

Talasemie — patofizjologia, podstawy molekularne i diagnostyka

Thalassemias — pathophysiology, molecular basics and diagnostics

Paweł Turowski, Małgorzata Uhrynowska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Talasemie stanowią grupę uwarunkowanych genetycznie niedokrwistości hemolitycznych, wynikających z zaburzenia syntezy łańcuchów globin. Poziom ekspresji tych białek jest zaburzony w wyniku mutacji w obrębie genu globiny lub w jego miejscach regulatorowych. Do tej pory na świecie zidentyfikowano ponad 400 mutacji prowadzących do zaburzeń ekspresji globin. Każda z nich może mieć inne znaczenie kliniczne. Ograniczona diagnostyka powoduje, że nadal istnieje mało danych, szczególnie o α -talasemii, w polskiej populacji. Celem pracy jest opisanie patofizjologii, podstaw molekularnych i możliwej diagnostyki talasemii z polskiej perspektywy i doświadczenia.

Słowa kluczowe: talasemia, mutacje, patofizjologia, niedokrwistość hemolityczna, hemoglobinopatia

Hematologia 2013; 4, 3: 239–256

Abstract

Thalassemias are genetically transmitted hemolytic anemias resulting from disturbance of the globins chain synthesis. The expression of these functional proteins of hemoglobin is compromised by mutations in the globin gene or regulatory region of this gene. More than 400 mutations have already been described, each of them may be of different clinical significance. Due to limited diagnostics there is still much to be learned about thalassemias, especially α -thalassemia, in the Polish population. This review aims to describe the pathophysiology, molecular basics and diagnostics of thalassemia from the Polish perspective and experience.

Key words: thalassemia, mutation, pathophysiology, hemolytic anemia, hemoglobinopathy

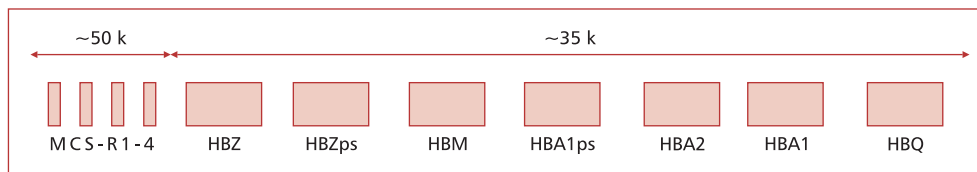
Hematologia 2013; 4, 3: 239–256

Wprowadzenie

Talasemie to heterogenna grupa genetycznie uwarunkowanych niedokrwistości hemolitycznych wynikających z zaburzeń syntezy białkowych części hemoglobiny (Hb), spowodowanych mutacjami w kodujących je genach, w wyniku których dochodzi do obniżenia lub całkowitego braku ekspresji poszczególnych łańcuchów globin, a w konsekwencji

do zachwiania wzajemnych proporcji między różnymi typami Hb występującymi u człowieka. Najczęściej zaburzenia dotyczą ekspresji α (alfa)-globiny (α -talasemia) lub β (beta)-globiny (β -talasemia), choć występują także talasemie związane z obniżoną syntezą innych globin, na przykład δ (delta)-globiny. Talasemie są tak zwanymi hemoglobinopatiami ilościowymi. Inną jednostką chorobową stanowią hemoglobinopatie jakościowe, w których

Adres do korespondencji: Ewa Brojer, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–791 Warszawa, tel./faks: 22 349 66 11, e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl



Rycina 1. Schematyczny obszar chromosomu 16 obrazujący położenie genów należących do klastra α -globiny; MCS-R1-4 — elementy regulatorowe; Hb — hemoglobina; ps — pseudogen; Z — zeta; M — mu; Q — theta; A1 — α 1; A2 — α 2; k — tysiąc par zasad

Figure 1. Schematic view on α -globin gene cluster localized on chromosom 16; MCS-R1-4 — regulatory elements; Hb — hemoglobin; ps — pseudogene; Z — zeta; M — mu; Q — theta; A1 — α 1; A2 — α 2; k — one thousand base pairs

występują Hb patologiczne, na przykład HbS, która w swej homozygotycznej postaci prowadzi do anemii sierpowatej [1]. Ta grupa schorzeń nie będzie w niniejszej pracy omawiana.

W odniesieniu do talasemii stosuje się też inne nazwy: „niedokrwistość śródziemnomorska” (*thalassa* — ‘morze’ + *haima* — ‘krew’; z greki: ‘z okolic morza’ — nazwa związana z występowaniem choroby w rejonie Morza Śródziemnego) lub „niedokrwistość tarczowatokrwinkowa” (nazwa związana z wyglądem krwinek), a ciężka (*major*) postać β -talasemii jest określana jako „niedokrwistość Cooleya”, od nazwiska pediatry, który ją opisał w 1925 roku [2, 3].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie podstawowych informacji dotyczących występowania, patofizjologii i objawów klinicznych talasemii (α - i β -talasemii), podstaw molekularnych tej choroby oraz podstawowych metod biochemicznych i molekularnych, które są wykorzystywane do jej diagnozowania w Polsce i na świecie. Przedstawiono również przegląd opublikowanych danych dotyczących talasemii w Polsce.

Epidemiologia talasemii na świecie

Talasemie stanowią obecnie problem globalny, gdyż wraz z migracją ludności wywodzącej się z rejonów basenu Morza Śródziemnego, Bliskiego Wschodu, Północnej Afryki i Azji Południowej pojawiły się w populacjach Europy, obu Ameryk i Australii [4]. Talasemie są coraz częściej diagnozowane między innymi dzięki dostępności odpowiednich metod badawczych. Uważa się, że α - i β -talasemie wywodzą się głównie z tych rejonów świata, gdzie występował zarodek malarii, a obecność tych mutacji w populacji stanowiła selektywną ochronę przed malarią [5].

Szacuje się, że co roku rodzi się około 60 tysięcy nowych nosicieli β -talasemii, a w sumie około 1,5% ogólnej populacji ludzkiej na ziemi (80–90 mln) to

nosiciele tej niedokrwistości, przy czym 10–13% mieszka w Europie Północnej i Ameryce. Zgodnie z danymi *Thalassemia International Federation* na całym świecie tylko około 200 tysięcy pacjentów z β -talasemią *major* jest regularnie leczonych. Szacunki odnoszące się do α -talasemii wskazują, że na świecie żyje około 260 milionów nosicieli tej niedokrwistości.

Podstawowe informacje o hemoglobinie

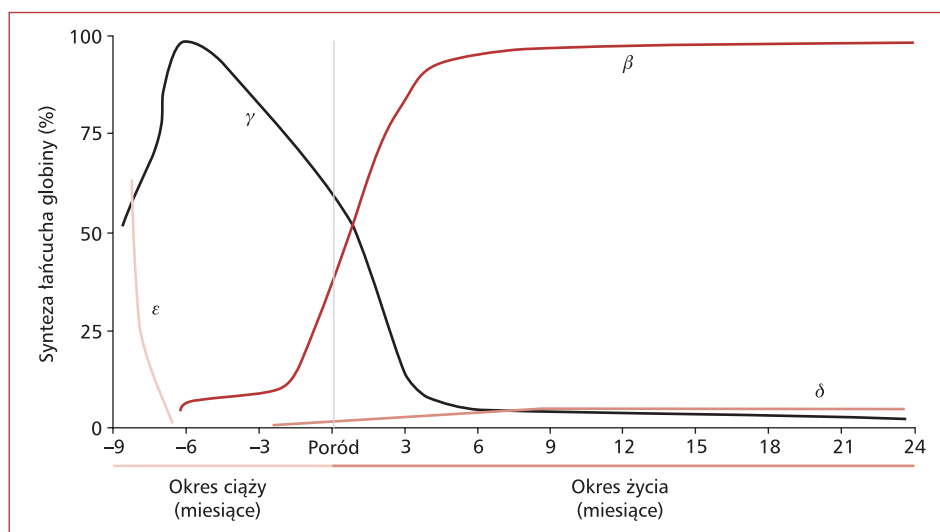
Cząsteczka prawidłowej Hb składa się z czterech podjednostek powiązanych wiązaniami kowalencyjnymi. Każda z nich jest zbudowana z cząsteczki globiny połączonej z hemem. W różnych fazach rozwoju organizmu, tj. w życiu embrionalnym, płodowym, niemowlęcym i dorosłym, Hb tworzą różne globiny [6].

Cząsteczki globin są kodowane przez geny zgrupowane w dwóch klastrach — klastrze α (ryc. 1) na chromosomie 16 (geny kodujące globiny α i ζ [zeta]) oraz klastrze β (ryc. 2) na chromosomie 11 (geny kodujące globiny β , γ [gamma], δ [delta] i ϵ [epsilon]). Geny te są umieszczone na chromosomach w takiej kolejności, w jakiej ulegają ekspresji w poszczególnych fazach rozwojowych organizmu. Wiedza o zmianach składu cząsteczki Hb w przebiegu rozwoju osobniczego powinna być brana pod uwagę w procesie diagnostycznym talasemii (ryc. 3). Początkowo, do 10. tygodnia życia, płód produkuje ϵ -globinę oraz ζ -globinę. W fazie embrionalnej dochodzi do zmian wytwarzanych Hb — produkowane są hemoglobina *Gower 1* (ζ 2 ϵ 2) i *Gower 2* (α 2 ϵ 2), a następnie hemoglobiny *Portland* (ζ 2 γ 2), aż dominującą Hb staje się hemoglobina F (HbF) złożona z dwóch łańcuchów α -globiny i dwóch łańcuchów γ -globiny. W skład większości tetrametrów Hb wchodzi α -globina, a jej poziom zwiększa się i od około 6. tygodnia ciąży utrzymuje się jej względnie stała wartość (100% ekspresji), stanowiąc 50%



Rycina 2. Schematyczny obszar chromosomu 11 obrazujący położenie genów należących do klastra β-globiny; βLCR1-5 — elementy regulatorowe; Hb — hemoglobina; ps — pseudogen; D — delta; E — epsilon; G — gamma; B — beta; k — tysiąc par zasad

Figure 2. Schematic view on β-globin gene cluster localised on chromosom 11; βLCR1-5 — regulatory elements; Hb — hemoglobin; ps — pseudogene; D — delta; E — epsilon; G — gamma; B — beta; k — one thousand base pairs



Rycina 3. Zmiany w ekspresji globin dla klastra β-globiny podczas rozwoju osobniczego. Podstawowe globiny, takie jak β-globina, δ-globina, γ-globina i ε-globina, przedstawiono schematycznie. Zaadaptowano z: Sankaran V.G., Nathan D.G. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2258–2260

Figure 3. Changes in the globin gene expression (β cluster) during ontogeny. Schematic view demonstrates the main globins of β cluster such as β-globin, δ-globin, γ-globin and ε-globin. Adapted from: Sankaran V.G., Nathan D.G. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2258–2260

całkowitego poziomu globin. Przed urodzeniem dochodzi do wyciszenia produkcji γ-globiny, a nasila się produkcja β-globiny. Po 2. roku życia i w dorosłym organizmie 96–97% Hb stanowi HbA, która składa się z dwóch łańcuchów α-globiny i dwóch łańcuchów β-globiny (α₂β₂). Oprócz HbA obecne są także HbF (α₂γ₂) (stanowi < 1%) oraz HbA₂ stanowiąca mniej niż 3,5%, w której obok dwóch łańcuchów α-globiny występują dwa łańcuchy δ-globiny (α₂δ₂) (tab. 1). W najnowszych interpretacjach opisujących zmiany ekspresji poszczególnych rodzajów globin sugeruje się, że przejście między fazą embrionalną, płodową i występującą u dorosłego człowieka przebiega dzięki współzawodnictwu między promotorami globin o ich czynniki aktywujące ulokowane powyżej miejsca startu transkrypcji. To

Tabela 1. Frakcje poszczególnych hemoglobin (Hb) w prawidłowych erytrocytach

Table 1. Hemoglobin (Hb) fractions in normal erythrocytes

Rodzaj Hb	Noworodki	Dorośli
HbA	20–40%	~96–97%
HbA ₂	0,5–1,5%	1,8–3,5%
HbF	60–80%	< 1%

współzawodnictwo może wynikać ze zmian w ekspresji lub aktywności czynników transkrypcyjnych, z którymi te promotory się łączą [7].

Gen kodujący α-globinę ma po dwie kopie na każdym z chromosomów; każda jest oznaczana odpowiednio jako α₁ i α₂. Ich sekwencje w rejonach

kodujących genu są identyczne, jednak różnią się w zakresie intronów i rejonów nieulegających translacji na końcach 3' i 5'. Dodatkowo gen $\alpha 2$ -globiny wykazuje się większą aktywnością w produkcji α -globiny, a niektóre badania sugerują, że mutacje obecne w tym genie mogą wykazywać większą siłę sprawczą. Jednak, według innych doniesień, choć ekspresja mRNA dla genu $\alpha 2$ -globiny jest ponad 2-krotnie większa, to ilość białek pozostaje na tym samym poziomie, co świadczyłoby o zmniejszonej translacji genu $\alpha 2$ -globiny w porównaniu z genem $\alpha 1$ -globiny [8, 9]. W odróżnieniu od genu α -globiny gen β -globiny, którego mutacje warunkują β -talasemię, ma po jednej kopii na każdym z chromosomów.

Ekspresja genów globin zależy między innymi od elementów regulatorowych ulokowanych daleko przed miejscem startu transkrypcji. Dla regulacji produkcji α -globiny najważniejszy jest element regulatorowy określany jako HS-40, natomiast dla β -globiny istotny jest region zwany β -LCR [10].

Patofizjologia talasemii

Zmniejszona produkcja Hb zdolnej do przeniesienia tlenu prowadzi do niedokrwistości, a zaburzenie proporcji między poszczególnymi łańcuchami globiny (niedobór lub brak jednego z łańcuchów globiny prowadzący do nadmiaru drugiego łańcucha) narusza stabilność erytrocytów i ich prekursorów, a w konsekwencji wywołuje niedokrwistość o charakterze hemolitycznym [11].

Erytrocyty chorych na talasemię są znacznie bardziej podatne na stres tlenowy niż prawidłowe krwinki. Powstałe nadtenki i inne wolne rodniki tlenu prowadzą do uszkodzeń DNA, inaktywacji enzymów i peroksydacji lipidów, na przykład uszkodzenia struktur lipidowych w błonach komórkowych, co może powodować zaburzenia w wymianie elektrolitów. Równocześnie hemichromy, produkty utleniania podjednostek globiny, modyfikują epitopy antygenów błony erytrocytów. Zmiany te sprzyjają fagocytozie i przyczyniają się do przedwczesnego niszczenia krwinek [12]. Ponadto obecność zwiększonej puli żelaza w przypadku pacjentów z talasemiami, szczególnie w cięższych postaciach choroby, także prowadzi do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*), czego konsekwencją jest powstanie uszkodzeń wielonarządowych w organizmie [13].

Zaburzenia procesów koagulacyjnych, w następstwie których może dojść do zakrzepicy, są kolejną grupą powikłań potencjalnie występujących u chorych na talasemię, szczególnie u pacjentów z β -talasemią *intermedia*. Procesy zakrzepowe

mogą wynikać z wielu czynników, na przykład związanych z zaburzonym przepływem krwi, patologicznymi zmianami w ścianach naczyń, czy też mogą być konsekwencją splenektomii. Zaobserwowano, że u pacjentów z β -talasemią następują aktywacja i agregacja płytek krwi. Poza tym talasemiczne krwinki czerwone mogą być źródłem negatywnie naładowanych fosfolipidów, które mogą podwyższyć stężenie trombiny. Dodatkowo zauważono, że krwinki czerwone u pacjentów z talasemiami, podobnie jak płytki krwi, mogą tworzyć agregaty. Czynniki przyczyniającymi się do rozwoju procesów koagulacyjnych u pacjentów z β -talasemią są także: zwiększona ilość mikrocząstek we krwi, podwyższona ekspresja śródbłonkowych białek adhezyjnych, takich jak: cząsteczki adhezji komórkowej 1 (ICAM-1, *intercellular cell adhesion molecule 1*), cząsteczki adhezji komórek śródbłonka 1 (ECAM-1, *endothelial cell adhesion molecule 1*), obniżony poziom białek antykoagulacyjnych, na przykład białek C i S, czy też obniżenie stężenia tlenu azotu, co prowadzi do skurczu naczyń krwionośnych, a w konsekwencji na przykład do nadciśnienia płucnego [14].

Mutacje genów prowadzące do talasemii

Jak już wspomniano, nieprawidłowa produkcja α - i β -globiny jest wywołana mutacjami w genach kodujących te białka lub w ich elementach regulatorowych. Talasemię klasyfikuje się jako α^+ lub β^+ , gdy obecna u chorego mutacja powoduje częściowy spadek poziomu odpowiednich łańcuchów globiny, a jako α^0 lub β^0 , gdy ekspresja białek jest zniesiona całkowicie [15]. Dotychczas w łańcuchach globin znaleziono kilkaset mutacji odpowiedzialnych za występowanie talasemii. Rodzaje tych mutacji (obecnie jest zgłoszonych 437) są rejestrowane w bazie internetowej pod linkiem podanym w tytułach tabel 2 i 3. Spośród nich najwięcej opisanych jest mutacji dla genu β -globiny. Nomenklatura mutacji nie jest ujednoczona. Używane są zarówno nazwy pochodzące od miejscowości czy kraju, w którym wykryto daną mutację, jak i nazwy zawierające informacje o charakterze mutacji występujących w danym genie. W bazie internetowej odnaleźć można odnośniki do publikacji, w których dane mutacja została opisana. Przykładowe mutacje prowadzące do β -talasemii przedstawiono w tabeli 2, natomiast dla α -talasemii — w tabeli 3.

Zarówno α -, jak i β -talasemia w większości przypadków są dziedziczone w sposób autosomalny recesywny, choć w przypadku β -talasemii zdarzają się też dominujące typy mutacji [16].

Tabela 2. Przykładowe mutacje w genie β -globiny (źródło: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>)**Table 2.** Examples of β -globin gene mutations (source: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>)

Nazwa mutacji	Typ talasemii	Rodzaj mutacji
-101 (C>T)	β^+	Substytucja C na T na 101 nt promotora β -globiny
IVS-I-6 (T>C)	β^+	Substytucja T na C na 6 nt 1. intronu β -globiny
CD39 (C>T)	β^0	Substytucja C na T na 39. kodonie β -globiny
CD6 -A	β^0	Delecja A na 6. kodonie β -globiny
AAATAAA na AATGAA	β^+	Substytucja A na G w miejscu <i>polyA</i> β -globiny
CD41/42 (-TTCT)	β^0	Delecja 4 nts między 41. i 42. kodonem β -globiny
IVS-II-745 (C>G)	β^+	Substytucja C na G na 745 nt 2. intronu β -globiny
-87 (C>G)	β^+	Zamiana C na G na 87 nt promotora β -globiny

C — cytozyna; G — guanina; A — adenina; T — tymidyna; IVS (*intervening sequence*) — intron; CD — kodon; β^+ — resztkowa produkcja β -globiny w zmutowanym genie; β^0 — całkowity brak produkcji β -globiny w zmutowanym genie; nt — nukleotydy

Tabela 3. Przykładowe mutacje w genie α -globiny (źródło: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>)**Table 3.** Examples of α -globin gene mutations (source: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>)

Nazwa mutacji	Typ talasemii	Rodzaj mutacji
MED I	α^0	Delecja 16401 nts zlokalizowanych na klastrze α -globiny tego samego chromosomu
SEA	α^0	Delecja 19301 nts zlokalizowanych na klastrze α -globiny tego samego chromosomu
THAI	α^0	Delecja 33501 nts zlokalizowanych na klastrze α -globiny tego samego chromosomu
FIL	α^0	Delecja 31851 nts zlokalizowanych na klastrze α -globiny tego samego chromosomu
$\alpha^{3,7}$ (I)	α^+	Delecja 3804 nts $\alpha 2$ -globiny
$\alpha^{4,2}$	α^+	Delecja ~4200 nts $\alpha 2$ -globiny
$\alpha^{20,5}$	α^0	Delecja 22701 nts zlokalizowanych na klastrze α -globiny tego samego chromosomu
α^{CS}	α^+	Niedelegyjna, zamiana T na C w kodonie 142. $\alpha 2$ -globiny

α^+ — resztkowa produkcja α -globiny w zmutowanym genie; α^0 — całkowity brak produkcji α -globiny w zmutowanym genie; nt — nukleotydy

Mutacje w przypadku talasemii mogą dotyczyć genów regulatorowych globin, między innymi prowadząc do zaburzonej transkrypcji. Najczęstsze są jednak mutacje w intronach i eksonach. Wpływają one między innymi na procesy translacji białka, na przykład błędnego procesu składania genu (*splicing*), czy też powodują zmianę ramki odczytu w obrębie genu.

Mutacje prowadzące do α -talasemii to najczęściej delecje jednego lub więcej genów kodujących α -globinę. Opisano też około 70 mutacji niedelegyjnych, które mogą być również dziedziczone jednocześnie z mutacjami delegyjnymi, zmieniając przy tym obraz choroby, na przykład ekspresja hemoglobiny *Constant Spring* (HbCS) [17].

Opisano również przypadki wielkich mutacji delegyjnych krótkiego ramienia 16 chromosomu,

w tym genu kodującego α -globinę i sąsiadujące z nim geny. Ta aberracja chromosomowa powoduje między innymi zaburzenia rozwoju osobniczego wraz z współistniejącym niedorozwojem umysłowym (zespół ATR16) [18]. Opisano też rzadkie przypadki pacjentów cierpiących na tak zwany zespół α -talasemii z występującym opóźnieniem umysłowym związanym z mutacjami w białku ATRX na chromosomie X [19]. Dodatkowo tak zwany zespół talasemii z zespołem mielodysplastycznym (ATMDS, *α -thalassaemia myelodysplastic syndrome*), również związanym z α -talasemią, występuje głównie u starszych mężczyzn ze stwierdzoną mielodysplazją i dotyczy nabytych mutacji w genie kodującym białko ATRX [20].

Większość mutacji w genie β -globiny to mutacje punktowe, choć β -talasemia może wynikać również z mutacji delegyjnych w obrębie genu

β -globiny (np. delecja obejmująca δ - i β -globinę). Niekiedy obserwuje się także duże delecje w odległym regionie LCR kontrolującym ekspresję całego zespołu genów β -globiny [21].

Objawy kliniczne talasemii

Najbardziej ogólny obraz objawów klinicznych charakteryzujących α - i β - talasemię to niedokrwistość o różnym stopniu nasilenia, mikrocytoza z hipochromią, a także hemoliza. Należy przy tym zaznaczyć, że rozwój choroby, a także występowanie określonych objawów klinicznych u pacjentów, zależą od rodzaju mutacji określonej globiny [6, 16, 21, 22]. Poniżej zamieszczono ogólną charakterystykę kliniczną poszczególnych postaci α - i β -talasemii.

Alfa-talasemia

Gdy tylko jeden z czterech genów jest zmutowany (genotyp: $-\alpha/\alpha$) (znak „-” oznacza obecność mutacji w genie α -globiny), to morfologia krwi na ogół wykazuje prawidłowe wartości lub jedynie niewielki spadek stężenia Hb. Stan ten to nosicielstwo α -talasemii. Dwa zmutowane geny (dwa z jednego chromosomu lub po jednym z każdego chromosomu) prowadzą do tak zwanej cechy α -talasemii (α -talasemia *trait*). W tej postaci objawy kliniczne zazwyczaj są łagodne — w badaniu morfologii krwi obserwuje się mikrocytozę i niewielki spadek stężenia Hb. Złożone heterozygoty lub homozygoty z poważnymi molekularnymi defektami w obrębie genu α -globiny (gdy 3 kopie genu są dotknięte mutacjami) prowadzą do rozwoju tak zwanej choroby hemoglobiny H (HbH). Wynikiem jest tworzenie się niefunkcyjnych tetrametrów złożonych z czterech łańcuchów β -globiny (HbH), którą cechuje wysokie powinowactwo do tlenu, a zatem hemoglobina ta słabo przenosi go do tkanek. Erytrocyty chorych zawierają liczne ciała inkluzyjne, możliwe do wykrycia poprzez barwienie krwi 1-procentowym błękitem brylantowo-krezylowym (*Brilliant Cresyl Blue*). Ich niewielka liczba obecna jest również w erytrocytach nosicieli ($-\alpha/\alpha$) i u pacjentów z mutacjami niedelecyjnymi.

U chorych z HbH obok niedokrwistości można zaobserwować powiększenie śledziony, kamice żółciową oraz żółtaczkę, a u dzieci może wystąpić opóźnienie wzrostu. Do pogłębienia niedokrwistości może dojść w przypadku niedoboru kwasu foliowego, infekcji, stresu oksydacyjnego i ciąży. We krwi obwodowej chorych z HbH może ona stanowić do 40% całkowitej Hb, przy równoczesnym spadku (nawet > 70%) ilości α -globiny. Należy zauważyć, że u pacjentów z muta-

cjami delecyjnymi choroby HbH przebieg choroby jest łagodniejszy i ma znikomy wpływ na ich codzienne życie w porównaniu z pacjentami z niedelecyjnymi typami mutacji genu α -globiny.

Brak ekspresji wszystkich czterech genów α -globiny powoduje tworzenie tak zwanej hemoglobiny Bart's, złożonej z czterech łańcuchów γ -globiny, z całkowitym brakiem łańcuchów α -globiny. Prowadzi to do obrzęku płodu i śmierci dziecka najczęściej w drugiej połowie ciąży lub zaraz po urodzeniu, choć coraz częściej opisywane są przypadki efektywnego leczenia [22].

Beta-talasemia

Wyróżnia się trzy grupy β -talasemii: *minor*, *intermedia* i *major*. Pacjenci ze zdiagnozowaną β -talasemią *minor* przeważnie żyją bez objawów chorobowych, choć może u nich wystąpić łagodna niedokrwistość wynikająca ze spadku ilości Hb w erytrocytach. Zdarzają się jednak nosiciele, u których występują splenomegalia, łagodne zmiany w kościach i nerkach oraz kamica żółciowa. U kobiet w ciąży może się rozwinąć poważna niedokrwistość wymagająca suplementacji kwasem foliowym i transfuzji. Diagnostyka tej talasemii jest istotna, ponieważ u rodziców — nosicieli β -talasemii *minor* występuje 25-procentowe ryzyko posiadania dziecka z homozygotyczną ciężką postacią β -talasemii [23–27].

Odnotowywanych jest coraz więcej przypadków łączących nosicielstwo cech β -talasemii z wystąpieniem zaburzeń autoimmunizacyjnych, astmy, cukrzycy, zapalenia nerek, zapalenia stawów, fibromialgii i innych. Ta zależność może wynikać z bliskości genów otaczających gen β -globiny na chromosomie, a pełniących rolę w regulacji układu immunologicznego. Tymi genami są między innymi STIM1 (*stromal interaction molecule 1*), TC21/RRAS2 (*related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2*), CD151, pp52/LSP1 (*lymphocyte specific protein 1*), TRIM21 (*tripartite motif containing 21*) czy też *toll interacting protein* (TOLLIP). Dodatkowa hipoteza postuluje, że zależność między nosicielstwem β -talasemii a równoczesnym występowaniem choroby autoimmunologicznej może być związana ze spadkiem ilości hemorfin. Związki te należą do grupy endogennych peptydów opioidowych i wywodzą się z proteolitycznego cięcia Hb. Hemorfiny działają jako substancje przeciwzapalne, a spadek ich stężenia u nosicieli β -talasemii może wyjaśniać stan prozapalny i prowadzić do powstawania chorób autoimmunizacyjnych [28].

Beta-talasemia *major* jest silnie objawową i najcięższą postacią β -talasemii. Pierwsze obja-

wy kliniczne pojawiają się między 6. miesiącem a 2. rokiem życia. U dziecka mogą wystąpić między innymi problemy związane z łaknieniem, nawracające epizody gorączki, a także hepato- i splenomegalia. Dodatkowo, jeśli nie stosuje się skutecznego leczenia, pojawiają się kliniczne objawy, takie jak: opóźnienie wzrostu, bladość, żółtaczka, owrzodzenia nóg, różnego typu zmiany kostne wynikające z ekspansji szpiku kostnego. Z kolei pacjenci poddawani przetoczeniu preparatów krwiopochodnych mogą przejawiać różnego typu komplikacje wynikające z przeładowania żelazem. U dzieci może to prowadzić do opóźnienia wzrostu i zaburzenia dojrzewania seksualnego, a w wieku dojrzłym — do niewydolności serca, wątroby, układu endokrynnego oraz powstawania zakrzepicy żylny i osteoporozy. Transfuzje zwiększają też prawdopodobieństwo zakażeń okołotransfuzyjnych. Jednak regularne transfuzje i terapia chelatująca przedłużają życie i polepszają jego jakość.

Beta-talasemia *intermedia* różni się od talasemii *major* łagodniejszą postacią niedokrwistości, później występującymi objawami klinicznymi i tym, że pacjenci często nie wymagają regularnych transfuzji. Liczba transfuzji w ciągu roku jest wskaźnikiem, który odróżnia klinicznie β -talasemię *intermedia* od β -talasemii *major*. Jeśli wymagania transfuzyjne osiągają więcej niż 8 jednostek na rok, wtedy β -talasemia *intermedia* jest reklasyfikowana na β -talasemię *major*. Jednak różnorodność i szerokie spektrum objawów klinicznych, a także liczba mutacji prowadzących do powstania β -talasemii *intermedia* u części pacjentów mogą się objawiać prawie bezobjawową postacią *intermedia* z niewielką niedokrwistością, zaś u pozostałych pacjentów inne rodzaje mutacji mogą prowadzić do ciężkich przypadków powodujących objawy kliniczne między 2. a 6. rokiem życia, z możliwym opóźnieniem wzrostu i rozwoju. Śmierć pacjentów z najcięższymi postaciami β -talasemii najczęściej następuje z powodu przewlekłej niedokrwistości i jej powikłań (hemosyderoza wtórna), takich jak nadciśnienie płucne, niewydolność serca lub wątroby [29].

Diagnostyka talasemii

Podstawami diagnostyki talasemii są przeprowadzenie wywiadu lekarskiego w celu wykrycia ewentualnych rodzinnych uwarunkowań występowania choroby oraz badanie morfologii krwi pozwalające na wykrycie nieprawidłowości. Zaobserwowanie w badaniu krwi mikrocytozy z hipochromią, spadku stężenia Hb, a dodatkowo wysokie stężenie żelaza, pozwalają na zakwalifiko-

wanie pacjenta do dalszych badań diagnostycznych w kierunku talasemii. Należy pamiętać o tym, że osoby z niewielkimi defektami w syntezie globin mogą wykazywać prawidłowe wartości Hb w badaniu morfologii krwi. Oprócz wyżej wymienionych badań istotne jest określenie liczby retikulocytów, wykonanie rozmazu krwi, a także barwienia krwi, na przykład w celu poszukiwania ciałek Heinzów oraz HbH [30].

Kolejne etapy diagnostyki oparte są na technikach biochemicznych, a także technikach biologii molekularnej. Te ostatnie są szczególnie potrzebne do zdiagnozowania α -talasemii, której nie można zdiagnozować technikami biochemicznymi.

Najczęściej wykorzystywane metody diagnostyczne w talasemii opisano w dalszej części pracy. Należy przy tym zauważyć, że w przypadku talasemii stopień niedokrwistości i „jakość” parametrów krwi mogą być maskowane lub uwydatniane przez współistniejące zaburzenia w produkcji Hb, takie jak: współtowarzyszące hemoglobinopatie, na przykład obecność hemoglobiny S (HbS), hemoglobiny C (HbC), hemoglobiny E (HbE), oraz inne zaburzenia, takie jak wspomniany wyżej zespół ATRX czy też współdziedziczenie β - i α -talasemii.

Określenie poziomu HbA₂

Ilościowe oszacowanie stężenia HbA₂ jest jednym z najbardziej wartościowych parametrów diagnostycznych dla β -talasemii. Techniki stosowane w tym badaniu omówiono w następnym podrozdziale. Prawidłowe wartości HbA₂ wahają się w granicach 1,9–3,5%, mogą się jednak nieznacznie różnić zależnie od zastosowanej metody i laboratorium diagnostycznego. Trzeba również zaznaczyć, że badanie HbA₂ u dziecka do 8. miesiąca życia nie pozwala ustalić ostatecznego, prawdziwego poziomu ekspresji tej Hb (opisano w rozdziałach wcześniej).

Wartości HbA₂ powyżej 3,8% uznaje się za wskaźnik nosicielstwa cechy β -talasemii. Gdy wartości te są zdecydowanie podwyższone, tj. przekraczają 8% HbA₂, należy rozważyć obecność innych patologicznych Hb, na przykład HbE, HbC. U nosiciela β -talasemii poziom HbA₂ nigdy nie będzie tak wysoki, a te patologiczne Hb eluują (zależnie od metody) razem z HbA₂ [31]. Należy zwrócić uwagę, że różne metody stosowane w diagnostyce dają różne możliwości rozdziału HbA₂ od pozostałych Hb. Przy interpretacji wyników zawsze trzeba więc brać pod uwagę to, jakie możliwości rozdziału HbA₂ od innych Hb ma zastosowana do badań technika.

Trudne przypadki w interpretacji wyników mogą się wiązać z wartościami HbA₂ w górnej

graniczy normy, czyli mieszczącymi się między 3,3% a 3,8% całkowitej Hb. Te graniczne wartości HbA₂, przy równoczesnym zmniejszeniu średniej objętości krwinki (MCV, *mean corpuscular volume*) i średniej zawartości hemoglobiny (MCH, *mean corpuscular hemoglobin*), mogą wynikać z obecności „łagodnej” mutacji w przypadku β⁺-talasemii, mutacji w promotorze β-globiny, współdziedziczenia δ- i β-talasemii, a także współobecności β-talasemii z niedoborem żelaza. W przypadku gdy wartości MCH i MCV są w normie, a występuje granicznie podwyższony poziom HbA₂, należy rozważyć błąd metodologiczny w badaniu lub naturalnie występującą w populacji wartość skrajną odzwierciedlającą krzywą Gaussa. Przyczyny występowania takich wartości (więcej informacji o wartościach HbA₂ zamieszczono poniżej) u niektórych osób nie są znane. Być może wynikają z nieznanego jeszcze czynnika genetycznego podwyższającego poziom HbA₂, na przykład triplikacji genu α-globiny, mutacji w promotorze β-globiny, mutacji w genie *Kruppel-like factor 1* (KLF1) czy innych mutacji w genie β- i δ-globiny. Badania przeprowadzone we Włoszech świadczą o tym, że około 2,5% (wg innego badania nawet 16%) przypadków diagnostycznych wykazuje wartości graniczne [32, 33].

W przypadku β-talasemii *major* (zależnie od tego, czy postać homozygotyczna, czy złożona heterozygotyczna) poziom HbA₂ może się wahać od 2% do 5% (przy HbA 0–30%; HbF 70–98%). Pacjentów z β-talasemią *intermedia* cechuje szerokie spektrum wartości parametrów hematologicznych, zarówno tych zbliżonych do obrazu charakterystycznego dla β-talasemii *minor*, jak i tych opisujących β-talasemię *major* [21].

Obniżony lub pozostający na dolnej granicy normy poziom HbA₂ może wskazywać na cechę α-talasemii, choć w dużej części przypadków α-talasemii wartości HbA₂ mogą nie odbiegać od normy, a dalsza diagnostyka musi się opierać na metodach biologii molekularnej. Jedynie w przypadku choroby HbH wartość HbA₂ może być znacznie obniżona [34, 35].

Mimo że poziom ekspresji HbA₂ jest jednym z najważniejszych kryteriów diagnostyki w kierunku talasemii, szczególnie β-talasemii, to jej poziom może ulegać zmianom także w wyniku działania innych czynników — zarówno wrodzonych, jak i nabytych podczas życia osobniczego. W niektórych przypadkach można zaobserwować wartości HbA₂ powyżej normy, między innymi przy anemii megaloblastycznej (wynikającej z deficytu kwasu foliowego i witaminy B₁₂), zakażeniu ludzkim wirusem niedoboru odporności, nadczynności tarczycy

i terapii niektórymi lekami, na przykład zydowudyną. Niektóre przypadki wrodzonego, podwyższonego poziomu HbA₂ dotyczą pacjentów między innymi z niestabilnymi Hb, anemią sierpowatą i niektórymi pozostałymi hemoglobinopatiami, wrodzoną niedokrwistością dyserytropoetyczną (niektóre przypadki izraelskich Beduinów), dziedziczną (osobniczą) wysoką ekspresją HbA₂. Wartość HbA₂ może być natomiast obniżona w przypadku deficytu żelaza oraz w niektórych przypadkach niedokrwistości wynikającej z chorób przewlekłych, niedokrwistości syderoblastycznej, niedokrwistości aplastycznej, niedoczynności tarczycy i białaczek. Z kolei wrodzone przyczyny obniżonego poziomu HbA₂ mogą wynikać na przykład z δ-talasemii oraz z hemoglobinopatii (np. hemoglobina *Lepore* lub *Kenia*). Istnieją złożone przypadki współdziedziczenia różnych typów talasemii i hemoglobinopatii, które mogą wpływać na obraz poziomu ekspresji HbA₂. Wymienione przykłady nie mogą być jedynym kryterium diagnostycznym — to wyłącznie przegląd przypadków, w których prawidłowa diagnoza nie jest możliwa. Dodatkowo, na przykład, zawyżona wartość HbA₂ u pacjentów z heterozygotyczną postacią HbS może sugerować β-talasemię (jeśli nie przeprowadzi się dodatkowych badań). Podobnie współistnienie δ-talasemii z β-talasemią może maskować poziom HbA₂ niezbędny do wykrycia β-talasemii [36].

Techniki badania hemoglobiny A₂

Badanie wykonuje się głównie technikami chromatograficznymi, takimi jak wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), chromatografią kapilarną (CE, *capillary electrophoresis*), a także chromatografią z wykorzystaniem technik kolumnkowych [37]. Wybór metody zależy od poszczególnych laboratoriów. Na świecie najszerzej wykorzystuje się technikę HPLC. Jest zautomatyzowana i pozwala na uzyskanie pełnego obrazu ilości Hb, a szczególnie HbA, HbA₂ i HbF oraz podstawowych patologicznych odmian Hb, takich jak HbS, HbC, HbD oraz HbE. Za pomocą HPLC wykrywa się także frakcje Hb Bart's i HbH [38], co jest również istotne dla diagnostyki talasemii. Technikami biochemicznymi zyskującymi coraz więcej na znaczeniu są metody elektroforetyczne oparte na elektroforezie kapilarnej, na przykład w instrumentach *Minicap* i *Capillars 2*. Rozdział elektroforetyczny przebiega w fazie ciekłej, a identyfikacja frakcji Hb przy odpowiedniej długości fali mierzonej spektrofotometrycznie jest automatyczna [39]. To szybka, efektywna metoda i o wysokiej specyficzności.

Konwencjonalne metody elektroforetyczne, na przykład elektroforeza w żelu agarowym, w buforze zasadowym i/lub kwaśnym także są wykorzystywane do diagnostyki. Techniki te są przydatne przy prowadzeniu diagnostyki różnicowej, na przykład w przypadku obecności podwyższonej wartości HbA₂ we krwi wykrytej techniką mikrochromatografii kolumnkowej, a wynikającej z obecności na przykład HbE lub HbS. Należy zaznaczyć, że jest to metoda czasochłonna i często nieskuteczna w wykrywaniu małych ilości różnych wariantów Hb.

Określenie poziomu HbF

Hemoglobina F jest główną Hb płodu i noworodków. Jak już wcześniej wspomniano, ilość HbF ulega zmianom, zarówno w czasie rozwoju płodowego, jak i w okresach noworodkowym i niemowlęcym, ostatecznie stabilizując się u zdrowego człowieka około 2. roku życia [40]. Wykrywanie i oszacowanie poziomu HbF to ważne kryterium prognostyczne dla β -talasemii i anemii sierpowatej, ponieważ podwyższone wartości HbF w przypadku tych jednostek chorobowych mogą być powiązane z łagodniejszym fenotypem i lżejszym przebiegiem choroby [41]. W przypadku β -talasemii *minor* poziom HbF może, ale nie musi, być podwyższony. Zależnie od metody badawczej normy dla HbF mogą się różnić, dlatego ważne jest wyraźne zaznaczenie przyjętych wartości referencyjnych dla danego laboratorium diagnostycznego.

Wartość HbF powyżej normy może się również utrzymywać w przypadku wystąpienia dziedzicznej $\delta\beta$ -talasemii oraz HPFH (*hereditary persistence of fetal hemoglobin*). Może być też podwyższona podczas ciąży, u chorych z niedokrwistością aplastyczną, podczas rekonwalescencji po przeszczepieniu szpiku oraz w przewlekłej białaczce szpikowej u dzieci [36]. W przypadku α -talasemii poziom HbF pozostaje w normie lub ta Hb jest całkowicie nieobecna.

Diagnostykę HbF, podobnie jak HbA₂, wykonuje się głównie metodami chromatograficznymi, takich jak HPLC czy CE. Alternatywne metody mogą być oparte na denaturacji alkalicznej, a także wykorzystaniu metod immunologicznych, takich jak ELISA czy cytometria przepływowa. Tę ostatnią wykorzystuje się w diagnostyce przecieku matczyno-płodowego, wykrywania HPFH i do monitorowania leczenia hydroksymocznikiem (HU, *hydroxyurea*), który indukuje ekspresję HbF, na przykład u pacjentów z anemią sierpowatą [42].

Badania białek globin

Chromatografia powinowactwa

Podstawą najnowszych metod badawczych jest badanie wolnej puli α -globiny, której ilość wzrasta w przypadku β -talasemii. W metodzie tej wykorzystuje się specyficzne białka chaperonowe — opiekuńcze (AHSP, *alpha hemoglobin stabilizing protein*), uczestniczące w procesie prawidłowego zwijania innych białek, które łączą się tylko do α -globiny, natomiast nie tworzą kompleksów z β -globiną oraz tetramerami HbA. Dzięki swej specyficzności pozwalają na czułą detekcję wolnej α -globiny. Metoda jest oparta na chromatografii powinowactwa, w której na kolumnie zostają kompleksy α -globiny i AHSP, a pozostałe białka, w tym β -globina, są wymywane. Następnie z kolumny eluuje się α -globinę i jej ilość jest badana spektrofotometrycznie. Zgodnie z najnowszymi publikacjami metoda ta może się stać bardzo pomocnym badaniem przesiewowym w talasemii, w tym u noworodków, a także do sprawdzenia efektywności leczenia, na przykład HU, co opisano w dalszej części pracy [43].

Techniki immunochromatograficzne

Bardzo prostym badaniem przesiewowym, wykorzystującym techniki immunochromatograficzne, jest na przykład GPO α -*Thal* (IC)*strip* zawierający przeciwciało monoklonalne przeciwko Hb Bart's. Ta metoda może być zastosowana do badań pacjentów obciążonych co najmniej dwoma nieczynnymi genami α -globiny w pozycji *cis* [44].

Analiza kwasów nukleinowych w diagnostyce talasemii

Metody oparte na badaniach genetycznych zaczynają mieć coraz większe znaczenie diagnostyczne, szczególnie w przypadku α -talasemii, w której metody biochemiczne nie wystarczają do postawienia diagnozy.

Obecnie nie ma jednego ustalonego schematu przeprowadzania rutynowych badań diagnostycznych technikami biologii molekularnej. Zastosowanie określonej metody zależy od wyboru dokonanego przez laboratorium diagnostyczne. Kryteriami są między innymi koszt badania i pracy, wykwalifikowanie kadry, wyposażenie laboratorium w wyspecjalizowaną aparaturę medyczną oraz, co najważniejsze, jakość otrzymanych wyników.

Najczęściej występujące mutacje prowadzące do wystąpienia talasemii zostały już poznane i znana jest częstość ich występowania w różnych populacjach. Do celów diagnostycznych w pierwszej

kolejności stosuje się więc metody pozwalające na identyfikację tych znanych mutacji.

W diagnostyce chorych, u których objawy kliniczne i wyniki badań biochemicznych wskazują na talasemię, a u których do tej pory nie wykryto znanych mutacji, konieczne jest wdrożenie metod pozwalających na identyfikację zmutowanego genu i ustalenie natury tej mutacji.

Metody identyfikowania znanych mutacji

Allelosoista hybrydyzacja (ASO PCR)

Techniki określane jako ASO (*allele specific oligonucleotide dot blot*) albo RDB odwrotny *dot blot* (*reverse dot blot*) są często stosowane (szczególnie RDB) w diagnostyce talasemii [45]. Na przykład w Indiach jest to jedna z metod wykorzystywanych do diagnostyki prenatalnej [46]. Istnieją różne odmiany tej metody. Najpopularniejsze opierają się na namnożeniu fragmentu DNA przy użyciu primerów znakowanych biotyną i hybrydyzacji produktów z sondami umieszczonymi na nylonowej membranie. Na tej membranie umieszczane są zarówno sondy komplementarne do sekwencji niezawierających mutacji, jak i do alleli z mutacjami odpowiedzialnymi za talasemię. Łączenie się namnożonej w wyniku łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) sekwencji DNA do sond i dodanie do roztworu kompleksu streptawidyna–alkaliczna fosfataza, a następnie wywołanie obrazu poprzez dodanie substratu powoduje detekcję przyłączonych fragmentów DNA. Jest to metoda szybka i relatywnie niedroga, ale wymaga wysokiej jakości pracy. Komercyjnie dostępne są jedynie zestawy pozwalające na wykrywanie najczęściej występujących mutacji.

GAP PCR

Technika GAP jest stosowana do wykrywania mutacji delecyjnych w α - oraz β -talasemii, a także innych zaburzeń delecyjnych, na przykład $\delta\beta$ -talasemii czy delecyjnego HPFH. Primery użyte do badań techniką PCR są komplementarne do odległych od siebie fragmentów genów. W przypadkach gdy gen nie jest zmutowany, tj. nie posiada delecji, nie otrzymuje się produktu amplifikacji, bo odległość między dwoma primerami jest zbyt duża, by polimeraza w zadanym czasie namnożyła tak długi fragment DNA. Delecja w sekwencji nukleotydowej sprawia, że odległość od siebie obu primerów jest mniejsza, co pozwala na amplifikację danego fragmentu i jego wizualizację na żelu podczas elektroforezy. Możliwe jest również zaprojektowanie primerów do różnicowania genu niezmutowanego od genu z niewielką delecją.

Wtedy produkty amplifikacji genów zmutowanych i niezmutowanych będą różniły się wielkością. Opublikowane w piśmiennictwie protokoły diagnostyczne α -talasemii oparte na multipleksowym GAP PCR pozwalają na wykrycie mutacji delecyjnych siedmiu najpopularniejszych delecji ($-\alpha^{3,7}$; $-\alpha^{4,2}$; $_{-SEA}$; $_{-MED}$; $_{-FIL}$; $_{-THAI}$; $-\alpha^{20,5}$) i dodatkowo jednej mutacji typu niedelecyjnego *Constant Spring* [47, 48]. Zastosowanie innych niż opublikowane par primerów jest możliwe w celu rozszerzenia możliwości diagnostycznych tą techniką.

ARMS (amplification-refractory mutation system)

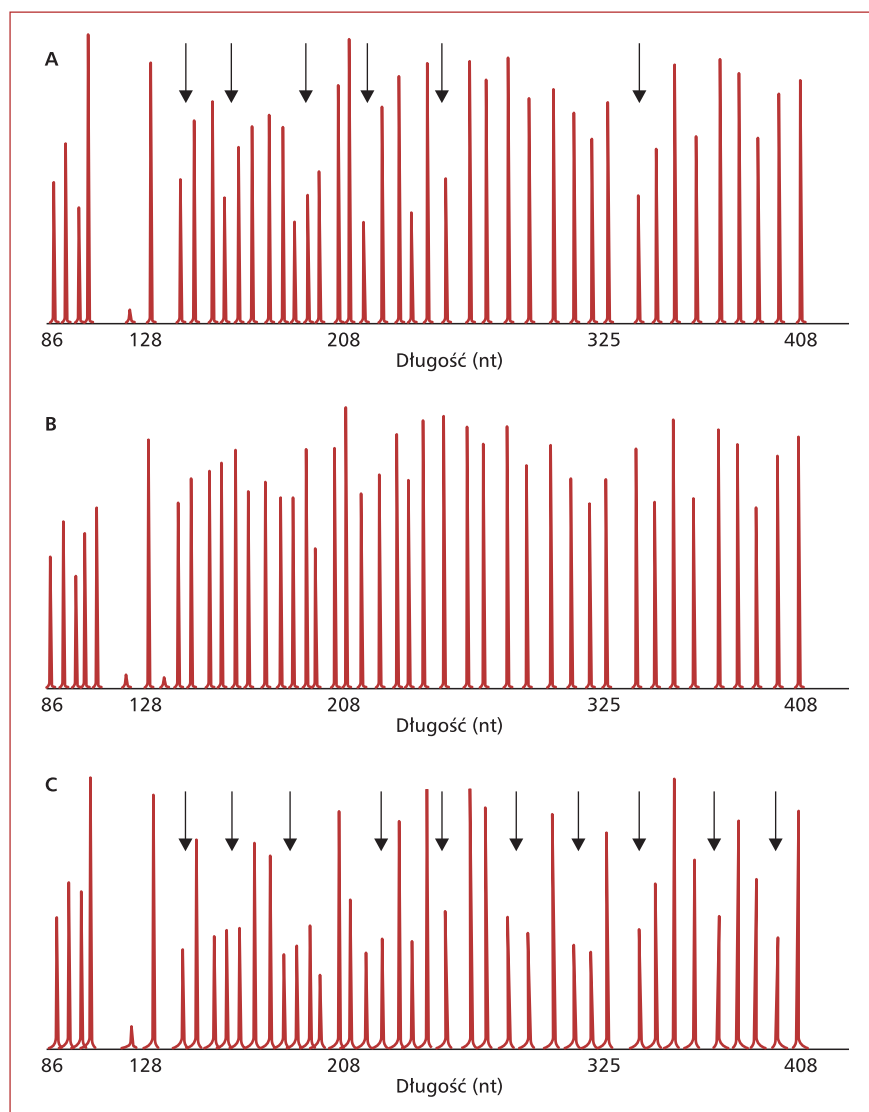
Technika ARMS jest oparta na zastosowaniu w reakcji PCR specyficznych primerów (SSP, *sequence specific primers*) komplementarnych do określonej sekwencji genu globiny, posiadających na swoim końcu 3' nukleotyd komplementarny do nukleotydu obecnego w zmutowanym genie. Drugi primer stosowany w danej reakcji jest komplementarny do sekwencji konserwatywnej genu. Gdy badane DNA zawiera zmutowany gen, to swoisty primer przyłączy się do niego i będzie generować powstawanie produktu PCR. U osoby zdrowej DNA nie ulegnie amplifikacji. Jest to metoda szybka i relatywnie niedroga, jednak do oceny różnych mutacji punktowych konieczne jest zastosowanie wielu reakcji PCR. Technikę ARMS stosuje się szczególnie w diagnostyce β -talasemii, która najczęściej wynika z mutacji punktowych w klastrze β -globiny [49].

MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

Technika MLPA jest oparta na hybrydyzacji sond swoistych dla sekwencji zmutowanego genu, a następnie do ich połączenia się (ligacji) i namnożenia specyficznego fragmentu o określonej liczbie par zasad. Przykładowe rezultaty otrzymane po rozdziale podczas elektroforezy kapilarnej przedstawiono na rycinie 4. Badanie ma charakter ilościowy i pozwala na określenie liczby kopii danego genu. Istnieją komercyjne zestawy pozwalające na wykrywanie wielu rodzajów mutacji dla α - i β -talasemii [50].

Ilościowa PCR

Do wykrywania mutacji delecyjnych stosuje się metodę tak zwaną ilościową PCR (qPCR, *quantitative PCR*). Do oceny ilości produktu amplifikacji można zastosować barwnik *SybrGreen*, który łączy się z dwuniciowym DNA. Intensywność fluorescencji zależy więc od ilości produktu



Rycina 4A–C. Reakcja MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) przedstawiająca wyniki u 2 pacjentów (**A, C**) i jednego zdrowego dawcy (**B**). Analiza wielkości fragmentów na histogramie uwidacznia różne wielkości pików w badanych próbkach. Pacjent A — $\alpha^{3,7}$ (mutacja RW); pacjent C — mutacja HIL lub THAI. Schematyczny obraz histogramu — może się zmieniać zależnie od użytych reagentów; nt — nukleotydy

Figure 4A–C. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay of 2 patients (**A, C**) and one healthy control (**B**). Fragment length analysis demonstrates different peaks height for each sample material. Patient A — $\alpha^{3,7}$ (RW mutation); patient C — HIL or THAI mutation. Schematical view of histogram — may vary depending on reagents used; nt — nucleotide

wygenerowanego podczas PCR. Równoczesna analiza krzywej topnienia pozwala na zbadanie specyficzności reakcji. W przypadku badania diagnostycznego, na przykład α -talasemii, wystąpienie różnych mutacji delecyjnych generuje powstanie różnych produktów reakcji, które mają różne temperatury topnienia. Na ich podstawie można stwierdzić obecność lub brak mutacji sprawczej [51]. Do diagnostyki wykorzystuje się również inne barwniki, znakowane primery, a także specyficzne

sondy, na przykład typu *TaqMan*, *Molecular beacons* i inne. Pozwalają one na precyzyjną ilościową analizę mutacji w α - i β -talasemii.

Przesiewowe metody wykrywania mutacji oraz ich dalszej charakterystyki Analiza fragmentów restrykcyjnych i technika Southern blot

Technika *Southern blot* jest najstarszą techniką analizy mutacji, w tym mutacji odpowiedzialnych

za powstanie chorób, na przykład talasemii. Jest to metoda czasochłonna i trudna technicznie, lecz nadal wykorzystywana przy poszukiwaniu i identyfikowaniu nowych lub rzadkich mutacji.

Powstanie mutacji prowadzącej do β -talasemii często tworzy lub usuwa miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych. Obecność takiej mutacji może być wykryta na podstawie aktywności enzymów restrykcyjnych i wizualizacji tego cięcia na żelu w procesie elektroforezy [52]. Jest to jednak technika coraz rzadziej wykorzystywana, choć w niektórych laboratoriach nadal stosowana w diagnostyce.

Spektrometria mas

Metody oparte na spektrometrii mas mogą być wykorzystane do ustalenia strukturalnych zmian w budowie łańcuchów DNA kodującego globiny, a co za tym idzie — do pośredniego ustalenia na przykład rodzaju aminokwasu, który uległ zmianie. To metoda bardzo czuła i precyzyjna, ale wymagająca wysoce specjalistycznego sprzętu. W przypadku talasemii również są podejmowane próby użycia tej metody. W jednej z prac opisano wykorzystanie spektrometrii mas (platforma MALDI-TOF) do diagnostyki β -talasemii; 27 potencjalnych mutacji wykrywano przy użyciu reakcji multipleksowych. Rezultaty tej diagnostyki porównywano z wynikami uzyskanymi techniką ARMS. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że spektrometria mas może być bardzo skuteczną alternatywą dla innych metod diagnostycznych talasemii [53].

Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie to ważne badanie diagnostyczne w talasemii. Pozwala na wykrywanie nowych i/lub rzadko występujących mutacji. Jest to jednak metoda relatywnie droga, szczególnie gdy badanie musi objąć długie fragmenty DNA.

Badania oparte na analizie RNA

W odniesieniu do talasemii, obok badań DNA, wykorzystuje się badania RNA. Ilościowa ocena mRNA dla α - i β -globiny za pomocą qPCR pozwala na ustalenie wzajemnego stosunku liczby syntetyzowanych łańcuchów globin. Stosunek mRNA α/β -globiny może być ilościowym wskaźnikiem biosyntezy łańcuchów globiny. Jeśli jest on mniejszy niż 0,8, to może wskazywać na α -talasemię, jeśli natomiast przekracza 1,3, to może oznaczać β -talasemię. W α -talasemii proporcja ilości mRNA α - i β -globiny wynosząca około 0,75 powinna odpowiadać utracie funkcji jednego genu kodującego α -globinę, wartość 0,5 — dwóch genów, a 0,25 — trzech genów. Należy jednak pamiętać,

że w kilku opisanych mutacjach i innych współdziedziczonych hemoglobinopatiach, na przykład niektórych mutacjach β -talasemii ze współistniejącą α -talasemią, ta proporcja może wykazywać prawidłowe wartości [54].

Techniki oparte na analizie konformacji łańcuchów DNA — wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa

Kolejną metodą diagnostyczną jest wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (DHPLC, *denaturing high pressure liquid chromatography*), który pozwala na wykrywanie nieznanymi mutacji i polimorfizmów w określonym odcinku DNA. Fragment DNA kodujący badaną globinę poddaje się amplifikacji w reakcji PCR. Uzyskany produkt, zawierający namnożone fragmenty — zarówno te z poszukiwaną mutacją, jak i te bez mutacji — poddaje się denaturacji (rozdzieleniu na pojedyncze łańcuchy), a następnie renaturacji (połączenie w struktury dwuniciowe). Różnica nawet jednego nukleotydu powoduje widoczną zmianę we wzorze rozdziału na kolumnie DHPLC. Metoda ta jest zautomatyzowana, szybka, nie wymaga barwienia i jest wysoce specyficzna, a jednocześnie można ją połączyć z techniką diagnostyczną MLPA [55].

Talasemie w Polsce — epidemiologia i diagnostyka

Do niedawna przyjmowano, że w Polsce talasemie nie występują. Wystąpienie tej choroby opisywano jako przypadki kazuistyczne [56]. Prewalencja β -talasemii *minor* w polskiej populacji jest trudna do oszacowania. Teoretyczne obliczenia wskazują, że może ona wynosić nawet 1,4% (górną próg prewalencji). Najprawdopodobniej jest to jednak wynik zawyżony [57].

Pierwszą pracę naukową dotyczącą analizy dużej grupy pacjentów opublikowano w 2006 roku. Badano 600 osób z mikrocytozą bez oznak niedoboru żelaza. U wszystkich oznaczono wartości HbA₂, HbF oraz bilirubiny. Podwyższony poziom HbA₂ stwierdzono u 106 pacjentów, podwyższony poziom HbF — u 48, a 42 charakteryzowało zwiększone stężenie bilirubiny we krwi. Analizę genetyczną przeprowadzono pod kątem 8 najczęściej występujących mutacji śródziemnomorskich w β -talasemii i u 46 pacjentów wykryto 7 z nich: IVS-I-6(T>C) — u 15 pacjentów, IVS-II-745(C>G) — u 14 pacjentów, IVS-II-1(G>A) — u 10 pacjentów, IVS-I-1(G>A) — u 2 pacjentów, CD6-A — u 2 pacjentów, CD39(C>T) — u 2 pacjentów, IVS-I-110(G>A) — u 1 pacjenta [58].

Inne badanie przeprowadzone u 224 pacjentów z północnej Polski wskazuje na istotność diagnostyki różnicowej, szczególnie odnoszącej się do niedokrwistości z niedoboru żelaza. Pacjenci w tym badaniu zostali wyselekcjonowani na podstawie między innymi takich parametrów, jak niedokrwistość o nieznanym etiologii, mikrocytoza lub niedokrwistość mikrocytarna. W badaniach wykazano, że prawie 212 (95%) pacjentów cierpiało na niedokrwistość z niedoboru żelaza, zaś u 7 pacjentów (3,12%) wykryto podwyższony poziom HbA₂ bez niedoboru żelaza. Dodatkowo Kaczorowska-Hać i wsp. [59] zwracają uwagę na fakt, że właściwa diagnostyka przyczyn niedokrwistości — czy tej wynikającej z niedoboru żelaza czy też tej spowodowanej talasemią (lub równoczesne wystąpienie tych dwóch zaburzeń) — powinna prowadzić do właściwej terapii, w tym odpowiedniej suplementacji (lub jej braku) preparatami żelaza.

W pracy Jackowskiej i wsp. [60] przedstawiono charakterystykę kliniczną i laboratoryjną 22 dzieci z niedokrwistością mikrocytarną, u których rozpoznano β -talasemię. U połowy z nich stężenia HbA₂ i HbF były podwyższone. U 5 dzieci wykonano badania genetyczne i potwierdzono obecność mutacji w genie kodującym β -globinę. W pracy nie podano charakterystyki wykrytych mutacji. Stanowi ona jednak kolejny przykład na to, że talasemia powinna być uwzględniana w diagnostyce niedokrwistości w Polsce [60]. Podobne badania pozwoliły na wykrycie 20 przypadków β -talasemii w jednej z klinik w Polsce, przy czym 4 przypadki scharakteryzowano dokładniej [61].

Kolejnym polskim badaniem, tym razem wykorzystującym technikę qPCR do zbadania różnorodności występowania talasemii w Polsce, jest praca, w której analizowano grupę 21 pacjentów. Jedną z konkluzji tej publikacji dotyczyła różnorodności występowania tej niedokrwistości w Polsce, ponieważ w 19 rodzinach wykryto aż 14 różnych mutacji sprawczych dla β -talasemii [62].

W polskiej populacji jest także obecna α -talasemia, choć zapewne część przypadków pozostaje niedodiagnozowana ze względu na brak diagnostyki genetycznej i wynikającego z tego braku rutynowych badań diagnostycznych. Opis 2 przypadków wystąpienia tej niedokrwistości opublikowano w 2007 roku. W pracy tej zasugerowano, że w przypadkach chorych z mikrocytozą i prawidłowym stężeniem żelaza, a także MCH poniżej 27 pg, przy równocześnie mieszczących się w granicach normy lub obniżonych wartościach HbA₂ oraz obecności w rozmazie krwi obwodowej różnego

rodzaju nieprawidłowych krwinek, na przykład niedobarwliwych, anulocytów czy też krwinek tarczowatych, można rozważać występowanie α -talasemii, a tym samym należy przeprowadzić badania genetyczne [63].

Pierwsze szersze badania genetyczne α -talasemii technikami multipleksowej PCR i MLPA wykonano u 48 pacjentów. Pozytywnie zdiagnozowano 10 chorych, u których wykryto w sumie trzy mutacje typu delecyjnego α -talasemii ($-\alpha^{3,7}$; $-\text{SEA}$; $-\text{MED}$), potwierdzając tym samym przydatność zastosowanych metod genetycznych do wykrywania tej niedokrwistości [64]. Zestaw wykorzystanych metod nie pozwolił jednak na rozpoznanie w kierunku talasemii u blisko 3/4 (potencjalnie) chorych poddanych analizie, co przy różnorodności opisanych mutacji wskazuje na konieczność rozszerzenia zakresu metod badawczych.

Dodatkowo, w innej publikacji, na możliwość występowania złożonych form niedokrwistości uwarunkowanych genetycznie u jednego pacjenta wskazuje opis interesującego przypadku w polskiej populacji — równoczesnej obecności mutacji $\alpha^{3,7}$ w genie α -globiny (α -talasemia) wraz z dwiema mutacjami w genie kodującym białko prążka 4.2 erytrocytów (wrodzona sferocytoza) [65].

Przedstawiony wyżej przegląd publikacji dotyczących polskich chorych wskazuje, że udoskonalenie diagnostyki, w tym wprowadzenie diagnostyki opartej na badaniach genetycznych, jest w Polsce konieczne.

Leczenie talasemii

Zależnie od rodzaju mutacji sprawczej talasemie charakteryzują się różnorodnymi objawami klinicznymi. Specjalistyczne leczenie odnosi się raczej do cięższych postaci tej choroby. We wszystkich rodzajach talasemii zaleca się jednak, aby pacjentów poddawać kontrolnym badaniom diagnostycznym, na przykład monitorowaniu stężenia żelaza, witaminy B12 i kwasu foliowego. W większości przypadków leczenie talasemii ma charakter objawowy. W tej części artykułu podano podstawowe informacje odnoszące się do terapii poszczególnych rodzajów talasemii, a także do kierunków najnowszych badań. Mają one charakter ogólny i nie obejmują całego spektrum zaleceń terapeutycznych, działań niepożądanych i przeciwwskazań (np. w splenektomii opisano tylko jedno z podstawowych wskazań lekarskich, bez uwzględniania przeciwwskazań, dokładnych wytycznych i wieku pacjenta).

Przetoczenia koncentratów krwinek czerwonych

W cięższych przypadkach talasemii najbardziej rozpowszechniony protokół leczniczy jest oparty na transfuzjach koncentratu krwinek czerwonych (kkcz). Z jednej strony, według założeń, celem przetoczeń kkcż jest korekcja stężenia Hb do 130–140 g/l niedługo po transfuzji, a w konsekwencji — utrzymanie jej koncentracji na poziomie 90–100 g/l między transfuzjami. Z drugiej strony, przeciążenie żelazem stanowi częstą komplikację poważnych przypadków talasemii, wynikającą właśnie z przetoczeń. Najczęstszymi konsekwencjami przeciążenia organizmu żelazem są kardiomiopatie, zwłóknienie wątroby i endokrynopatie.

Dla nosicieli α -talasemii *minor* nie ma żadnego specjalistycznego leczenia, chyba że u chorego wystąpi niedokrwistość. Podanie kwasu foliowego można rozważyć, gdy dieta pacjenta jest uboga w kwas foliowy, a także w przypadku wystąpienia infekcji, w zespole złego wchłaniania oraz podczas ciąży. U pacjentów z chorobą HbH leczenie może polegać na suplementacji kwasem foliowym, a w cięższych przypadkach — na okresowych przetoczeniach krwi. Przetoczenia mogą być konieczne nawet od okresu niemowlęcego, gdy u chorego występuje ciężka niedokrwistość hemolityczna i stwierdzi się obecność dodatkowych mutacji, szczególnie niedelecyjnych [66].

Leczenie chelatujące

Obecnie na rynku jest dostępnych kilka substancji chelatujących żelazo, na przykład deferoxamina, deferipron i deferazyroks. Ich stosowanie zmniejsza śmiertelność i zachorowalność na zaburzenia związane z przeciążeniem żelazem. Istotne są też ich działania niepożądane, na przykład deferipron może powodować agranulocytozę u mniej niż 2% pacjentów i wymaga cotygodniowych badań krwi [67].

Dużo uwagi poświęca się obecnie badaniom nad białkiem zwanym hepcydyną. Zaobserwowano, że u pacjentów z β -talasemią (najprawdopodobniej dla typu *minor* także, choć ilość danych nadal jest ograniczona) stężenie tego białka pozostaje obniżone, czego efektem jest zaburzenie gospodarki żelazem [68]. Już wcześniej udowodniono, że hepcydyna bierze udział w kontroli dystrybucji żelaza w organizmie, wpływając między innymi na przyswajanie żelaza z przewodu pokarmowego. Zatem, gdy ekspresja hepcydyny maleje, następuje zwiększone wchłanianie żelaza z pokarmem, prowadząc do przeładowania nim organizmu. Kontrola ekspresji tego białka może być ważnym elemen-

tem terapeutycznym u pacjentów z talasemiami, szczególnie u osób z ciężkimi postaciami [69]. Podsumowując, monitorowanie gospodarki żelazem jest ważną składową procesów diagnostycznych i terapeutycznych w niedokrwistościach mikrocytarnych.

Splenektomia

Splenektomia powinna być rozważana u tych pacjentów z talasemią, u których do utrzymania odpowiedniej liczby krwinek czerwonych i odpowiedniego stężenia Hb konieczne jest przetaczanie w ciągu roku ponad 250 ml kkcż/kg mc. (należy pamiętać o konieczności wykluczenia innych przyczyn niedokrwistości) [29, 70]. Decyzja o splenektomii musi uwzględniać ryzyko potencjalnych powikłań, takich jak sepsa, zakrzepica i nadciśnienie płucne [71].

Czynniki wpływające na syntezę Hb

Do głównych działań terapeutycznych w przypadku cięższych postaci β -talasemii należy indukowanie ekspresji Hb płodowej, a tym samym niwelowanie niedokrwistości wynikającej z niedoboru β -globiny i szkodliwego efektu działania wolnej α -globiny. Do stymulatorów produkcji HbF zalicza się między innymi leki cytostatyczne, na przykład HU (zwiększa poziom HbF poprzez zmianę kinetyki erytropoezy), leki demetylujące DNA, na przykład azacytydynę (zwiększa poziom γ -globiny), czy inhibitory deacetylaz, na przykład *butyrate* (acetyluje histony). Bardzo ważnym lekiem stymulującym ekspresję HbF jest HU. To szeroko stosowany lek w anemii sierpowatej i o coraz większym znaczeniu w przypadku leczenia poważnych przypadków talasemii. Zaobserwowano interesującą rozbieżność działania induktorów HbF w β -talasemii i w anemii sierpowatej. Zauważono, że do osiągnięcia tego samego efektu klinicznego w przypadku β -talasemii konieczny jest większy poziom HbF niż w przypadku anemii sierpowatej. Dodatkowo stwierdzono, że tylko część pacjentów odpowiada na działanie leków zwiększoną produkcją HbF. Prawdopodobnie wynika to z indywidualnych genetycznych czynników odpowiadających za syntezę HbF [72].

Jednym z najbardziej obiecujących leków staje się czynnik komórek macierzystych (SCF, *stem cell factor*) — białko, które odgrywa istotną rolę w procesach hematopoezy. Zwiększony efekt jego działania zaobserwowano, gdy podawano go razem z erytropoetyną. Erytropoetyna, oprócz stymulującego wpływu na produkcję krwinek czerwonych i aktywację produkcji HbF, może być ważnym przeciwutleniaczem w walce z wolnymi rodnikami [73].

Inne czynniki mogące aktywować syntezę HbF to między innymi talidomid, lenalidomid i pomalidomid. Mechanizm ich działania, prowadzący do indukowania produkcji HbF, nie jest jeszcze do końca poznany, ale być może w przyszłości będą one stanowić alternatywę dla innych leków [74].

Dodatkowym, potencjalnym mechanizmem pozwalającym na opracowanie skutecznej terapii β -talasemii wydają się leki, które będą hamowały wyciszenie produkcji HbF. Jednym z możliwych celów stał się *locus B-cell CLL/lymphoma 11A* (BCL11A), którego wyciszenie powoduje reaktywację ekspresji HbF. Dodatkowo wykazano, że oprócz BCL11A również takie czynniki, jak: KLF1, *myeloblastosis viral oncogene homolog* (MYB), *sex determining region Y box 6* (SOX6) oraz dwa *microRNA*: miR-15a miR-16-1, są w stanie regulować biosyntezę i ekspresję HbF (także poprzez wpływ na BCL11A) [75].

Gdy obserwuje się potencjał leczniczy induktorów produkcji HbF, coraz ważniejsze wydaje się lepsze zrozumienie procesów transkrypcyjnych zachodzących podczas zmiany z γ -globiny na β -globinę. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że dzięki identyfikacji nowych czynników transkrypcyjnych i poznaniu sekwencji białek regulatorowych niezbędnych w procesach biosyntezy HbF możliwe będzie opracowanie nowych terapii w β -talasemii.

W leczeniu talasemii istotne jest zapobieganie skutkom działania ROS oraz zaburzeniom w procesach koagulacyjnych krwi. Czyni się starania w celu złagodzenia stresu oksydacyjnego u pacjentów z talasemiami poprzez użycie przeciwutleniaczy, takich jak witamina E, ale do tej pory działania te nie przyniosły spodziewanych wyników [76].

Allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych

Omówione wyżej metody lecznicze mają charakter objawowy. Leczenie przyczynowe talasemii może być oparte na allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*). Pierwszą procedurę allo-HSCT u chorego na talasemię wykonano w 1982 roku. Od tamtej pory wykonano ponad 3000 allo-HSCT. Głównym problemem jest znalezienie odpowiedniego dawcy. Istnieje kilka czynników ryzyka, które muszą być brane pod uwagę przed podjęciem decyzji o przeszczepieniu. Są to hepatomegalia powyżej 2 cm, zwłóknienie wątroby i niewłaściwa terapia chelatująca żelazo. Istotny jest również czas działania czynników ryzyka. Szacuje się, że 40–94% pacjentów po allo-HSCT uwalnia się od objawów talasemii

na lata, chociaż nie u wszystkich obserwuje się pełny chimeryzm komórek hematopoetycznych. To sugeruje, że nawet niewielka liczba prawidłowych komórek dawcy funkcjonujących w szpiku chorego wystarcza, by zapewnić produkcję funkcjonalnych cząsteczek Hb. Część pacjentów stopniowo odrzuca przeszczep i w tym przypadku często przeprowadza się kolejną procedurę allo-HSCT [77–79].

Terapia genowa

Talasemie były jednymi z pierwszych chorób, dla których zaproponowano terapię genową. Jedną z możliwości zakłada, że komórki macierzyste są pobierane od pacjenta, następnie wprowadza się do nich konstrukt wirusowy z prawidłowym genem globiny, po czym te autologiczne komórki są znów przeszczepiane choremu. Istnieje kilka problemów do przezwyciężenia, aby taka terapia była zarówno bezpieczna dla pacjenta, jak i skuteczna. Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na zwiększenie efektywności dostarczenia genu, co wymaga poprawienia stabilności wektora oraz dokładnego określenia miana wirusa (dawki terapeutycznej). Trudności sprawia również precyzyjne ustalenie, jak dany fenotyp pacjenta wpływa na efektywność transferu wirusa. Kolejne problemy wynikają z braku jednoznacznej wiedzy odnośnie do onkogenego wpływu wirusa na pacjenta. W związku z tymi problemami terapia genowa jest dopiero we wczesnych etapach badań klinicznych i osiągnięcie pełnego sukcesu wymaga jeszcze wielu badań [80].

Ostatnie próby terapii genowej na mysich modelach talasemii okazały się bardzo obiecujące. Myszy chorujące na β -talasemię (talasemia *major* i talasemia *intermedia*) zostały skutecznie wyleczone przy użyciu wektora retrowirusowego. Trwają również intensywne badania nad transferem genów kodujących globiny do komórek ludzkich. U ludzi dotychczas podjęto co najmniej dwie próby takiej terapii genowej. Jedną z nich zakończyła się niepomyślnie, natomiast druga dotyczyła pacjenta z HbE/ β^0 -talasemią, któremu wprowadzono gen β -globiny za pomocą wektora wirusowego skonstruowanego na bazie lentiwirusa. Pacjent w wieku 18 lat, który od 3. roku życia wymagał regularnych transfuzji kkc, od 4 lat po zastosowaniu terapii genowej nie wymaga przetoczeń, choć cierpi na łagodną niedokrwistość [81]. Oprócz tych prób dostarczania prawidłowej liczby kopii genu globiny do komórek pacjenta podejmowane są także próby ograniczania nadmiaru, na przykład, α -globiny w przypadku β -talasemii, a dzięki temu niwelowania jej toksycznego wpływu na komórki [82].

Badania prenatalne

Kontrola prenatalna dla talasemii może się opierać zarówno na technikach biologii molekularnej, jak i na metodach biochemicznych. Odpowiednie ilości płodowego DNA, po wykluczeniu zanieczyszczenia przez rodzicielskie DNA, mogą być uzyskane około 11. tygodnia poprzez pobranie kosmówki i około 18. tygodnia ciąży poprzez nakłucie owodni. Podstawami badań molekularnych mogą być między innymi sekwencjonowanie DNA, metody wykorzystujące technikę PCR, na przykład ARMS, *reverse dot blot*, czy też *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE). Najnowsze technologie opierają się na nieinwazyjnych metodach, w których płodowe DNA jest izolowane z matczynego osocza lub krwi obwodowej. Nie są jednak jeszcze rutynowo wykonywane. Natomiast badania biochemiczne, wykorzystujące na przykład HPLC, przeprowadzane około 19. tygodnia ciąży, wykrywają procentowy udział HbA i HbF we krwi płodowej (te badania mogą mieć również zastosowanie w odniesieniu do noworodków i niemowląt, choć procentowy udział poszczególnych frakcji Hb może być inny). Poziom HbA u płodu z β -talasemią *major* jest zbliżony do zera lub tej Hb nie ma w ogóle, natomiast ilość HbA u zdrowych płodów sięga kilku procent. Metoda ta jest jednak mało precyzyjna i trudna w interpretacji. Wynika to między innymi z trudności w potencjalnym rozróżnieniu poziomu HbA próbek pochodzących od heterozygot i zdrowych płodów [83, 84].

Prewencja talasemii

W krajach o dużej częstości talasemii w populacji wdrażane są programy wsparcia oraz profilaktyki tej choroby. Ta forma ma szczególne znaczenie dla pacjentów oraz ich rodzin, a także dla systemu opieki zdrowotnej danego kraju. W 1970 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) zaproponowała główne założenia programu prewencyjnego. Wymieniono w nim między innymi takie elementy, jak: wsparcie finansowe i polityczne (edukacja społeczeństwa w prasie, telewizji, szkolenia lekarzy oraz personelu diagnostycznego, zakup zaawansowanego sprzętu do badań diagnostycznych i naukowych), diagnostyka prenatalna dla rodziców, którzy mają już dziecko z talasemią, a także osób z grup ryzyka i przyszłych małżonków, diagnostyka prenatalna płodu, badania różnicowe nosicielstwa w populacji, a także stworzenie sieci centrów badawczych oraz baz danych pacjentów z talasemiami [85].

Podsumowanie

W pracy zaprezentowano najważniejsze informacje o talasemii ze szczególnym uwzględnieniem aspektów diagnostycznych tej choroby. Ze względu na coraz większą migrację ludności częstość występowania talasemii w Polsce będzie wzrastać. Istnieje zatem konieczność dalszego udoskonalania diagnostyki. Jednocześnie istotne jest upowszechnianie wiedzy o występowaniu tej choroby w Polsce, ponieważ jej niezdiagnozowanie często prowadzi do stosowania nieskutecznego i szkodliwego dla chorych leczenia preparatami żelaza.

Piśmiennictwo

- Cardoso G.L., Takanashi S.Y., Guerreiro J.F. Inherited hemoglobin disorders in an Afro-Amazonian community: Saracura. *Genet. Mol. Biol.* 2012; 35: 553–556.
- Gamberini M.R., Lucci M., Vullo C., Anderson B., Canella R., Barrai I. Reproductive behaviour of families segregating for Cooley's anaemia before and after the availability of prenatal diagnosis. *J. Med. Genet.* 1991; 28: 523–529.
- Rich A. Studies on the hemoglobin of Cooley's anemia and Cooley's trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1952; 38: 187–196.
- Angastiniotis M., Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998; 850: 251–269.
- Taylor S.M., Parobek C.M., Fairhurst R.M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12: 457–468.
- Galanello R. Recent advances in the molecular understanding of non-transfusion-dependent thalassaemia. *Blood Rev.* 2012; 26: S7–S11.
- Higgs D.R., Engel J.D., Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet* 2012; 379: 373–383.
- Liebhaber S.A., Cash F.E., Ballas S.K. Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 15327–15333.
- Molchanova T., Pobedimskaya D.D., Huisman T.H. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br. J. Haematol.* 1994; 88: 300–306.
- Fucharoen S., Winichagoon P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. *Indian J. Med. Res.* 2011; 134: 498–506.
- Tejza B., Kurylak A., Pogorzala M., Krenska A. Talasemia — patogeneza, diagnostyka, leczenie. *Przegl. Ped.* 2006; 36: 138–142.
- Mannu F., Arese P., Cappellini M.D. i wsp. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassaemia intermedia erythrocytes. *Blood* 1995; 86: 2014–2020.
- Ferro E., Visalli G., Civa R. i wsp. Oxidative damage and genotoxicity biomarkers in transfused and untransfused thalassaemic subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53: 1829–1837.
- Taher A.T., Otrrock Z.K., Uthman I., Cappellini M.D. Thalassaemia and hypercoagulability. *Blood Rev.* 2008; 22: 283–292.
- Zuccato C., Breda L., Salvatori F. i wsp. A combined approach for β -thalassaemia based on gene therapy-mediated adult hemoglobin (HbA) production and fetal hemoglobin (HbF) induction. *Ann. Hematol.* 2012; 91: 1201–1213.

16. Ho P.J., Hall G.W., Watt S. i wsp. Unusually severe heterozygous beta-thalassemia: evidence for an interacting gene affecting globin translation. *Blood* 1998; 92: 3428–3435.
17. Rachmilewitz E.A., Giardina P.J. How I treat thalassemia. *Blood* 2011; 118: 3479–3488.
18. Harteveld C.L., Kriek M., Bijlsma E.K. i wsp. Refinement of the genetic cause of ATR-16. *Hum. Genet.* 2007; 122: 283–292.
19. Szczaluba K., Obersztyn E., Nowakowska B. i wsp. [Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X) in two brothers — clinical characteristics, diagnostics and genetic counselling issues]. *Med. Wieku Rozwoj.* 2011; 15: 437–444.
20. Rose C., Fournier M., Nibourel O. i wsp. Acquired alpha thalassemia myelodysplastic/myeloproliferative syndrome (ATMDS): evolution on hypomethylating agent therapy. *Leuk. Res.* 2011; 35: 203–205.
21. Cao A., Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet. Med.* 2010; 12: 61–76.
22. Harteveld C.L., Higgs D.R. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010; 5: 13.
23. Muncie H.L., Campbell J. Alpha and beta thalassemia. *Am. Fam. Physician* 2009; 80: 339–344.
24. Borgna-Pignatti C., Rigon F., Merlo L. i wsp. Thalassemia minor, the Gilbert mutation, and the risk of gallstones. *Haematologica* 2003; 88: 1106–1109.
25. Prabakar M.R., Jain M., Chandrasekaran V., Indhumathi E., Soundararajan P. Renal tubular dysfunction with nephrocalcinosis in a patient with beta thalassemia minor. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 2008; 19: 964–968.
26. Leung C.F., Lao T.T., Chang A.M. Effect of folate supplement on pregnant women with beta-thalassaemia minor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1989; 33: 209–213.
27. Fakher R., Bijan K., Taghi A.M. Application of diagnostic methods and molecular diagnosis of hemoglobin disorders in Khuzestan province of Iran. *Indian J. Hum. Genet.* 2007; 13: 5–15.
28. Altinoz M.A., Gedikoglu G., Deniz G. β -Thalassemia trait association with autoimmune diseases: β -globin locus proximity to the immunity genes or role of hemorphins? *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2012; 34: 181–190.
29. Galanello R., Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010; 5: 11.
30. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* 2007; 31: 243–250.
31. Chandrashekar V., Soni M. Hemoglobin disorders in South India. *ISRN Hematol.* 2011; 748939.
32. Mosca A., Paleari R., Galanello R. i wsp. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. *Bioelectrochemistry* 2008; 73: 137–140.
33. Perseu L., Satta S., Moi P. i wsp. KLF1 gene mutations cause borderline HbA(2). *Blood* 2011; 118: 4454–4458.
34. Bhat V.S., Dewan K.K., Krishnaswamy P.R. The Diagnosis of α -thalassaemia: a case of hemoglobin H- α deletion. *Indian J. Clin. Biochem.* 2010; 25: 435–440.
35. Nadkarni A., Phanasgaonkar S., Colah R., Mohanty D., Ghosh K. Prevalence and molecular characterization of alpha-thalassemia syndromes among Indians. *Genet. Test.* 2008; 12: 177–180.
36. Bain B.J., Wild B.J., Stephens A.D., Phelan L.A. Variant hemoglobins: a guide to identification. Wiley-Blackwell, Philadelphia 2010.
37. Higgins T.N., Khajuria A., Mack M. Quantification of HbA(2) in patients with and without beta-thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab hemoglobin variants: comparison of two systems. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 131: 357–362.
38. Rao S., Kar R., Gupta S.K., Chopra A., Saxena R. Spectrum of haemoglobinopathies diagnosed by cation exchange-HPLC & modulating effects of nutritional deficiency anaemias from north India. *Indian J. Med. Res.* 2010; 132: 513–519.
39. Kim J.E., Kim B.R., Woo K.S., Kim J.M., Park J.I., Han J.Y. Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean J. Lab. Med.* 2011; 31: 238–243.
40. Mai A., Jelacic K., Rotili D. i wsp. Identification of two new synthetic histone deacetylase inhibitors that modulate globin gene expression in erythroid cells from healthy donors and patients with thalassemia. *Mol. Pharmacol.* 2007; 72: 1111–1123.
41. Wilber A., Nienhuis A.W., Persons D.A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood* 2011; 117: 3945–3953.
42. Old J., Traeger-Synodinos J., Galanello R., Petrou M., Angastiniotis M. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. *Thalassaemia International Federation, Cypr* 2005.
43. Vasseur C., Pissard S., Domingues-Hamdi E., Marden M.C., Galactéros F., Baudin-Creuzat V. Evaluation of the free α -hemoglobin pool in red blood cells: a new test providing a scale of β -thalassaemia severity. *Am. J. Hematol.* 2011; 86: 199–202.
44. Tayapiwatana C., Kuntaruk S., Tatu T. i wsp. Simple method for screening of alpha-thalassaemia 1 carriers. *Int. J. Hematol.* 2009; 89: 559–567.
45. Lin M., Zhu J.J., Wang Q. i wsp. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinese. *Blood Cells Mol. Dis.* 2012; 48: 86–90.
46. Colah R.B., Gorakshakar A.C., Nadkarni A.H. Invasive & non-invasive approaches for prenatal diagnosis of haemoglobinopathies: experiences from India. *Indian J. Med. Res.* 2011; 134: 552–560.
47. Kidd J.L., 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 alpha-thalassemia mutations. *Int. J. Lab. Hematol.* 2010; 32: 373–380.
48. Katol J., Takao M., Ideguchi H., Sawada H., Kawashima H., Ono J. [Genetic screening for alpha-thalassemia deletion determinants by GapPCR method]. *Rinsho Byori.* 2006; 54: 1095–1100.
49. Mahadik C.T. Experience with multiplex ARMS (MARMS)-PCR for the detection of common β -thalassaemia mutations in India. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2012; 10: 14–24.
50. Babashah S., Jamali S., Mahdian R. i wsp. Detection of unknown deletions in beta-globin gene cluster using relative quantitative PCR methods. *Eur. J. Haematol.* 2009; 83: 261–269.
51. Munkongdee T., Vattanaviboon P., Thummarati P. i wsp. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia by melting curve analysis. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12: 354–358.
52. Kyriacou K., Al Quobaili F., Pavlou E., Christopoulos G., Ioannou P., Kleantous M. Molecular characterization of beta-thalassemia in Syria. *Hemoglobin* 2000; 24: 1–13.
53. Looi M.L., Sivalingam M., Husin N.D. i wsp. Multiplexed genotyping of beta globin mutations with MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2011; 412: 999–1002.
54. Chaisue C., Kitcharoen S., Wilairat P., Jetsrisuparb A., Fucharoen G., Fucharoen S. Alpha/beta-globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function. *Clin. Biochem.* 2007; 40: 1373–1377.
55. Cao M., Liu Z., Jia X. i wsp. Detection of α -globin gene deletions using denaturing high-performance liquid chromatography and multiplex ligation-dependent probe amplification. *J. Clin. Lab. Anal.* 2011; 25: 426–431.

56. Zdebska E., Krawcewicz A., Burzyńska B., Spsychalska J., Kościelak J. Pierwszy przypadek homozygotycznej postaci β -talasemii w Polsce. *Acta Haematol. Pol.* 2006; 37: 99–106.
57. Kościelak J. Prevalence of β -thalassemia minor in Poland. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2009; 322–324.
58. Zdebska E., Krawcewicz A., Adamowicz-Salach A. i wsp. [Beta-thalassemia in Poland. I. Mediterranean mutations in beta-thalassemia]. *Pol. Merk. Lek.* 2006; 20: 53–56.
59. Kaczorowska-Hac B., Balcerska A. Beta-thalassemia a surprising reason for anaemia in North Poland children. *Ann. Hematol.* 2008; 87: 425–427.
60. Jackowska T., Wagiel E., Zdebska E., Burzyńska B., Maciąg M. Niedokrwistość mikrocytarna u dzieci w Polsce jako objaw talasemii. *Przegl. Ped.* 2007; 37: 221–226.
61. Albrecht-Stanisławska K., Adamowicz-Salach A., Zdebska E., Matysiak M. Talasemie — dotąd mało znana przyczyna niedokrwistości u dzieci w Polsce. *Pediatr. Pol.* 2006; 81: 828–833.
62. Maciąg M., Płochocka D., Adamowicz-Salach A. i wsp. Diversity of thalassemia variants in Poland — screening by real-time PCR. *Acta Haematol.* 2008; 120: 153–157.
63. Adamowicz-Salach A., Zdebska E., Burzyńska B. i wsp. Talasemia α przyczyną niedokrwistości mikrocytarnej w Polsce — opis przypadków. *Pediatr. Pol.* 2007; 82: 151–155.
64. Splitt A., Mokras U., Windyga J., Kościelak J. Application of mPCR and MLPA in diagnostics of alpha-thalassaemia. *Przegl. Lek.* 2010; 67: 460–464.
65. Maciąg M., Adamowicz-Salach A., Siwicka A., Spsychalska J., Burzyńska B. The use of real-time PCR technique in the detection of novel protein 4.2 gene mutations that coexist with thalassaemia alpha in a single patient. *Eur. J. Haematol.* 2009; 83: 373–377.
66. Galanello R., Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet. Med.* 2011; 13: 83–88.
67. Masera N., Tavecchia L., Longoni D.V., Maglia O., Biondi A., Masera G. Agranulocytosis due to deferiprone: a case report with cytomorphological and functional bone marrow examination. *Blood Transfus.* 2011; 9: 462–465.
68. Lai M.E., Vacquer S., Carta M.P. i wsp. Evidence for a proatherogenic biochemical phenotype in beta thalassemia minor and intermedia. *Acta Haematol.* 2011; 126: 87–94.
69. Nemeth E. Heparin in beta-thalassemia. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1202: 31–35.
70. Graziano J.H., Piomelli S., Hilgartner M. i wsp. Chelation therapy in beta-thalassemia major. III. The role of splenectomy in achieving iron balance. *J. Pediatr.* 1981; 99: 695–699.
71. Rodeghiero F., Ruggeri M. Short- and long-term risks of splenectomy for benign haematological disorders: should we revisit the indications? *Br. J. Haematol.* 2012; 158: 16–29.
72. Fathallah H., Atweh G.F. DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Rev.* 2006; 20: 227–234.
73. Amer J., Dana M., Fibach E. The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia* 2010; 978710.
74. Testa U. Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. *Ann. Hematol.* 2009; 88: 505–528.
75. Sankaran V.G. Targeted therapeutic strategies for fetal hemoglobin induction. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2011: 459–465.
76. Pfeifer W.P., Degasperis G.R., Almeida M.T., Vercesi A.E., Costa F.F., Saad S.T. Vitamin E supplementation reduces oxidative stress in beta thalassaemia intermedia. *Acta Haematol.* 2008; 120: 225–231.
77. Lucarelli G., Isgrò A., Sodani P., Gaziev J. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2: a011825.
78. Goussetis E., Peristeri I., Kitra V. i wsp. HLA-matched sibling stem cell transplantation in children with β -thalassemia with anti-thymocyte globulin as part of the preparative regimen: the Greek experience. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47: 1061–1066.
79. Angelucci E. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2010: 456–462.
80. Payen E., Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the β -hemoglobinopathies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2012: 276–283.
81. Drakopoulou E., Papanikolaou E., Anagnou N.P. The ongoing challenge of hematopoietic stem cell-based gene therapy for β -thalassemia. *Stem Cells Int.* 2011; 2011: 987–980.
82. Gambari R. Alternative options for DNA-based experimental therapy of β -thalassemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012; 12: 443–462.
83. Kanavakis E., Traeger-Synodinos J., Vrettou C., Maragoudaki E., Tzetzis M., Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 523–528.
84. Sanguanserm Sri T., Thanaratanakorn P., Steger H.F. i wsp. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis by HPLC analysis of hemoglobin in fetal blood samples. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2001; 32: 180–185.
85. Verma I.C., Saxena R., Kohli S. Past, present & future scenario of thalassaemic care & control in India. *Indian J. Med. Res.* 2011; 134: 507–521.