



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/ Original research article

Analiza mutacji talasemii alfa u chorych diagnozowanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii



*Analysis of α -thalassemia mutations in patients diagnosed at
the Institute of Hematology and Transfusion Medicine*

Edyta Klimczak-Jajor^{1,*}, Joanna Skulimowska¹, Paweł Turowski¹,
Hanna Pyl¹, Małgorzata Uhrynowska¹, Katarzyna Guz¹,
Ewa Mendek-Czajkowska², Anna Ejduk³, Izabella Kopec⁴,
Marzena Dębska⁵, Ewa Brojer¹

¹Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii,
kierownik: prof. dr hab. Ewa Brojer, Warszawa, Polska

²Poradnia dla Chorych na Wrodzone Niedokrwistości Instytutu Hematologii i Transfuzjologii,
kierownik: dr n. med. Ewa Mendek-Czajkowska, Warszawa, Polska

³Poradnia Hematologiczna Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, kierownik: lek. Monika Dąbrowska,
Warszawa, Polska

⁴Poradnia Hematologiczna dla Kobiet w Cięży Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, kierownik:
dr n. med. Izabella Kopec, Warszawa, Polska

⁵II Klinika Ginekologii i Położnictwa Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Kierownik:
prof. dr hab. med. Romuald Dębski, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 09.06.2016

Zaakceptowano: 04.10.2016

Dostępne online: 14.10.2016

Słowa kluczowe:

- talasemia alfa
- mikrocytoza
- gap-PCR
- MLPA

ABSTRACT

Background: Alpha-thalassemia is genetically transmitted hemolytic anemia resulting from disturbance of the globins chain synthesis. Alpha-thalassemia is caused most frequently by deletions and less commonly by nondeletional defects. **Aim:** To introduce the molecular methods for routine identifications of alpha-thalassemia mutations and to study the characteristics of these mutations in Poland. **Methods:** Blood sample of 155 patients with normal or reduced HbA₂ values was obtained for blood counting. All samples underwent gap-PCR to screen for the seven common α -thal deletions and MLPA analysis. The DNA of 21 patients in which deletions were not detected has been directly sequenced. **Results:** We detected mutations in the alpha-globin gene in 72 of 155 patients studied. 55 out of 72 cases showed most common thalassemia deletions, as the

* Adres do korespondencji: Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Pracownia Niedokrwistości Uwarunkowanych Genetycznie, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, Polska. Tel.: +48 22 34 96 679 (673); fax: +48 22 34 96 611.

Adresy email: eklimczak@ihit.waw.pl, edytaklimczakjajor@gmail.com (E. Klimczak-Jajor).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.10.002>

0001-5814/© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

- alfa globina
- delecje

Keywords:

- Alpha-thalassemia
- Microcytosis
- gap-PCR
- MLPA
- Alpha-globin
- Deletions

following: a single gene deletion ($\alpha^{3.7}$ and $\alpha^{4.2}$) and both genes deletion (FIL, SEA, MED I, and $\alpha^{20.5}$). Owing to the use of MLPA technique, we found nontypical deletions in another 12 patients and multiplication of the alpha-globin genes in further 4 cases. We also identified a patient with a point mutation HBA2: c.300 + 2T>A by DNA sequencing. **Conclusions:** Molecular analysis of the alpha-globin cluster is required for a correct diagnosis in patients with normal or reduced level of HbA₂.

The results of the study show that due to the progressive migration of the population and globalization, thalassemia must be included in the differential diagnosis of anemia in Poland.

© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Talasemie alfa to grupa genetycznie uwarunkowanych niedokrwiistości hemolitycznych spowodowanych zaburzeniami w łańcuchu alfa globiny. Są to tak zwane hemoglobinopatie ilościowe będące efektem zaburzeń w produkcji prawidłowych łańcuchów alfa globiny.

Synteza alfa globiny jest kodowana przez klastery genów znajdujących się na krótszym ramieniu 16 chromosomu (16p.13.3). W klastrze tym, na każdym chromosomie są obecne dwa geny kodujące łańcuch alfa hemoglobiny α : gen HBA2, gen HBA1, a także gen zeta, pseudogeny, gen teta oraz elementy regulatorowe (m.in. HS-40) [1, 2]. W komórce diploidalnej znajdują się więc cztery geny kodujące łańcuch α .

Nieprawidłową produkcję alfa globiny powodują mutacje w genach kodujących te białka lub w ich regionach promotorowych (np. HS-40). Mutacje prowadzące do talasemii alfa to w około 80% przypadków delecje [3, 4] jednego lub więcej genów. Znacznie rzadziej są to mutacje punktowe: substytucje, insercje lub delecje pojedynczego nukleotydu lub kilku nukleotydów [5].

U chorych z talasemią alfa obserwuje się zahamowanie produkcji alfa globiny w różnym stopniu, co jest zależne od tego, ile spośród czterech genów nie generuje ekspresji alfa globiny [6].

Mutacja powodująca brak ekspresji jednej kopii genu powoduje talasemię alfa plus. Pacjent z taką postacią talasemii alfa, ($-\alpha/\alpha\alpha$) określany jest jako „cichy nosiciel alfa-talasemii”; dochodzi u niego do częściowego spadku poziomu alfa globiny. Najczęstszymi mutacjami pojedynczego genu są delecje: $\alpha^{3.7}$ i $\alpha^{4.2}$.

Delecje obejmujące oba geny HBA2 i HBA1 prowadzą do talasemii alfa zero. W takim przypadku mutacja prowadzi do połowicznego zahamowania syntezy alfa globiny. Taka postać talasemii alfa określana jest jako „cecha alfa-talasemii” (*alpha-thalassemia trait*). Przykładami tych mutacji są MED I, SEA, THAI, FIL, $\alpha^{20.5}$, oraz rzadziej występujące BRIT, SA, CAL [7-9].

Złożone heterozygoty, u których doszło do unieczynnienia trzech kopii genów, prowadzą do tzw. choroby hemoglobiny H (HbH) [10]. Natomiast brak ekspresji wszystkich czterech genów alfa globiny prowadzi do powstania tzw. hemoglobiny Bart's.

U pacjentów z mikrocytozą i hipochromią coraz częściej wykonywane są w Polsce badania w kierunku talasemii [11]. Wykazują one, że choroba ta w Polsce występuje i należy rozszerzać i udoskonalać ich diagnostykę o zastosowanie metod molekularnych. Badania molekularne są szczególnie istotne dla zdiagnozowania talasemii alfa, bo tylko za ich pomocą można ustalić to rozpoznanie. W prezentowanej pracy przedstawiamy wyniki badań molekularnych w kierunku występowania talasemii alfa wykonanych w naszym ośrodku oraz charakterystykę wykrytych mutacji.

Materiały i metody

Próbki pełnej krwi pobranej na EDTA po ocenie podstawowych parametrów krwinki czerwonej (aparat Mythic, Orphee) poddawano analizie biochemicznej w kierunku talasemii. Wynik badania poziomu HbA₂ w granicach normy lub obniżony (norma 1,9-3,5%) stanowił podstawę do przeprowadzenia badań genetycznych w kierunku talasemii alfa u 155 osób (91 kobiet i 64 mężczyzn), w dominującej większości pochodzenia kaukaskiego. Wśród tej grupy były trzy rodziny oraz 147 niespokrewnionych pacjentów. W przeważającej większości byli to pacjenci z Poradni dla Chorych na Wrodzone Niedokrwiistości Instytutu Hematologii i Transfuzjologii; niektórzy kierowani byli do diagnostyki z innych ośrodków w Polsce. Stężenie HbA₂ badane było metodą mikrokolumnowej chromatografii anionowymiennej przy użyciu zestawu Beta-Thal HbA₂Quick Column (Helena Biosciences). DNA izolowano z krwi obwodowej przy użyciu zestawu Nucleospin Dx Blood (Machery Nagel); jego stężenie i czystość mierzono w NANODROP.

DNA wyizolowane od każdego chorego badano w kierunku najczęściej występujących mutacji: $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, SEA; MED I; FIL; $\alpha^{20.5}$, THAI za pomocą specyficznych dla każdej delecji primerów przy użyciu multipleksowej reakcji gap-PCR (termocykler GeneAmp PCR system 9700), [12]. Do wykrycia triplikacji stosowano osobny PCR [13]. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarozowym 2%. Wizualizację prowadzono w świetle UV. Jako kontroli pozytywnych użyto otrzymane grzechnościowo z Uniwersytetu Leiden próbki DNA z ww. delecjami.

Wszystkie uzyskane wyniki z gap-PCR potwierdzano metodą MLPA (*multiplex ligation – dependent probe amplification*) (MRC-Holland, Amsterdam, Holandia) z wykorzystaniem

zestawu SALSA MLPA probemix P140-B4 HBA. Badania wykonano według załączonej instrukcji, rozdział elektroforetyczny przeprowadzono za pomocą analizatora genetycznego ABI 3130 (Applied Biosystems, USA), analizę przeprowadzono przy użyciu programu Coffalyser. Metoda ta pozwala na ocenę liczby kopii eksonów lub genów, do których są skierowane sondy, wykrywając delecje bądź multiplikacje badanych obszarów chromosomu. Zasadą tej techniki jest powielanie sond, które uległy hybrydyzacji do określonych sekwencji badanego DNA.

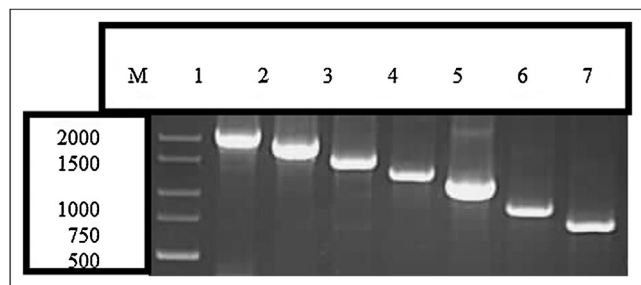
U 21 pacjentów, u których nie wykryto przy użyciu powyższych metod delecji ani multiplikacji genów alfa globiny, przeprowadzono sekwencjonowanie genów HBA1 i HBA2 w celu wykrycia mutacji punktowych. Produkty PCR uzyskane za pomocą primerów specyficznych dla HBA2 i HBA1 oczyszczano za pomocą QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), reakcje sekwencjonowania matrycy wykonywano z użyciem zestawu odczynników BigDye terminator v1.1. Sequencing. Rozdział elektroforetyczny wyznakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA wykonano za pomocą analizatora genetycznego ABI 3130.

Wyniki

U 155 pacjentów poddanych badaniom genetycznym poziom HbA₂ wynosił od 1,0% do 3,1%. Za pomocą metody gap-PCR zidentyfikowano mutacje odpowiadające za talasemię alfa u 55 pacjentów. Przykładowy wynik analizy produktów amplifikacji przedstawiono na rycinie 1.

U 22 osób wykryto mutację pojedynczego genu, delecję $\alpha^{3.7}$. Wśród tych przypadków 8 osób wytypowano jako postać homozygotyczną ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), a 14 jako postać heterozygotyczną ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) tej delecji. Jednego pacjenta zidentyfikowano jako nosiciela mutacji $\alpha^{4.2}$ ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$).

Wśród mutacji dwugenowych u badanych pacjentów zidentyfikowano delecję FIL, SEA, MED I, 20,5 kb. U 17 osób stwierdzono delecję FIL ($-\text{FIL}/\alpha\alpha$). 7 chorych okazało się nosicielami delecji SEA ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$), w tym jeden przypadek



Ryc. 1 – Obraz elektroforetyczny produktów otrzymanych w wyniku gap-PCR: Ścieżki: M-marker wielkości 2 kb; 1: prawidłowy, 2: $\alpha^{3.7}$, 3: FIL, 4: $\alpha^{20.5}$, 5: MED 1, 6: $\alpha^{4.2}$, 7: SEA; Wielkość amplifikowanych fragmentów podana w parach zasad

Fig. 1 – Gel electrophoresis of PCR amplified α -thal deletions; Lanes: M = DNA size marker, 2 kb DNA ladder; 1: WT; 2: $\alpha^{3.7}$; 3: FIL; 4: $\alpha^{20.5}$; 5: MED 1; 6: $\alpha^{4.2}$; 7: SEA; Size of amplified fragments are given in base pairs

homozygotycznej postaci prowadzący do tzw. Hb Bart's hydrops fetalis. Dwa przypadki zidentyfikowano jako mutacje MEDI ($-\text{MED}/\alpha\alpha$), a 1 przypadek jako mutację $\alpha^{20.5}$ ($-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$).

Wśród badanych zidentyfikowano 5 osób jako chorych z HbH. Oznacza to, że u tych badanych tylko jeden z czterech genów funkcjonuje prawidłowo. Trzy pozostałe ulegają delecji lub 2 geny delecji, a jeden mutacji punktowej. Nasze przypadki stanowiły złożone heterozygoty z delecji $\alpha^{3.7}/\text{FIL}$ ($-\alpha^{3.7}/-\text{FIL}$) (3 osoby), delecji $\alpha^{3.7}/\text{SEA}$ ($-\alpha^{3.7}/-\text{SEA}$) (jeden przypadek) i $\alpha^{3.7}/$ nietyпова delecja ($-\alpha^{3.7}/-$) (również jeden przypadek).

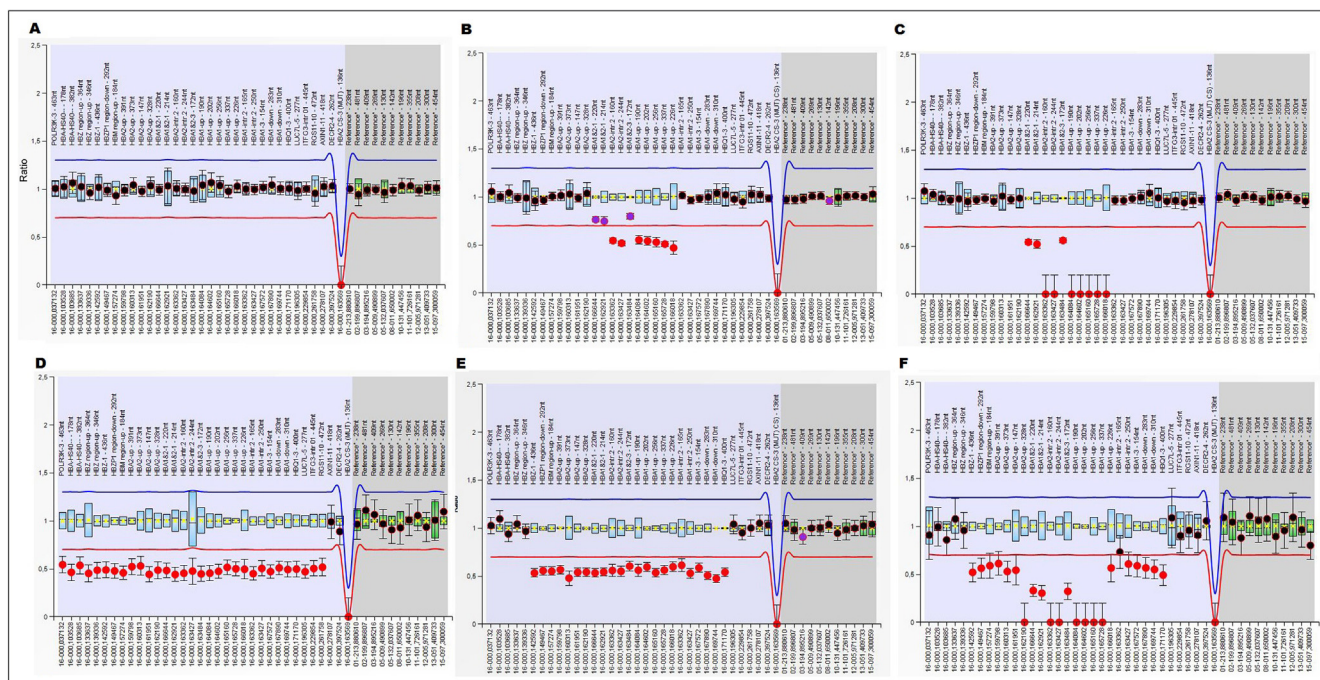
Badanie MLPA potwierdziło występowanie wszystkich ww. mutacji (Ryc. 2), a także pozwoliło na wykrycie kolejnych mutacji, niewykrywalnych w metodzie gap-PCR u 16 kolejnych pacjentów. U 2 osób zidentyfikowano mutację w obrębie regionu promotorowego genu alfa globiny, HS-40. Inne przypadki z tej grupy to: 2 przypadki delecji, które obejmują tylko jeden gen HBA1, oraz 8 przypadków delecji obejmujące oba geny: HBA1, jak i HBA2 oraz region promotorowy, HS-40. Dokładna wielkość oraz końcowa sekwencja delecji nie jest znana. Przypadki te wymagają dalszych, szczególnie nowych badań. Dzięki MLPA wykryto też 4 przypadki multiplikacji. U 3 pacjentów to triplikacja 3.7 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$), potwierdzona też metodą gap-PCR. Natomiast u jednego pacjenta zaobserwowano kwadryplikację genów HBA1, HBA2 ($\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$).

U 21 osób, u których nie wykryto mutacji delecyjnych, wykonano sekwencjonowanie. U jednego pacjenta, trzydziestoosmioletniego mężczyzny, znaleziono mutację punktową (Ryc. 3). Była to heterozygotyczna substytucja tyminy na adeninę w intronie 2, genu HBA2 w miejscu wycinania intronu. Stężenie HbA₂ u tego pacjenta wynosiło 2,6%. Parametry czerwonych krwinek (RBC) $-6,24 \times 10^6/\mu\text{l}$, Hb – 14,7 g/dl, średnia objętość krwinki (MCV) – 71,6 fl, średnia masa Hb w krwince (MCH) – 23,6 pg, rozpiętość rozkładu objętości krwinki czerwonej (RDW) – 11,8%.

Ogółem, zastosowane metody badań genetycznych pozwoliły na wykrycie mutacji w genie alfa globiny u 72 ze 155 badanych chorych (46%) z podejrzeniem talasemii alfa. U 67 osób, odpowiedzialna za talasemię alfa okazała się delecja. Natomiast w jednym przypadku, w wyniku sekwencjonowania, wykryto mutację punktową. W 4 przypadkach wykryto multiplikację liczby genów alfa globiny.

Wśród 67 pacjentów z delecją wytypowano 17 osób z brakiem jednej kopii genu alfa globiny, a 44 pacjentów z brakiem dwóch genów. U 5 osób stwierdzono mutacje dla 3 kopii genów alfa globiny, a u 1 brak ekspresji wszystkich czterech kopii genów (Ryc. 4).

Analizując wyniki badań morfologicznych chorych ze zdiagnozowaną delecją w alfa globinie, stwierdzono u przeważającej większości chorych prawidłową liczbę erytrocytów $5,8 \times 10^6/\mu\text{l} \pm 0,8$ (Tab. 1). Większość pacjentów wykazywała mikrocytozę w stopniu zależnym od rodzaju mutacji. Przy delecji jednego genu ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) MCV w zależności od pacjenta wynosiło od 66 fl do 93 fl. W przypadku uszkodzenia dwóch genów mikrocytoza była większa. Przy homozygotycznej postaci delecji $\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) średnie MCV = $66,7 \text{ fl} \pm 4,1$, w przypadku delecji FIL, MCV = $63,3 \pm 3,1$ fl, delecji SEA $65,6 \pm 7,2$ fl, delecji Med I (2 pacjentów) $62,8 \pm 1,8$ fl, delecji HS-40



Ryc. 2 – Wyniki analizy wybranych mutacji delecyjnych w genach α globiny metodą MLPA przy użyciu programu Coffalyser: A [genotyp prawidłowy], B [genotyp $-\alpha^{3.7}/\alpha$], C [genotyp: $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$], D [genotyp: $-\alpha$], E [genotyp: $-\text{SEA}/\alpha$], F [genotyp: $-\alpha^{3.7}/-\text{FIL}$]

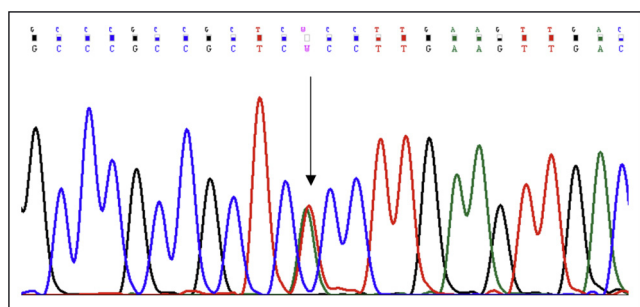
Fig. 2 – Results of selected mutation analysis of alpha-globin genes employing MLPA using Coffalyser: A [genotype WT], B [genotype: $-\alpha^{3.7}/\alpha$], C [genotype: $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$], D [genotype: $-\alpha$], E [genotype: $-\text{SEA}/\alpha$], and F [genotype: $-\alpha^{3.7}/-\text{FIL}$]

MCV = $63,4 \pm 5,7$ fl (2 pacjentów), delecji 20,5 kb (1 pacjent) MCV = 61,3 fl. U 12 pacjentów z nieokreśloną delecją, MCV wynosiło $66,6 \pm 1,3$ fl. Dla 5 chorych z wykrytą chorobą HBH średnie MCV miało wartość $57,8 \pm 6,8$ fl, a wartość hemoglobiny wynosiła $8,8 \pm 1,1$ g/dl, natomiast MCH i RDW odpowiednio: $17,4 \text{ pg} \pm 1,1$ i $19,6\% \pm 2,5$.

Omówienie

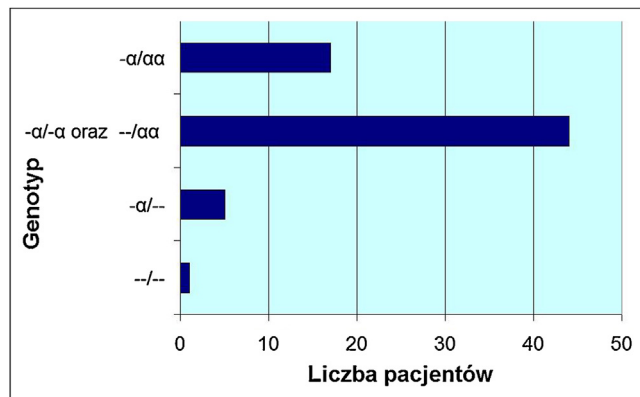
W prezentowanej pracy wykonaliśmy badania genetyczne w kierunku talsemii alfa u chorych kierowanych do leczenia

i diagnostyki do Poradni Dla Chorych na Wrodzone Niedokrwistości oraz do Pracowni Niedokrwistości Uwarunkowanych Genetycznie IHiT. Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami stwierdziliśmy, że talasemia alfa jest obecna u polskich chorych, choć Polska nie należy do typowych rejonów występowania talasemii i hemoglobinopatii [14]. U 72 pacjentów stwierdziliśmy defekt w łańcuchu alfa globiny, czyli wskazaliśmy mutację charakterystyczną dla talasemii alfa u 46% badanych pacjentów. Wśród tej grupy przynajmniej połowa miała kaukaskie pochodzenie. U osób skierowanych na badanie molekularne stwierdzono różny stopień nasilenia mikrocytozy, który okazał się zależny od rodzaju mutacji. Niewielką mikrocytozę lub nawet normocytozę zaobserwowano u chorych z uszkodzonym tylko jednym genem ($-\alpha^{3.7}/\alpha$). Natomiast u żadnego chorego z mutacją obejmującą przynajmniej dwa geny MCV nie było powyżej 80 fl, co zgodne jest z dostępną literaturą [15]. U badanych chorych stwierdzono też obniżony czy pozostający w granicach normy poziom HbA₂. Należy jednak zaznaczyć, że wartość HbA₂ może też być obniżona (lub pozostająca w granicach normy) w przypadku niedoboru żelaza [16], niedokrwistości aplastycznej, niedokrwistości syderoblastycznej czy też niedokrwistości będącej wynikiem chorób przewlekłych. Istnieją też przypadki hemoglobinopatii (np. hemoglobina Lepore) czy współwystępowania różnych typów talasemii i hemoglobinopatii, które mogą zaniżać poziom HbA₂ [17]. Tylko zastosowanie metod biologii molekularnej pozwala na wykrycie mutacji powodujących talasemię alfa.



Ryc. 3 – Fragment sekwencji alfa globiny. Strzałka wskazuje miejsce mutacji; HBA2:c.300+2T>A

Fig. 3 – DNA sequence of α -globin gene variant. The arrow points to the mutation site; HBA2:c.300+2T>A



Ryc. 4 – Liczba wykrytych przypadków delekcji obejmujących jeden (-α/αα), dwa (-α/-α oraz -/-αα), trzy (-α/-) lub cztery (-/-) geny

Fig. 4 – Mutation rate depending on the amount of deleted genes (mutation involving one gene (-α/αα), two (-α/-α and -/-αα), three (-α/-) or four (-/-) genes)

Na całym świecie powszechnie wykrywa się jednogenną delekcję $\alpha^{3,7}$ [18–20]. Podobnie w naszej pracy ta delekcja była wykrywana najczęściej – wykryto ją u 27 chorych, co stanowi prawie 40% wykrytych typów mutacji. We wcześniej przeprowadzonych badaniach w IHiT opublikowanych w 2010 [21] wśród 10 pacjentów z delekcjami 5 przypadków stanowiły delekcje $\alpha^{3,7}$. Następna pod względem częstotliwości w naszych badaniach była delekcja FIL (prawie 30% wśród analizowanych przypadków), a dalej delekcja SEA (12%). Wykryliśmy też pojedyncze przypadki delekcji występujących często w krajach śródziemnomorskich: Med I, $\alpha^{20,5}$ [22, 23] oraz delekcji $\alpha^{4,2}$. U żadnego z badanych chorych nie wykryliśmy delekcji THAI, popularnej w Tajlandii [24].

Uzyskane wyniki wykazały, że w badanej grupie przeważają delekcje dwugenowe. Stanowią 65% ogółem wykrytych

delekcji, 8 chorych z tej grupy ma nietypowe delekcje, niemierzające się w grupie siedmiu popularnych mutacji. Ich wykrycie możliwe było tylko dzięki zastosowaniu techniki MLPA.

Wśród badanych w obecnej pracy chorych wykryto aż 5 pacjentów z chorobą HbH oraz jeden przypadek najcięższej postaci alfa-talasemii, prowadzącej do braku syntezy alfa globiny tzw. *Hb Bart's hydrops fetalis*. Tacy chorzy, z ekspresją tylko jednego genu HBA, często są diagnozowani w południowo-wschodniej Azji [25]. Wobec coraz większej migracji osób z tych regionów świata do Polski musimy liczyć się z rozpoznawaniem tych postaci talasemii alfa.

Punktowe niedelecyjne postaci talasemii alfa występują na świecie zdecydowanie rzadziej [14]. Wśród grupy badanych pacjentów zdiagnozowaliśmy jeden taki przypadek, gdzie miała miejsce zamiana pojedynczego nukleotydu (tyminy na adeninę) w intronie II genu HBA2. Mutacja ta występuje w bazie hemoglobin jako HBVar ID 2522 IVS II-2 (T>A) HBA2:c.300+2T>A alpha+/alpha0. Do tej pory opisano w literaturze jedną rodzinę z tą mutacją [26]. Wykryto ją u trzydziestosześcioletniego mężczyzny w północnej Europie. Zarówno nasz przypadek, jak i opisany w literaturze, charakteryzowały się podobnymi wynikami morfologicznymi i biochemicznymi. U naszego pacjenta MCV wynosiło 78,5 fl, MCHC 23,3 pg, a HbA₂ 2,6%. U pacjenta opisanego przez Hartevela (odpowiednio) 75 fl, 23,7 pg i 2,6%.

Kolejny typ mutacji, który odkryliśmy w grupie polskich chorych, to multiplikacje łańcucha alfa globiny. Zwiększenie liczby kopii genu alfa globiny nie jest talasemią, ale prowadzi do zaburzenia równowagi w ilości alfa i beta globiny w komórce i, ostatecznie, przy współwystępowaniu z talasemią beta prowadzi do cięższej postaci fenotypowej talasemii. [27]. Badania genetyczne w kierunku talasemii beta u tych pacjentów są w toku.

Ze względu na postępującą migrację ludności i globalizację talasemia musi być uwzględniona w diagnostyce różnicowej niedokrwistości w krajach poza jej głównym endemicznym

Tabela I – Wartości skrajne wskaźników hematologicznych i biochemicznych dla pacjentów z delekcjami w klastrze α globiny

Table I – Hematological and biochemical data (ranges) for patients with deletions in the α -globin gene

Genotyp ogólny	Genotyp szczegółowy badanych pacjentów	Liczba przypadków	RBC $\times 10^6/l$ K	RBC $\times 10^6/l$ M	Hb (g/dl) K	Hb (g/dl) M	MCV (fl)	MCH (pg)	HbA ₂ (%)
-α/αα	-α ^{3,7} /αα	14	4,4–5,6	4,3–7,2	11,4–13,2	11,0–14,3	66,0–93,0	20,0–31,5	1,6–2,8
	-α ^{4,2} /αα	1	–	5,4	–	12,2	69,0	22,7	1,7
	-α ^{NN} /αα	2	6,1–6,6	–	12,1–13,5	–	56,5–71,0	18,3–22,1	2,0–2,3
-α/-α oraz -/-αα	-α ^{3,7} /-α ^{3,7}	8	5,0–6,3	5,5–5,7	10,6–13,0	11,1–11,8	62,3–73,0	20,1–22,1	1,5–2,4
	-FIL/αα	17	5,2–6,1	6,2–6,8	10,3–12,0	12,2–14,8	59,5–69,5	17,7–22,8	1,7–2,8
	-SEA/αα	6	5,2–6,1	6,2–7,3	10,2–10,9	12,1–13,5	57,9–76,1	16,7–21,2	1,6–2,6
	-MED/αα	2	5,3	6,7	11,9	14,5	60,8–64,7	21,6–22,5	2,7–3,0
	-α ^{20,5} /αα	1	–	7,6	–	13,2	61,3	17,4	1,6
	-NN/αα	8	5,7–6,5	6,2–7,0	10,2–12,7	13–14,7	60,6–68,9	17,8–22,0	2,2–2,7
	-HS40/αα	2	6,3	4,8	11,4	10,4	59,3–67,4	17,9–21,9	2,2–2,6
-α/-	-α ^{3,7} /-FIL	3	4,8–5,4	5,8	8,5–10,1	9,6	55,5–57,7	16,7–18,8	1,0–1,4
	-α ^{3,7} /-Sea	1	4,1	–	7,3	–	68,7	17,8	1,4
	-α ^{3,7} /-	1	–	5,3	–	8,5	50,2	16	1,5

$\alpha^{NN}/\alpha\alpha$ – nieznanne delekcje obejmujące jeden gen, $-^{NN}/\alpha\alpha$ – nieznanne delekcje obejmujące dwa geny, K – płeć żeńska, M – płeć męska

występowaniem w pasie okolorownikowym. Badania biochemiczne umożliwiając ilościowe i jakościowe oszacowanie obecności poszczególnych frakcji hemoglobin, natomiast badania molekularne prowadzą do zdiagnozowania mutacji. Opracowany w naszym zespole system badań molekularnych oparty na zastosowaniu trzech metod badawczych pozwolił na jednoznacznie identyfikację u chorych z podejrzeniem talasemii alfa, a tym samym potwierdził diagnozę. Rozpoznanie talasemii alfa ma bardzo istotne znaczenie kliniczne, bo chroni pacjentów przed niepotrzebną suplementacją preparatami żelaza, a w dalszej perspektywie przed rozwinięciem się hemochromatozy.

Podziękowania/Acknowledgement

Dziękujemy panu dr Cornelisowi Harteveldowi z Uniwersytetu Leiden w Holandii za udostępnienie próbek DNA ze określonymi mutacjami

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca częściowo finansowana z planu naukowego Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, Polska – temat nr. 4.15/2015

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Wu MY, He Y, Yan JM, Li DZ. A novel selective deletion of the major α -globin regulatory element (MCS-R2) causing α -thalassaemia. *Br J Haematol* 2016 Feb 25. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.14005> [Epub ahead of print].
- [2] Wayne JS, Chui DHK. The α -globin gene cluster: genetics and disorders. *Clin Invest Med* 2001;24:103-109.
- [3] Galanello R, Cao A. Alpha-thalassaemia *Genet Med* 2011;13:83-88.
- [4] Harteveld C. State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Int Jnl Lab Hem* 2014;36:1-12.
- [5] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989;73:1081-1104.
- [6] Higgs DR. The Molecular Basis of α - Thalassaemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011718.
- [7] Shaji RV, Eunice SE, Baidya S, Srivastava A, Chandy M. Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common α -thalassaemia-1 deletion in the Indian population. *Br J Haematol* 2003;123:942-947.
- [8] Eng B, Greenlay B, Wayne JS. Characterisation of the British α^0 -thalassaemia deletion: evidence of a founder effect in Newfoundland. *Canada Br J Haematol* 2009;147:150-156.
- [9] Fichera M, Spalletta A, Fiorenza F, et al. Molecular basis of α -thalassaemia in Sicily. *Hum Genet* 1997;99:381-386.
- [10] Fuchareon S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology* 2009;2009:26-34.
- [11] Albrecht K, Adamowicz-Salach A, Siwicka A, Burzyńska B, Matysiak M. Nowoczesne rozpoznawanie talasemii u dzieci – doświadczenia własne. *J Transf Med* 2011;4:105-114.
- [12] Kidd JL, Azimi M, Lubin B, Vichinsky E, Hoppe C. Application of an expanded multiplex genotyping assay for the simultaneous detection of Hemoglobin Constant Spring and common deletion α -thalassaemia mutations. *Int Jnl Lab Hem* 2010;32:373-380.
- [13] Wang W, Ma ESK, Chan AYY, et al. Single tube multiplex-PCR screen for Anti-3,7 and anti-4,2 α -globin gene triplications. *Clin Chem* 2003;49:1679-1682.
- [14] Harteveld CL, Higgs DR. α -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:13-21.
- [15] Chan LC, Ma SK, Chan AYY, et al. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fl in areas with a high prevalence of thalassaemia? *J Clin Pathol* 2001;54:317-320.
- [16] Gulen H, Hanimeli O, Karaca O, Taneli F. α -thalassaemia frequency and mutations in children with hypochromic microcytic anemia and relation with β -thalassaemia, iron deficiency anemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2012;29:241-246.
- [17] Turowski P, Uhrynowska M, Brojer E. Talasemie - patofizjologia, podstawy molekularne i diagnostyka. *Hematologia* 2013;4:239-256.
- [18] Wayne JS, Eng B. Diagnostic testing for α -globin gene disorders in a heterogeneous North American population. *Int Jnl Lab Hem* 2013;35:306-313.
- [19] Wei XF, Shang X, He DQ, Huang JW, Zhang XH, Xu XM. Molecular characterization of a novel 27,6-kb deletion causing α^+ thalassaemia in a Chinese family. *Ann Hematol* 2011;90:17-22.
- [20] Borgio JF. Molecular nature of alpha-globin genes in the Saudi population. *Saudi Med J* 2015;36:1271-1276.
- [21] Splitt A, Mokras U, Windyga J, Kościelak J. Zastosowanie metod mPCR i MLPA w diagnostyce talasemii α . *Prz Lek* 2010;67:460-464.
- [22] Origa R, Paglietti ME, Sollaino MC, et al. Complexity of alpha-globin genotypes identified with thalassaemia screening in Sardinia. *Blood Cells Mol Dis* 2014;52:46-49.
- [23] Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. α^0 -thalassaemia due to recombination between the $\alpha 1$ -globin gene and an AluI repeat. *Blood* 1985;65:1434-1438.
- [24] Viprakasit V. α -thalassaemia: a genotype-phenotype correlation and management. *International Society of Blood Transfusion* 2015;10:295-304.
- [25] Chui DHK. α -thalassaemia: HbH Diseases and Hb Barts Hydrops Fetalis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:25-32.
- [26] Harteveld CL, Jebbink MCW, van der Lely N, van Delf P, Akkermans N, Arkesteijn S, et al. α -thalassaemia phenotype induced by the new IVS-II-2 (T→A) splice donor site mutation on the $\alpha 2$ -globin gene. *Hemoglobin* 2006;30:3-7.
- [27] Jiang H, Liu S, Zhang YL, Wan JH, Li R, Li DZ. Association of an α -globin cluster duplication and heterozygous β -thalassaemia in a patient with a severe thalassaemia syndrome. *Hemoglobin* 2015;39:102-106.