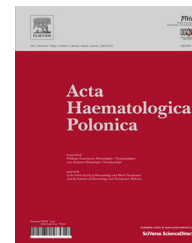




Contents lists available at ScienceDirect

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 niedokrwistości 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 Niedokrwistości 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

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/5663810>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/5663810>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)