

\*ANNA ADAMOWICZ-SALACH<sup>1</sup>, BEATA BURZYŃSKA<sup>2</sup>, ALICJA SIWICKA<sup>1</sup>, KATARZYNA SMALISZ<sup>1</sup>,  
MICHAŁ MATYSIAK<sup>1</sup>

# Nietypowy obraz hemoglobinopatii współistniejącej z talasemią $\beta$

Atypical clinical picture of hemoglobinopathy in association with thalasemia  $\beta$

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Michał Matysiak

<sup>2</sup>Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Teresa Żołądek

## Summary

**Introduction.** Inherited hemoglobin disorders, including thalassemia and hemoglobinopathies, are frequently occurring diseases in the world. Thalassemias are autosomal recessive disorders of hemoglobin synthesis. Underlying molecular defects in the  $\alpha$ -globin or  $\beta$ -globin gene clusters form the basis of defective hemoglobin synthesis and the various inherited forms of  $\alpha$ -thalasemias or  $\beta$ -thalasemias. Thalassemia is diagnosed where hemoglobin levels, volume of red blood cells (MCV) and mean cellular hemoglobin (MCH) are significantly reduced.

**Aim.** We want to introduce atypical clinical picture of hemoglobinopathy.

**Material and methods.** We presented two children with anemia. In first case it was a boy with normal MCV and reduced MCH, next case it was a girl after splenectomy with increased MCV and MCH. In both cases the red cells were hypochromic and also target cells were present in peripheral blood smear. Hemoglobin electrophoresis, measurement of HbA<sub>2</sub> and HbF levels were performed.

**Results.** Test results were characteristic for thalasemia  $\beta$ . Extending the diagnostic panel with genetic tests helped to identify in both of children thalasemia  $\alpha$  silience carrier ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ). In first case unstable hemoglobin Hb Köln (Codon 98(295G > A)) was also detected and in second unstable hemoglobin Hb Bruxelles (deletions del 42/ $\beta^+$ ).

**Conclusion.** Only the genetic tests made it possible to explain atypical blood smear for thalasemia.

## Keywords

thalasemia  $\alpha$ , thalasemia  $\beta$ , unstable hemoglobin

## WSTĘP

Talasemie należą do wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych, które spowodowane są przez niezrównoważoną syntezę łańcuchów globiny. Zaburzenia w ekspresji globiny mogą dotyczyć każdego z czterech podstawowych łańcuchów –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , najczęściej jednak łańcuchów  $\beta$  i  $\alpha$ . W zależności od tego, który z łańcuchów syntetyzowany jest w zmniejszonej ilości, możemy rozpoznać talasemię  $\beta$  lub  $\alpha$  (1-4). W przypadku talasemii  $\beta$  występują przede wszystkim mutacje punktowe, talasemia  $\alpha$  jest zazwyczaj wynikiem delekcji genów  $\alpha$  globiny, rzadziej występują mutacje punktowe. Mutacje powodujące zaburzenia strukturalne hemoglobiny są określane jako tzw. hemoglobinopatie jakościowe (2). Cechami charakterystycznymi dla talasemii są niedokrwistość mi-

krocytarna z obniżonym stężeniem hemoglobiny i obniżenie średniego ciężaru hemoglobiny. W rozmazie krwi obwodowej widoczne są krwinki tarczowate, występuje hipochromia i anizocytoza krwinek czerwonych (5-7).

W 2006 roku Zdebska i wsp. opublikowali pracę na temat występowania talasemii na terenie Polski. W badanej grupie pacjentów stwierdzono występowanie nosicielstwa cechy talasemii  $\beta$  i wykryto 7 różnych mutacji śródziemnomorskich, w pojedynczych przypadkach stwierdzono obecność mutacji charakterystycznej dla ludności tatarskiej (8). Znacznie rzadziej wykrywane było nosicielstwo talasemii  $\alpha$ , co wiąże się ze znacznie mniejszym rozpowszechnieniem tej postaci choroby w Europie. Choroba ta występuje głównie w Azji Południowo-Wschodniej (9-11).

## CEL PRACY

Celem pracy jest przedstawienie dwóch przypadków dzieci z nietypowym obrazem morfologicznym krwi obwodowej w przebiegu hemoglobinopatii.

## MATERIAŁ I METODY

Dwoje pacjentów skierowanych zostało do Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii WUM z powodu niedokrwistości hemolitycznej o nieznannej przyczynie. W pierwszym przypadku u chłopca jednorazowo obserwowano wystąpienie przełomu hemolitycznego. Liczba krwinek czerwonych obniżyła się do  $3,24 \times 10^{12}/l$ , stężenie hemoglobiny wynosiło 8,4 g/dl, MCV 89,4 fl, liczba retikulocytów była zwiększona i wynosiła 4,3% (ARC 182,75 G/L). W późniejszym okresie morfologia uległa normalizacji, jednak stale obserwowano retikulocytozę. W rozmazie obecne były pojedyncze sferocyty. Na tej podstawie ustalono wstępne rozpoznania – sferocytoza wrodzona. Drugi przypadek dotyczył nastoletniej pacjentki z pierwotnym rozpoznaniem sferocytozy wrodzonej, po splenektomii, u której po zabiegu chirurgicznym nie obserwowano poprawy. W morfologii krwi obwodowej stwierdzano niedokrwistość makrocytarną, liczba krwinek czerwonych była obniżona do  $3,1 \times 10^{12}/l$ , stężenie hemoglobiny wynosiło 10,4 g/dl, MCV 101,6 fl, a liczba retikulocytów 7,1% (ARC 220,1 G/L) (tab. 1).

## Metody genetyczne

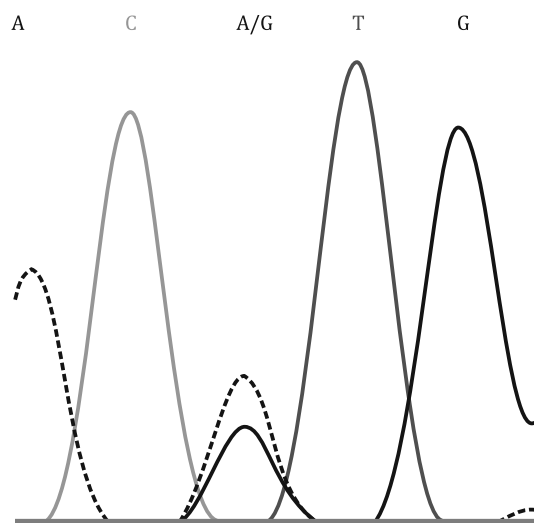
### Izolowanie DNA i sekwencjonowanie

DNA izolowano z krwi pobieranej do próbek zawierających EDTA. DNA wyizolowano przy wykorzystaniu zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Niemcy).

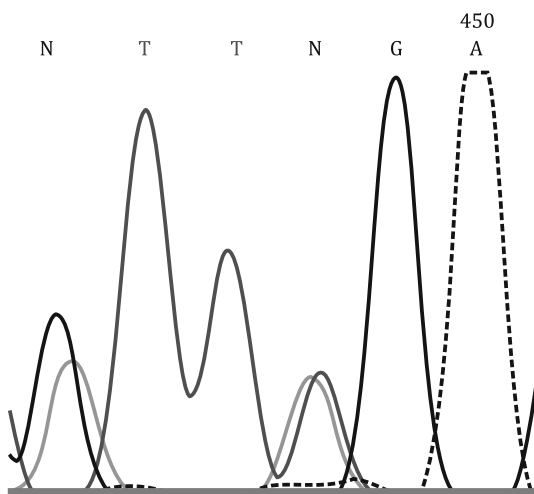
Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) została wykorzystana do amplifikacji genu kodującego beta-globinę. PCR wykonano przy użyciu FastStart PCR System (Roche, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Każda mieszanina reakcyjna zawierała 1-100 lub 10-250 ng DNA, 2,5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR bufor, 1,0  $\mu$ l odpowiednich starterów Startera oraz 1 jednostkę enzymu (FastStart Taq DNA Polymerase) w końcowej objętości 25  $\mu$ l. PCR przeprowadzano na aparacie Mastercycler personal (Eppendorf, Niemcy), stosując następujące warunki: 2-minutową wstępną denaturację w 94°C, a następnie 30 cykli 45 s w 94°C, 45 s w 59°C, 45 s w 72°C oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 minut. Do namnażania eksonu 1 i 2 genu beta-globiny użyto następujące startery: F15'AGTGATGGC-CTGGCTCACCT3' i 1R 5'CCTGAGACTTCCACACTGAT 3', a dla eksonu 3 startery: F2 5'AGCAGCTACAATCCAGCTAC3' i 5AGTG-

GAGTCAAGGCTGAGAG3'. Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy agarozowej, a następnie zsekwencjonowane na aparacie ABI Prism 377 (Applied Biosystem, USA).

Zmianę nukleotydową 98:GTG/ATG Hb Köln potwierdzono trawieniem restrykcyjnym PmlI (ryc. 1), natomiast obecność delekcji trzech nukleotydów TTT potwierdzono enzymem restrykcyjnym TaqI (ryc. 2).



Ryc. 1. Zmiana nukleotydowa G > A powodująca Hb Köln



Ryc. 2. Delekcja TTT powodująca Hb Bruxelles

Tab. 1. Wyniki badań dodatkowych przedstawionych pacjentów

Nr	Hb A2 [%]	Hb F [%]	Badania genetyczne	RBC [ $10^{12}/l$ ]	HGB [g/dl]	MCV [fl]	MCH [pg]	Ret. [%]	Opis krwinek czerwonych
1	5,5	1	Codon 98 (295G > A) Hb KÖLN - $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	4,25	10,6	89,4	24,8	4,3	Makrocyty, mikrocyty, krwinki tarczowate
2	4,7	2,75	Del 42/ $\beta^+$ - $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	3,1	10,4	101,6	33,7	7,1	Anizocytoza, poikilocytoza, krwinki tarczowate, stomatocyty, akantocyty

### Delecje genów $\alpha$ -globiny

Łańcuchowa reakcja polimerazy została wykorzystana do detekcji delecji:  $-\alpha^{3,7}$  i  $-\alpha^{4,2}$ , charakteryzujących niektóre delecje występujące w przypadkach  $\alpha$ -talasemii, według procedury Liu i wsp. (2000) (12). PCR wykonano przy użyciu FastStart PCR System (Roche, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Każda mieszanina reakcyjna zawierała około 200 ng DNA, 2,5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR bufor, 5  $\mu$ l 5  $\times$  GC-Rich Solution 1,0  $\mu$ l odpowiednich primerów (20 pmol/ $\mu$ l) oraz 1 jednostkę enzymu (FastStart Taq DNA Polymerase) w końcowej objętości 25  $\mu$ l. PCR przeprowadzano na aparacie Mastercycler personal (Eppendorf, Niemcy), stosując następujące warunki: 4-minutową wstępną denaturację w 94°C, a następnie 30 cykli 45 s w 94°C, 45 s w 65°C, 2 min 30 s w 72°C oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 minut. Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy agarozowej na 2% żelu.

### WYNIKI

W przypadku obu przedstawianych pacjentów, w morfologii krwi obwodowej stwierdzano niedokrwistość, w pierwszym normocytarną, w drugim makrocytarną, oraz retikulocytozę. W rozmazie krwi obwodowej u obojga dzieci obecne były krwinki tarczowate (ryc. 3). Wykonanie przesiewowego testu EMA w kierunku sferocytosis wrodzonej i badania oporności osmotycznej pozwoliły na jej wykluczenie.

Ze względu na obecność krwinek tarczowatych, mimo nietypowego dla talasemii obrazu morfologicznego krwi, wykonano elektroforezę krwinek czerwonych. W przypadku pierwszym u chłopca stwierdzono wzrost poziomu HbA<sub>2</sub> do 5,5%, poziom HbF był w normie, wyniósł 1%. Dodatkowo elektroforeza wykazała u niego obecność dodatkowego prążka między prążkami HbS i HbC. Badanie przeprowadzono również w drugim przypadku. U pacjentki również stwierdzono wzrost poziomu HbA<sub>2</sub> do 4,7%, HbF wyniósł 2,75%. W obu przypadkach rozpoznano wstępnie talasemię  $\beta$ . Dla potwierdzenia rozpoznania wykonano u obojga dzieci badania genetyczne. W przypadku pierwszym, badanie genetyczne pozwoliło na stwierdzenie mutacji

punktowej w kodonie 98 (295 G > A). W jej wyniku nastąpiła zamiana waliny na metioninę. Zmiana ta prowadzi do powstania niestabilnej hemoglobiny znanej pod nazwą Hb Köln (13, 14). Dalsze badania genetyczne pozwoliły na wykrycie dodatkowo mutacji  $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ , odpowiadającej nosicielstwu talasemii  $\alpha$ .

W drugim przypadku sekwencjonowaniem genu beta stwierdzono obecność delecji trzech nukleotydów TTT w jednym allelu, co powoduje brak aminokwasu fenyloalaniny w jednym z łańcuchów białka beta-globiny (127\_129delTTT). Delecja ta prowadzi do usunięcia jednego aminokwasu fenyloalaniny w pozycji 41 lub 42 (Hb Bruxelles), co skutkuje obecnością niestabilnej hemoglobiny (15). Dzięki temu badaniu możliwe stało się wykrycie u pacjentki delecji del42/ $\beta^+$ . Dodatkowa analiza ewentualnych delecji genów  $\alpha$ -globinowych wykazała ubytek jednego łańcucha genu  $\alpha$ -globiny,  $\alpha$  ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), co odpowiada postaci nosiciela talasemii  $\alpha$ . W przypadku obojga pacjentów rozpoznano łagodną postać talasemii  $\alpha$  współistniejącą z hemoglobinopatią strukturalną pod postacią niestabilnej hemoglobiny: Hb Köln i Hb Bruxelles.

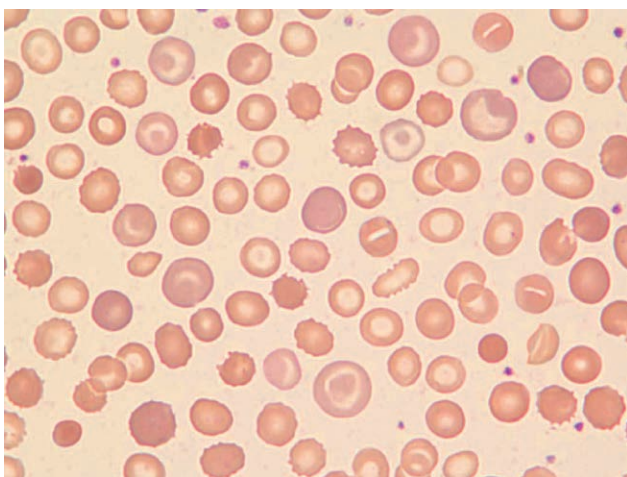
### DYSKUSJA

Talasemia nie stanowiła dotąd i nadal nie stanowi w Polsce istotnego problemu klinicznego. Najczęstszą przyczyną niedokrwistości mikrocytarnej jest bowiem niedokrwistość z niedoboru żelaza. Dopiero wieloosrodkowe badania Zdebskiej i wsp. z 2006 roku pozwoliły na wykazanie obecności w populacji polskiej nosicielstwa cechy talasemii  $\beta$ . Pierwsze wykryte przypadki talasemii  $\alpha$  w populacji polskiej dotyczyły rodzeństwa będącego pod opieką Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii WUM (8, 16).

Kliniczny obraz talasemii może być różnorodny, u części pacjentów stwierdza się charakterystyczne dla niej zmiany morfologiczne krwinek czerwonych pod postacią niedokrwistości mikrocytarnej. Jednak u niektórych można nie wykryć żadnych zmian (2, 17). Sytuacja taka może mieć miejsce w przypadku współistnienia talasemii  $\beta$  z talasemią  $\delta$  lub  $\alpha$  lub w łagodnej czy w tzw. milczącej talasemii  $\beta$  (1, 7, 18, 19).

Dwoje dzieci, u których początkowo rozpoznano talasemię  $\beta$ , wyróżniało się brakiem charakterystycznych dla niej wykładników czerwonokrwinkowych. W obu przypadkach nie stwierdzano niedokrwistości mikrocytarnej. U chłopca znaleziono mutację Codon 98 GTG > ATG. Natomiast u dziewczynki w badaniu genetycznym wykryto delecję Del 42/ $\beta^+$ . Występowanie delecji jest w talasemii  $\beta$  rzadkie. Otrzymane wyniki nie tłumaczyły nietypowego obrazu krwinek czerwonych. Rozwiązanie znaleziono dzięki badaniom genetycznym. W obu przypadkach wykryta została dodatkowa delecja fragmentu 3,7 kb globiny  $\alpha$ , która dotyczyła tylko jednego łańcucha kodującego ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ) i współistniała ze strukturalnymi zmianami w obrębie globiny  $\beta$ . W obu przypadkach współistnienie nosicielstwa talasemii  $\alpha$  z obecnością niestabilnych hemoglobin spowodowało brak tak charakterystycznych dla talasemii mikrocytarnych krwinek czerwonych ze zmniejszonym MCH.

Podkreślić należy zbyt pochopne rozpoznanie sferocytosis wrodzonej u obojga dzieci, co u nastoletniej pacjentki było



Ryc. 3. Rozmaz krwi obwodowej, widoczne liczne krwinki tarczowate (pacjent 2)

powodem zakwalifikowania jej do operacji splenektomii. Jedynie przeprowadzenie badań genetycznych pozwoliło na postawienie ostatecznego rozpoznania i umożliwiło wytłumaczenie nietypowego dla talasemii obrazu krwinek czerwonych.

## PODZIĘKOWANIE

Wyniki elektroforezy hemoglobin uzyskane zostały dzięki współpracy z panią dr hab. Ewą Zdebską z Zakładu Biochemii IHiT w Warszawie w ramach grantu KBN 3POE05942.

### Konflikt interesów Conflict of interest

Brak konfliktu interesów  
None

### Adres do korespondencji

\*Anna Adamowicz-Salach  
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Żwirki i Wigury 63a, 02-091 Warszawa  
tel.: +48 (22) 317-96-16  
anna.adamowicz-salach@wum.edu.pl

### Piśmiennictwo

1. Olivieri NF, Weatherall DJ: Clinical aspects of  $\beta$  thalassemia. [In:] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds.): Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press, Cambridge 2001: 277-341.
2. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD: Thalassaemia. Lancet 2018; 391: 155-167.
3. Adamowicz-Salach A: Wrodzone i nabyte niedokrwistości mikrocytarne u dzieci. Onkol Dypl 2017; 15(4): 28-33.
4. Adamowicz-Salach A: Wrodzone niedokrwistości hemolityczne – od rozpoznania do leczenia. Onkol Dypl 2015; 12(5): 20-25.
5. Forget BG: The  $\beta$  thalassemias. [In:] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds.): Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press, Cambridge 2001: 231-232.
6. Higgs DR, Bowden DK: Clinical and laboratory features of the  $\alpha$ -thalassemia syndromes. [In:] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds.): Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press, Cambridge 2001: 431-469.
7. Bianco I, Cappabianca MP, Foglietta E et al.: Silent Thalassemias: Genotypes and Phenotypes. Haematologica 1997; 82: 269-280.
8. Zdebska E, Krawcewicz A, Adamowicz-Salach A et al.:  $\beta$ -thalassemia w Polsce. I. Mutacje śródziemnomorskie. Pol Merk Lek 2006; 115: 53-56.
9. Bernini LF: Geographical distribution of  $\alpha$  thalassemia. [In:] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds.): Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press, Cambridge 2001: 527-531.
10. Koza K, Łoniewska-Lwowska A, Fabijańska-Mitek J et al.: Molecular diagnostics of thalassemia  $\alpha$  in Polish population. Post Nauk Med 2016; XXIX(2): 88-91.
11. Maciąg M, Płochocka D, Adamowicz-Salach A: Diversity of thalassemia. Acta Haematol 2014; 99(5): 811-820.
12. Liu YT, Old JM, Miles K et al.: Rapid detection of  $\alpha$ -thalassemia deletions and  $\alpha$ -globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Brit J Haematol 2000; 108: 295-299.
13. Phylly RL, Fairbanks VF: Thromboembolic complication of splenectomy in unstable hemoglobin disorders: Hb Olmsted, Hb Holn. Am J Hematol 1997; 55(1): 53.
14. Landin B, Fröstad B, Brune M, Ljung R: Haemoglobin Köln as de Novo mutations in Sweden: diagnosis by PCR and specific enzymatic cleavage. Eur J Haematol 1994; 52(3): 156-161.
15. Griffon N, Badens C, Lena-Russo D et al.: Hb Bruxelles, deletion of Phebeta42, shows a low oxygen affinity and low cooperativity of ligand binding. J Biol Chem 1996; 271(42): 25916-25920.
16. Adamowicz-Salach A, Zdebska E, Burzyńska B et al.: Talasemia alfa przyczyną niedokrwistości mikrocytarnej w Polsce – opis przypadków. Ped Pol 2007; 82: 151-155.
17. Piel FB, Weatherall DJ: The  $\alpha$ -Thalassemias. N Engl J Med 2014; 371: 1908-1916.
18. Tatu T, Kiewkarnkha T, Khuntarak S et al.: Screening for co-existence of  $\alpha$ -thalassemia and in HbE heterozygotes via an enzyme-linked immunosorbent assay for Hb Bart's and embryonic  $\zeta$ -globin chain. Int J Hematol 2012; 95: 386-393.
19. Wee YC, Tan KL, Kuldpi K et al.: Alpha-Thalassaemia in Association with Beta-Thalassaemia Patients in Malaysia: A Study on the Co-Inheritance of Both Disorders. Community Genet 2008; 11: 129-134.

nadesłano: 6.11.2018  
zaakceptowano do druku: 5.12.2018