDH (IU/L)	510	240-480

5.TARTIŞMA

Gebelikte oluşan koagülasyona yatkınlığa karşılık fetomaternal yüzeyde kanın akışkanlığının sağlanacağı hemostatik önlemler alınır. Trofoblastik invazyon sayesinde yeterli fetal beslenme elde edilmeye çalışılır, fakat bu ince damarlarda olan tromboz artışı ise fetüste gelişme geriliğinden, intrauterin ölüme kadar değişen farklı tablolara yol açmaktadır. Tromboza yatkınlık ise trombofili olarak tanımlanır ve HA hastalarının % 55-62'sinde trombofilik faktörlerin rol aldığına inanılır (98). Her ne kadar HA ve obstetrik komplikasyonlar ile ilişkili bazı hemostatik anormallikler bildirilmiş olsada, bu anormalliklere sahip kadınların komplike olmayan gebelik geçirdikleri de birçok çalışmada gösterilmiştir (107). Trombofilik faktörlerin desidual damarlarda tromboz gelişimiyle gebelik kayıplarına sebep olduğu ileri sürülmüştür (108).

HA öyküsü olan hastalarda herediter ve akkiz trombofili nedenlerinin etyolojide önemli rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle etyolojiye yönelik HA hastalarında en fazla araştırılan trombofilik faktörler; Protein C eksikliği, Protein S eksikliği, Antitrombin III eksikliği, Faktör V Leiden mutasyonu, Protrombin gen mutasyonu, MTHFR gen mutasyonları, Lupus Antikoagülanı varlığı, Antikardiolipin IgM ve Antikardiolipin IgG pozitifliğidir (109).

HA ile trombofili ilişkisi üzerine literatürde yapılan pek çok çalışma vardır. Hiperkoagülasyon ve trombofili için risk faktörü olan MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonları ile HA arasındaki ilişkiyi inceleyen yayınlarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur (110, 111). Bazı çalışmalar mutasyonun homozigot genotipte olması veya diğer mutasyonlarla birlikteliğinin, HA riskini arttırdığını ileri sürerken, diğer çalışmalar bu verilerin HA için risk oluşturmadığını bildirmektedir (112). Olgular ve meta-analizlerin yayınlanan tutarsız sonuçları nedeniyle, MTHFR mutasyonları ve HA arasındaki ilişki belirsiz kalmaktadır (113).

Dilley ve arkadaşlarının 60 hasta ve 92 kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada faktör V, protrombin veya MTHFR mutasyon taşıyıcıları olan kadınların bu mutasyonları olmayan kadınlara göre HA riskinin daha yüksek olmadığını gösterdiler (114).

Foka ve arkadaşlarının 80 hasta ve 100 kontrol grubu arasındaki yaptıkları çalışmada faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarının HA için risk faktörleri olabileceğini ancak, MTHFR C677T homozigositesinin risk faktörü olmadığını öne sürdüler (115).

HA ve antifosfolipid antikorları arasındaki birliktelik AFAS'ın sürekli olarak üzerinde durulan bir özelliğidir (116). İmplantasyon başarısızlığında antifosfolipid antikorlarının rolü son yıllarda yapılan birçok araştırmanın odağı olmuştur ve halen tartışma konusu olmaktadır. Antikardiyolipin antikorları'nın HA ile birlikteliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. HA olan 500 ardışık kadınla yapılan bir çalışmada, AKA IgG %37, AKA IgM %36 oranında pozitif olarak bildirilmiştir (117). AKA'nın HA ile birlikteliği üzerine birçok araştırmalar yapılmıştır. Araştırmalarda AKA'nın varlığının fetal kayıp ile sonlanan bir protrombotik durumu hızlandırdığı ve HA ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (117).

PNH hastalığında trombofilik durumun ve oluşan trombozların neden olduğu ve patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Ancak hastalığın klinik seyrinde meydana gelen trombozlar mortalite ve morbiditenin başlıca sebeplerindedir. PNH hastalığında oluşan trombozlar hertürlü damarda oluşabilir, atipik ve beklenmedik damar trombozları sık görülmektedir. Desidual damarlardaki tromboz oluşumunun HA etyolojisinde sebep olabileceği ileri sürülmüştür. PNH hastalığında oluşan trombofilik durumun desidual damarlarda tromboz oluşturarak veya tam olarak aydınlatılamamış mekanizmalarla HA etyolojisinde rol alabileceğini düşünmekteyiz.

Tarafımızdan literatürde HA etyolojisinde, akkiz trombofilik bir neden olan PNH açısından şimdiye kadar yapılmış herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda HA etyolojisinde nadir de olsa yer alabileceğini düşündüğümüz akkiz bir trombofili sebebi olan PNH hastalığının varlığını araştırdık. Hasta grubumuzdaki 5 (%3,3) hastada pozitif PNH klonu tespit edildi. Hasta grubundaki 10 kadında (%6,6) tromboz öyküsü mevcuttu. PNH klon pozitifliği olan hastalarımızın hiçbirinde tromboz öyküsü yoktu. Kontrol grubunda ise tromboz öyküsü ve PNH klon pozitifliği mevcut değildi.

Bulgularımızda hasta grubundaki 4 hastanın PNH klon pozitifliği (%0,05, %0,24, %0,12, %0,21) diğer PNH klon pozitifliği olan hastaya (%30) göre nispeten düşük düzeyde tespit edildi. PNH klon boyutu ile semptomlar ve PNH kliniği arasındaki ilişki net olarak açıklanmamıştır. PNH’da trombozun mekanizması çok net olmamakla birlikte tromboz riski PNH klon genişliğine bağlanan çalışmalar literatürde yer almaktadır (40, 67). İki büyük çalışmada trombozu olan tüm hastalarda granüositlerdeki PNH klonunun %50 (67) ya da %61’den fazla olduğu gösterilmiştir (40). Ancak bazı çalışmalarda trombozu olan hastalarda çok daha düşük düzeylerde PNH klon bildirilmiştir. Walter A ve ark. splanknik ven trombozu olan 202 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada birisinde herhangi bir risk faktörü bulunmayan portal ven trombozu diğerinde ise inflamatuvar barsak hastalığına bağlı süperiyör mezenterik ven trombozu mevcut olan 2 (%0,99) hastada düşük düzeyde (0.014% ve 0.16%) PNH klonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir (118). Bu sebeple literatürde düşük klon düzeylerinde bile tromboz görülebilmesi, hasta grubumuzdaki düşük düzeyde PNH klon pozitifliğinin HA’ya neden olmayacağı düşüncesini ekarte ettirmektedir.

Biz bu çalışmamızda HA etyopatogenezinde gerek akkiz gerek herediter olmak üzere trombofilik nedenlerin rol aldığını, akkiz ve herediter trombofilik nedenler açısından bir çok çalışma yapıldığını, rutinde klinisyenler tarafından etyopatogenez araştırılmasında sıkça kullanılan tetkikler arasında herediter trombofililer için genetik analizler, akkiz trombofililer olan AFAS ve SLE açısından antikor tayinleri yapıldığını ancak toplumda sık görülmeyen bir hastalık olan PNH’ya yönelik rutinde herhangi bir tetkik yapılmadığını, tromboz, trombofili ve PNH arasında ki ilişkiye yönelik bir çok çalışma olduğu halde, akkiz bir trombofilik durum oluşturan PNH ve trombofililerin etyolojide rol alabileceği HA arasında herhangi bir nedensellik çalışması yapılmadığını ve tüm bu nedenlerle HA etyolojisinde, asemptomatik kompense hemolitik anemiden kemik iliği yetmezliğine, tekrarlayan alışılmadık yerleşimli damar trombozlarından pulmoner emboli veya SVO kadar çok geniş klinik spektruma sahip olan PNH hastalığının yer alabileceğini düşünmekteyiz.

6.SONUÇ

Bu çalışmada habituel abortus öyküsü olan hastalarda paroksizmal noktürnal hemoglobinüri varlığını araştırdık.

1. Çalışmaya alınan HA öyküsü olan 150 hasta ve HA öyküsü olmayan 150 kontrol hastasında FLAER yöntemiyle PNH klonu varlığı araştırıldı. Hasta grubumuzdaki 5 (%3,3) hastada pozitif PNH klonu tespit edildi. Kontrol grubunda PNH klonu pozitif hasta tespit edilmedi
2. PNH klonu pozitif tespit edilen hastalarımızdan 4 tanesinin klon pozitifliği çok düşük düzeyde(%0,05, %0,24, %0,12, %0,21), 1 tanesinin klon pozitifliği yüksek düzeyde (%30) bulundu.
3. PNH klon titresi yüksek olan hasta 32 yaşında habituel abortus nedeniyle kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvurmuştur. Kadın hastalıkları ve doğum polikliniği tarafından yapılan araştırmalar sonrası herhangi bir jinekolojik patoloji bulunamayan hasta hematoloji polikliniğimize yönlendirilmiştir. Hastanın 3 kez ard arda düşük öyküsü olup canlı doğumu yoktur. Hastanın alınan anamnezinde daha önce bir çok kez demir eksikliği anemisi tanısı ile demir tedavisi kullandığı bilinmektedir. Hastanın herhangi bir tromboz öyküsü yoktur.
4. PNH klon titresi yüksek olan hastanın laboratuvar tetkiklerinde normositer anemi, trombositopeni mevcuttu. Ayrıca Fe, TDBK ve transferrin saturasyonu normal sınırlarda olup ferritin düzeyi düşük bulundu. LDH ve indirek bilirübin yüksekliği mevcuttu.
5. Hasta grubundaki 10 kadında (%6,6) tromboz öyküsü mevcuttu. PNH klon pozitifliği olan hastalarımızın hiçbirinde tromboz öyküsü yoktu. Kontrol grubunda ise tromboz öyküsü mevcut değildi.
6. Bu çalışma literatürdeHA'lu hastalarda akkiz trombofilik bir neden olan PNH varlığınıaraştıran ilk çalışmadır.
7. Kontrol grubuna göre, HA grubunda PNH klon pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edilmiş olması HA etyolojisinde PNH'nın rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

7.KAYNAKLAR

1. Parker CJ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Williams Hematology. 8th ed. Kaushansky K, ed. California, CA: McGraw-Hill; 2010: 521-31.
2. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural History Of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, The New England Journal Of Medicine Vol. 333 No. 19, 1995
3. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood.1953;8:769-812
4. Speroff L, Robert HG, Nathan GK. Klinik Jinekolojik Endokrinolojik ve Đnfertilite, 5. baskı. 1996;841–851.
5. Tabassum Parveiz MD. Recurrent Pregnancy Loss. JK-Practitioner. 2003;10:323- 326.
6. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008: 93-103.
7. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; a classic description by Paul Strübling in 1882, and a bibliography of the disease. Blood. 1951; 6(3):270-84.
8. Yenerel MN. Anemi Fizyopatolojisi, Klinik Gelişim Dergisi 2009 No 3;65-70.
9. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. J Immunol. 2006 1; 176(3):1305-10.
10. Parker CJ, Hemolysis in PNH, in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and the Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins, edited by NS Young, J Moss, s 49. Academic Press, San Diego, 2000.
11. Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen KF. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. J Immunol. 1982; 129(1):184-9.
12. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, and Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80(16): 5066–5070.

13. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(17):5430-4.
14. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 1989; 84(1):7-17.
15. Sahin F, Ozkan MC, Mete NG, Yilmaz M, Oruc N, Gurgun A, Kayikcioglu M, Guler A, Gokcay F, Bilgir F, Ceylan C, Bilgir O, Sari IH, Saydam G. Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Blood Res*. 2015 Jun 15;5(1):1-9. eCollection 2015.
16. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 2012;19:141-8.
17. Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007;35:523-33.
18. Çetiner M. Paroksismal Nokturnal Hemoglobinüri. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2011;4:23-8.
19. Socie 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;348:573-7.
20. 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;45:736-48.
21. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. *Haematologica*. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. 2010 Apr;95(4):523-6. doi: 10.3324/haematol.2009.017848.
22. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106:3699-3709.
23. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78(4):211-30.
24. Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A study of the mechanism of hemolysis to acid-base equilibrium. *N Engl J Med*. 1937;217:915-917.

25. Ham TH. Studies on destruction of red blood cells. I. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an investigation of the mechanism of hemolysis with observations of five cases. *Arch Intern Med.* 1939;64:1271-1305.
26. Ham TH, Dingle JH. Studies on the destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest.* 1939;18:657-672.
27. Hartmann RC, Jenkins DE. The “sugar-water” test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1966;275:155-157.
28. Van der Schoot CE, Huizinga TW, van't Veer-Korthof ET, Wijmans R, Pinkster J, von dem Borne AE. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood.* 1990; 76(9):1853-9.
29. Rotoli B, Nafa D, Risitano AM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Principles of Molecular Medicine*, 2nd edition. Runge MD and Patterson C, ed. Philadelphia, Humana Press.; 2006: 838–47.
30. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1996; 87(12): 5332-40.
31. Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica.* 2000; 85(1): 82-7
32. Miyata T, Yamada N, Iida Y, et al. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1994; 330: 249-55.
33. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994; 343:951-3.
34. Araten DJ, Luzzatto L. The mutation rate in PIG-A is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2006; 108(2): 734-6
35. Türk Hematoloji Derneği Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri Tanı ve Tedavi Kılavuzu, 2011

36. Hillmen P. Paroxysmal Nocturnal haemoglobinuria. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR, eds. *Postgraduate Haematology*. 6th ed. Singapore: Wiley-Blackwell; 2011.p.176-185
37. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American Society of Hematology Educational Book*. 2009; 28-38.
38. Balçık ÖŞ, Pehlivan D. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria *Yeni Tıp Dergisi* 2013;30:142-144
39. Kumar V et al. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2004.
40. 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.
41. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003; 102: 3587-3591.
42. Peffault de Latour R, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112: 3099-3106.
43. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293: 1653-1662.
44. Van Bijnen ST, Van Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1.
45. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2008; 100: 878–85.
46. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004; 125: 804–13.
47. Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, Schmid A, Koksich M, Schopflin C, Schauer S, Griesshammer M. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 685–95.

48. Helley D, de Latour RP, Porcher R, Rodrigues CA, Galy-Fauroux I, Matheron J, Duval A, Schved JF, Fischer AM, SocieG. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010; 95: 574–81.
49. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 36–42.
50. La Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, Rosti V, Bonetti E, Travaglino E, Boveri E, Galli A, Boggi S, CicconeM, Pramparo T, Mazzini G, Invernizzi R, Lazzarino M, Cazzola M. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008; 22: 530-37.
51. Mueller RJ, Stussi G, Puga YG, Nikolic M, Soldini D, Halter J, Meyer-Monard S, Gratwohl A, Passweg JR, Odermatt B, Schanz U, Biedermann BC, Seebach JD. Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2011; 96: 119–27.
52. Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001; 357: 932–3.
53. Zhang J, Piro O, Lu L, Broze GJ Jr. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003; 108: 623–7.
54. Maroney SA, Cunningham AC, Ferrel J, Hu R, Haberichter S, MansbachCM, Brodsky RA, Dietzen DJ, Mast AE. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1114–24.
55. Von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, Wellner M, Cristina CM, Luft FC, Kettritz R. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007; 109: 4487–93.
56. Jankowska AM, Szpurka H, Calabro M, Mohan S, Schade AE, Clemente M, Silverstein RL, Maciejewski JP. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a factor contributing to thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2011; 96:954–962.
57. Maciejewski JP, Young NS, Yu M, Anderson SM, Sloand EM. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thromb Res* 1996; 83: 433–47.
58. Vu T, Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Sigaux F, Carosella ED, Menier C, ScrobobaciML, SocieG. Aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal

haemoglobinuria: a study of the GPI-anchored proteins on human platelets. *Br J Haematol* 1996; 93: 586–9.

59. Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 1987; 79: 131–7.
60. Louwes H, Vellenga E, de Wolf JT. Abnormal platelet adhesion on abdominal vessels in asymptomatic patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 2001; 80: 573–6.
61. Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 275–82.
62. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82: 1192–6.
63. Ploug M, Plesner T, Ronne E, Ellis V, Hoyer-Hansen G, Hansen NE, Dano K. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992; 79: 1447–55.
64. Sloan EM, Pfannes L, Scheinberg P, More K, Wu CO, Horne M, Young NS. Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Exp Hematol* 2008; 36: 1616–24.
65. Gralnick HR, Vail M, McKeown LP, Merryman P, Wilson O, Chu I, Kimball J. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995; 91: 697–702.
66. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome: an overview. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 642–645.
67. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004; 83: 193–207.
68. Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrenzenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socié G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Effect of the complement inhibitor eculizumab

on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007; 110(12): 4123-8.

69. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, Mitchell LD, Cohen DR, Gregory WM, Hillmen P. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011; 117(25): 6786-92.
70. Harris JW, Kosciak R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma*. 1999; 32(5-6): 401-26.
71. Katahira J, Aoyama M, Oshimi K, Mizoguchi H, Okada M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating in TdT-positive acute leukemia. *Am J Hematol*. 1983; 14(1): 79-87.
72. Cowall DE, Pasquale DN, Dekker P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating as erythroleukemia. *Cancer*. 1979; 43(5): 1914-6.
73. Kawano F, Chosa M, Matsuoka M, Oyamada N, Takatsuki K. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: termination in acute monocytic leukemia and reappearance after chemotherapy with N4-palmitoyl-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (PL-AC) and vincristine. *Jpn J Clin Oncol*. 1987; 17(2): 123-8.
74. Kaufmann RW, Schechter GP, McFarland W. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating in acute granulocytic leukemia. *Blood*. 1969; 33(2): 287-91.
75. Hirsch VJ, Neubach PA, Parker DM, Reese MH, Stone MJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Termination in acute myelomonocytic leukemia and reappearance after leukemic remission. *Arch Intern Med*. 1981; 141(4): 525-7.
76. Hillmen P, Elebute P, Kelly R, Urbano-Ispizua A, Hill A, Rother RP, et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American Journal of Hematology*. 2010; 85(8):553-59
77. Sears DA, Anderson PR, Foy AL, Williams HL, Crosby WH. Al Urinary iron Excretion and Renal Metabolism of Hemoglobin in Hemolytic Diseases. *Blood* 1966;5:28:708-25. 15.
78. Issaragrisil S, Piankijagum A, Tang-naitrisorana Y. Corticosteroids therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 1987; 25(1): 77-83.

79. Zhao M, Shao Z, Li K, Chen G, Liu H, Zhang Y, He H, Shi J, He G, Chu Y, Yang T. Clinical analysis of 78 cases of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosed in the past ten years. *Chin Med J (Engl)*. 2002; 115(3):398-401.
80. Bourantas K. High-Dose Recombinant Human Erythropoietin and Low-Dose Corticosteroids for Treatment of Anemia in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Acta Haematol* 1994; 91: 62–65.
81. Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1982; 60: 20-23.
82. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, McKee LC, Heyssel RM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine (Baltimore)*. 1966; 45: 331-363.
83. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Röth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP, Luzzatto L. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355(12): 1233-43.
84. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, de Castro C, Fu CL, Maciejewski JP, Bessler M, Kroon HA, Rother RP, Hillmen P. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008; 111(4): 1840-7.
85. Hillmen P, Risitano A, Schrezenmeier H, Schubert J, Maciejewski J, Dührsen U, Muus P, Szer J, de Castro C, Socié G, Brodsky A. Long-term outcomes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with sustained eculizumab treatment [abstract]. *Haematologica* 2011, 96(Suppl 2): 105.
86. Socié G, Muus P, Schrezenmeier H, Hochsmann B, Maciejewski JP, Weitz IC, Hill A, Bessler M, Risitano AM. Terminal complement inhibitor eculizumab improves complement-mediated platelet consumption and thrombocytopenia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria(PNH) [abstract]. *Blood* 2009; 114: 4030
87. Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, Willemze R, Terriou L, Tichelli A, Mohty M, de Guibert S, Marsh J, Passweg J, Mary JY, Socie G. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2012 Jun 11.
88. Takahashi Y, McCoy JP, Jr., Carvallo C, Rivera C, Igarashi T, Srinivasan R, et al. In vitro and in vivo evidence of PNH cell sensitivity to immune attack after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004; 103(4): 1383-90.

89. Santarone S, Bacigalupo A, Risitano AM, Tagliaferri E, Di Bartolomeo E, Iori AP, Rambaldi A, Angelucci E, Spagnoli A, Papineschi F, Tamiazzo S, Di Nicola M, Di Bartolomeo P. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2010; 95(6): 983-8.
90. Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Benvenuto F, Figari O, Mordini N, Berisso G, Bregante S, Frassoni F, Bacigalupo A. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2000; 85(1): 59-62.
91. Matos-Fernandez NA, Abou Mourad YR, Caceres W, Kharfan-Dabaja MA. Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15(6): 656-61.
92. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of recurrent early pregnancy loss. *ACOG Practice Bulletin* 2001;24:1-8.
93. Betina T, Udo J, Nina R, Christoph S, Wolfgang W, Christian J. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 2010;85:25-32.
94. Alberman E. The epidemiology of repeated abortion. In: Beard RW, Sharp F (eds). *Early Pregnancy loss: Mechanisms and treatment*. London, UK: RCOG Press; 1988. 9-17
95. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal Aida. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002; 17: 1633-37.
96. Şahin FI, Ataç B, Yılmaz Z, Zeyneloğlu HB. Tekrarlayan gebelik kayıplarında trombofili mutasyon sıklıkları. *Erciyes Tıp Derg* 2009;31:104-9.
97. Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome due to blood coagulation protein/platelet defects: prevalence, treatment and outcome results. DRW Metroplex Recurrent Miscarriage Syndrome Cooperative Group. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000;6:115-25.
98. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003; 361:901-8.
99. Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res* 2009;3: S16– 21

100. Rai R, Regan L. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Semin Reprod Med* 2000;18:369–77.
101. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348: 913–6.
102. Roque H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczynski E, Lockwood CJ. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 2004;91,290–295
103. Jivraj S, Rai R, Underwood J, Regan L. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21:1161–5
104. Rai R. and T. Wakefor Recurren tmiscarriage *Current Obstetrics & Gynaecology*. 2001;11:218-24.
105. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Spontaneous loss of early pregnancy and risk of ischaemic heart disease in later life: retrospective cohort study. *BMJ* 2003;326:423-4.
106. Isermann B, Sood R, Pawlinski R, et al. The thrombomodulinprotein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med* 2003;9:331–7
107. Rai R, Tuddenham E, Backos M, Jivraj S, Gaddal S, Choy S. Thromboelastography, whole-blood haemostasis andn recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2003;18:40-43.
108. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins–correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:7003–11.
109. Sood R. Thrombophilia and fetal loss: Lessons from gene targeting inmice. *Thromb Res* 2009; 123 (Suppl. 2);S79–S84
110. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first- trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1998;71:1048-53.
111. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Vida AA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk actor for recurrent pregnancy loss? *Am J Rep Immunol* 2006;56:230-6.

112. Bick RL, Hoppensteadt D, Recurrent miscarriage syndrome and infertility due to blood coagulation protein/platelet defects: A review and update. *Clin App Thromb Hemost* 2005;11:1-13.
113. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;86:1716-22.
114. Dilley A, Benito C, Hooper WC, et al. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11:176-82.
115. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, et al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000;15:458-62.
116. Rai RS., Regan L, Clifford K. Antiphospholipid antibodies and β -2 glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum. Reprod.* 1995;10:2001–2005.
117. Franklin RD. and Kutteh WH. Antiphospholipid antibodies (APA) and recurrent pregnancy loss: treating a unique APA positive population. *Human Reproduction* 2002;17:2981-2985.
118. W. Ageno et al. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in patients with splanchnic vein thrombosis. *Thrombosis Research* 133 (2014) 1052–1055.