

Hemoglobinopatie na Slovensku

Doc. MUDr. Viera Fábryová, CSc., mim. prof.¹, MUDr. Monika Drakulová², MUDr. Hana Krutá², MUDr. Eva Luptáková², MUDr. Zuzana Lalahová Striežencová, MPH³, Ing. Jana Kopčová³, RNDr. Michaela Macichová⁴, MUDr. Katarína Gbúrová⁴, RNDr. Andrea Kollárová⁵

¹Hematológia, Nemocnica sv. Michala, Bratislava

²Synlab, Bratislava-Kramáre

³OHT, NÚDCH, Bratislava

⁴OHT, FN L. Pasteura, Košice

⁵ÚLM, FN, Nitra

Východisko: Beta-talasémia je vrodené ochorenie beta-globínových reťazcov hemoglobínu, ktoré je zapríčinené bodovými mutáciami. Heterozygotné formy sa prejavujú mikrocytózou erytrocytov a normálnymi hodnotami parametrov železa, avšak v elektroforéze hemoglobínu sú zvýšené frakcie hemoglobínu A2, prípadne aj fetálneho hemoglobínu F.

Metódy: V rokoch 1993 – 2018 sa v troch hematologických centrách na Slovensku realizovala štúdia s cieľom vyhľadávania nositeľov génov pre beta-talasémiu alebo inú hemoglobinopatiu. Diagnóza sa stanovovala na podklade vyšetrenia rodinnej anamnézy, objektívneho vyšetrenia, vyšetrením krvného obrazu, krvného náteru, parametrov železa a hemolýzy, ako aj vyšetrením elektroforézy hemoglobínu. U časti pacientov sa vykonalo aj genetické vyšetrenie.

Výsledky: Podozrenie na heterozygotnú formu beta-talasémie sa vyslovilo u 618 pacientov (z toho 7,1 % boli cudzinci). Mutácie beta-globínového reťazca sa dokázali u 281 (45,32 %) pacientov. Najčastejšie genetické mutácie boli stredomorského typu. V troch prípadoch sa zistila heterozygotná mutácia pre hemoglobín S (kosáčiková anémia).

Záver: Štúdia dokázala, že na Slovensku sa vyskytujú heterozygotné mutácie pre beta-talasémia a iné hemoglobinopatie. Preto je naďalej potrebné pokračovať vo vyhľadávaní patologických génov aj u nás.

Kľúčové slová: beta-globínový reťazec, beta-talasémia, hemoglobinopatia, anémia, elektroforéza hemoglobínu

Haemoglobinopathies in Slovakia

Background: Beta-thalassaemia is a congenital disorder caused by point mutations in a haemoglobin beta-globin chain. The heterozygous form produces microcytosis and normal iron levels, however, haemoglobin electrophoresis shows higher amounts of haemoglobin A2 eventually foetal haemoglobin F as well.

Methods: Between 1993 – 2018, in three centres in Slovakia, carriers of beta-thalassaemic genes or other haemoglobinopathies were searched for. Diagnosis was performed by haematologists whereby the family history was evaluated, together with the overall clinical condition, blood count and blood smear, iron parameters, haemolysis parameters and haemoglobin electrophoresis testing. A proportion of patients was examined by molecular genetic methods.

Results: A clinical suspicion of the heterozygous form of beta-thalassaemia was documented in 618 patients (7.1 % were foreigners). The mutations of haemoglobin genes were identified in 281 patients (45.32 %). The most frequent mutations were of mediterranean type. Evidence of haemoglobin S (sickle cell anaemia) was also notable in three cases.

Conclusion: The study showed that there is a higher number of heterozygotes for beta-thalassaemia and rarely haemoglobinopathies. It is necessary to continue in search of pathological gene carriers in Slovakia.

Key words: beta-globin chain, beta-thalassaemia, haemoglobinopathy, anaemia, electrophoresis of haemoglobin

Via pract., 2018;15(4):218-221

V minulosti sa venovalo málo pozornosti vrodeným chorobám červených krviniek, keďže ich výskyt bol zriedkavý a vlastná choroba nespôsobovala pacientom vážnejšie ťažkosti. Aj v literatúre sa zmienka o nich vyskytovala len sporadicky (1). Napriek tomu v rôznych ambulanciách sa vždy zaznamenalo určité percento mikrocytových anémií, ktoré nereagovali na liečbu železom a ostávali nedoriešené. Väčšinou išlo o beta-talasémiu, prípadne iné zriedkavejšie hemoglobinopatie.

Hemoglobinopatie sa vyskytujú hlavne v juhovýchodnej Ázii, v severnej Afrike a v južnej Európe. Koncentrovali sa v oblastiach, v ktorých je rozšírená malária, a svojim nositeľom poskytovali ochranu pred infekciou. Kvôli migrácii svetového obyvateľstva sa však dnes môžu vyskytnúť všade na svete. Mutácie, ktoré sú prítomné v našom obyvateľstve, sú pozostatky génov, ktoré tu v minulosti zanechali tatárske a turecké nájazdy, migrácie obyvateľstva

z južnej Európy (napríklad Chorváti), alebo ide o *de novo* mutácie hemoglobínu. Problematika začína byť znova aktuálna, keďže po páde železnej opony sa aj u nás v posledných dekádach stretávame so zvýšeným výskytom uvedených mutácií ako u cudzincov prichádzajúcich na Slovensko, tak aj u ich potomkov v manželstvách s našimi občanmi (2). Podobne sa s uvedenou problematikou stretávajú aj naši lekári pracujúci v rizikových oblastiach

Čo je beta-talasémia? Je to vrodená hemolytická anémia, ktorá vzniká z mutácie génu pre beta-globínový reťazec hemoglobínu. Obrázok 1 znázorňuje molekulu hemoglobínu so štyrmi globínovými reťazcami, v každom je molekula hému a v nej molekula železa. V hlavnom dospelom hemoglobíne HbA sú vždy dva tzv. alfa- a dva beta-reťazce. Porucha génu spôsobuje skrátenie beta-globínového reťazca, výmenu aminokyselín, chýbanie alebo zabudovanie nových aminokyselín do reťazca a pod. (3). Dnes je známych vyše 200 rôznych mutácií beta-globínového génu. V našej oblasti sa prejavujú najčastejšie v heterozygotnej forme (zdedené len od jedného rodiča). Po klinickej stránke varujú od nenápadných laboratórnych prejavov až po anémiu stredne ťažkého stupňa. V krvnom obraze je v popredí mikrocytóza erytrocytov, normálne hodnoty parametrov železa a v elektroforéze hemoglobínu zvýšené hodnoty frakcie hemoglobínu A2 (HbA2), druhého dospelého hemoglobínu, ktorý má miesto beta-globínového reťazca reťazec delta. Niekedy môže byť zvýšený aj fetálny hemoglobín F (HbF), ktorý u dospelého jedinca dosahuje hodnotu približne jedno percento.

Vzhľadom na aktuálnosť problematiky sa v roku 1993 vytvorila pri Hematologickej a transfúziologickej spoločnosti SLS študijná skupina zameraná na aktívne vyhľadávanie beta-talasémii a iných hemoglobinopatií v SR (4). Cieľom štúdie bolo:

- Zjednodušiť diagnostiku beta-talasémii a zabrániť zbytočnému podávaniu preparátov železa pri všetkých mikrocytových anémiách.
- Zistiť výskyt a typ mutácií v našej oblasti.
- Podľa typu mutácií zaviesť vhodné genetické metódy na ich skríning.
- Poskytnúť nositeľom genetických mutácií predmanželské a predkoncepčné poradenstvo (hlavne pri vstupe do manželstva s partnerom z rizikových oblastí).
- Prispieť našimi výsledkami do programov EU na vyhľadávanie beta-talasémii.

Prvá časť štúdie trvala od roku 1993 – 2004. Keďže výsledky prvej časti ukázali, že je potrebné v štúdiu pokračovať,

program štúdie sa predĺžil až do roku 2018.

Na štúdiu sa zúčastnili tri hematologické centrá:

- UNB, pracovisko Kramáre a firma Synlab;
- Národný ústav detských chorôb v Bratislave;
- FN L. Pasteura v Košiciach.

Celkove sa na štúdiu zúčastnilo viac ako 70 lekárov.

Materiál a metódy

Pacienti so suspektnou beta-talasémiou boli zasielaní do uvedených centier na diagnostiku, alebo sme ich riešili na lokálnych hematologických pracoviskách.

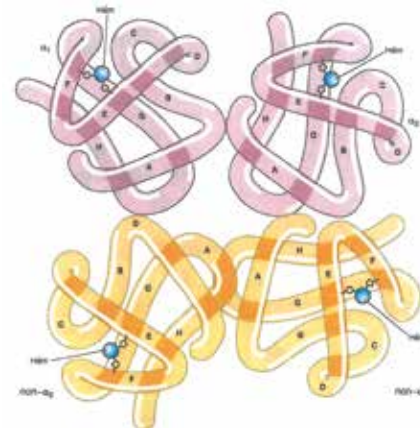
Kritériá na účasť v štúdiu boli:

- rodinná anamnéza (predkovia z rizikových oblastí);
- osobná anamnéza (prijem alkoholu, hepatopatia, hereditárna hemochromatóza);
- objektívne vyšetrenie (ikterus, splenomegália);
- mikrocytóza erytrocytov v krvnom obraze: MCV (stredný objem erytrocytov) pod 78 fl, prípadne MCH (stredný obsah hemoglobínu v erythrocyte) pod 25 pg. Anémia nemusela byť prítomná;
- nález v periférnom krvnom nátere: mikrocyty, terčovité bunky, ďalšie morfológické anomálie erytrocytov;
- normálne alebo zvýšené hodnoty sérového železa, feritínu alebo pretrvávajúca mikrocytóza erytrocytov aj po liečbe železom;
- možné prejavy hemolýzy (zvýšený počet retikulocytov, znížená hodnota haptoglobínu, zvýšená hodnota nepriameho bilirubínu).

Metódy

Parametre krvného obrazu sme stanovovali na počítačoch krviniek vyššej generácie, krvný náter z periférnej krvi sme vyšetrovali mikroskopicky (Pappenheimovo farbenie), vyšetrenie parametrov železa, bilirubínu a ďalších biochemických parametrov sa vykonávalo na bežných biochemických analyzátoroch; haptoglobín sme vyšetrovali laserovou nefelometriou. Elektroforéza hemoglobínu sa vykonávala na acetát-celulózoých fóliách.

Obrázok 1. Molekula hemoglobínu. Červené sú alfa-reťazce, žlté beta-reťazce, označované aj ako non-alfa-reťazce. V každom reťazci je modro vyznačená molekula hému obsahujúca železo (internet)



Hodnoty HbA2 do 3,5 % a HbF do 1,1 % sme považovali za normálne. Pacientov s vyššími hodnotami uvedených frakcií sme zaradovali do štúdie.

V druhej časti štúdie sme už spolupracovali aj s genetickým pracoviskom Ústavu laboratórnej medicíny vo FN v Nitre, ktoré vyšetrovalo vzorky vyššie uvedených pacientov metódou reverznej hybridizácie.

V prípade pozitívnych výsledkov sme sa snažili aj o vyšetrenie príbuzných probanda v horizontálnej aj vertikálnej línii.

Výsledky

Štúdia s cieľom vyhľadávania hemoglobinopatií na Slovensku trvala 25 rokov. Za ten čas sme zachytili celkovo 618 jedincov so suspektnou hemoglobinopatiou. Z toho bolo 41 cudzincov (7,1 %). Kompletne bolo doteraz diagnostikovaných 313 (48,86 %) jedincov. Za kompletne diagnostikovaného pacienta považujeme genetický dôkaz mutácie. Beta-talasémiu malo 281 (45,32 %) pacientov (členovia 69 rodín alebo jednotlivcov), traja pacienti mali dokázanú mutáciu pre kosáčikovú anémiu zdedenú od jedného rodiča, (dvaja nepríbuzní chlapci, ktorých otec bol afrického pôvodu, a jedna černoška z Ghany). U 3,54 % geneticky vyšetrených pacientov sa dostupnými metódami nepodarilo mutáciu odhaliť.

Tabuľka 1 ukazuje prehľad mutácií beta-globínového génu v študovanej skupine ako v absolútnych číslach, počet

Tabuľka 1. Prehľad genetických mutácií beta-talasémie v študovanom súbore (absolútne čísla a percentá)

Typ mutácie	Počet pacientov/rodín	Percentá
IVS 1.110 (G A)	79/19	28,00
IVS 2.1 (G A)	79/15	28,00
IVS 1.6 (I C)	35/9	12,44
Kodón 39 (G A)	26/6	9,33
Kodón 8 (-AA)	15/3	5,33
IVS 1.1 (G A)	12/4	4,44
Kodón 121 (G T)	10/3	3,55
IVS 2.745 (C G)	8/3	2,66
Kodón 27 (G T), Knossos	5/1	1,77
Kodón 5 (-CT)	4/1	1,33
IVS 1.5 (G C)	4/1	1,33
Kodón 17 (AAG TAG, LysSTOP)	1/1	0,44
-87 (C G)	1/1	0,44
Kodón 44 (-C)	1/1	0,44
Kodón 58 (-C)	1/1	0,44
Spolu	281/69	100,00

jedincov a počet rodín, ako aj percentuálne zastúpenie jednotlivých mutácií.

Až na výnimky väčšinou išlo o mutácie beta-globínového reťazca, ktoré sa vyskytujú v oblasti Stredozemného mora. Tabuľka 2 predstavuje prehľad mutácií beta-globínového génu stredomorského typu. Hrube vyznačené mutácie sa nachádzajú aj v našom súbore.

Po klinickej stránke u všetkých pacientov išlo o heterozygotnú formu ochorenia, pacienti boli bez výraznejších ťažkostí. Hodnoty hemoglobínu sa pohybovali od normálnych hodnôt a ľahkej anémie (beta-talasémia minor) až po hodnoty stredne ťažkej anémie, najnižšie hodnoty hemoglobínu v súbore boli 80 g/liter (beta-talasémia intermédia). V liečbe sme využívali len vitamíny – kyselinu listovú a vitamín B12, preparáty železa sú kontraindikované.

V rokoch 2012 – 2015 sme sledovali v súbore aj 7 gravidných pacientok. Priebeh gravidity bol u všetkých po hematologickej stránke bez komplikácií, anémii sme korelovali len podávaním vyššie uvedených vitamínov. Podobne pri pôrode bolo len u jednej pacientky potrebné podať transfúziu erytrocytov. Aj v tomto roku sledujeme ďalšie dve tehotné pacientky s beta-talasémiou minor. U všetkých pacientok bol vždy vyšetrený aj partner.

Tabuľka 2. Prehľad genetických mutácií beta-talasémie stredomorského typu. Hrube vyznačené sa vyskytovali aj v našom súbore

Position	Mutation	b thalas.	Position	Mutation	b thalas.
-101	C – T	b+	cd 39	C – T	b0
-87	C – G	b+	IVS 1.1	G – A	b0
-30	T – A	b+	IVS 1.5	G – C	b+
cd 5	- CT	b0	IVS 1.6	T – C	b+
cd 6	G – A, HbC	-	IVS 1.110	G – A	b+
cd 6	A – T, HbS	-	IVS 1.116	T 0 G	b0
cd 6	- A	b0	IVS 1.130	G – C	b0
cd 8	- AA	b0	cd 44	- C	b0
cd 8/9	„+ G	b0	IVS 2.1	G – A	b0
cd 15	TGG – TGA	b0	IVS 2.745	C – G	b+
cd 27	G – T, Hb Knossos	b+	IVS 2.848	C – A	b+

Ďalšie mutácie: **CD 17 (AAG – TAG), CD 121, CD 58(-C).**

Prevenia a poradenstvo

Každý pacient v súbore je informovaný o povahe svojej choroby. Na konzultácie, prípadne na vyšetrenie sú pozývaní aj príbuzní probanda vo vertikálnej a horizontálnej línii. Manželským párom, hlavne v ktorom je jeden partner z rizikových oblastí, poskytujeme predmanželské a predkoncepčné poradenstvo. Nezanedbateľnou stránkou práce študijnej skupiny je aj erudícia zdravotníckych pracovníkov, aby na uvedenú problematiku mysleli.

Diskusia

Ročne sa narodí vo svete 300 000 detí s vážnou formou talasémie alebo kosáčikovej anémie, hlavne v rozvojových krajinách. Hemoglobínopatie sú až v 3,4 % príčinou mortality u detí do 5 rokov. Asi 7 % gravidných žien sú nositeľkami rôznych génov talasémií a kosáčikovej anémie. So zlepšujúcimi sa hygienickými podmienkami, bojom proti komárom roznášajúcim maláriu a informovanosti obyvateľstva klesá počet klinicky závažných homozygotných foriem (ochorenie u detí, ktoré od oboch rodičov získali genetickú mutáciu pre hemoglobín). Ale aj heterozygotní nositelia genetických mutácií sú nebezpečenstvom pre ďalšie generácie (5).

Je zaujímavé, že v poslednom období sa hlavné problémy s hemoglobínopatiami neobjavujú v pôvodných krajinách výskytu, ale v západnej Európe. Veľká Británia, Francúzsko a Nemecko sú multikulturálne krajiny, v ktorých už v minulosti žili minoritné

skupiny obyvateľstva z rizikových oblastí, a v poslednom období sa situácia zhoršila s príchodom nových imigrantov (6, 7). V týchto krajinách bolo potrebné nielen rozvinúť diagnostiku hemoglobínopatií, skriningové metódy, prenatálnu diagnostiku, ale aj liečbu vážnych homozygotných foriem. Tie sú náročné na transfúziu a chelatačnú liečbu, podpornú liečbu, prípadne aj transplantáciu kostnej drene. Celá problematika neúmerne zaťažuje zdravotné a sociálne systémy západoeurópskych krajín (8).

U nás sme zatiaľ nezaznamenali výskyt vážnych klinických foriem hemoglobínopatií, hoci v minulosti sa na Slovensku vyskytli homozygotné formy u potomkov prisťahovalcov z Chorvátska (1). Z uvedenej štúdie vyplýva, že doteraz máme zaznamenané len ľahké heterozygotné formy ochorenia (beta-talasémia minor alebo intermédia). Najčastejšími mutáciami sú IVS 1.110, IVS 2.1 a IVS 1.6. Celkove sme zaznamenali výskyt 15 mutácií. Naše výsledky sú veľmi podobné s výsledkami prác z Českej republiky (9).

Zvlášť treba pri beta-talasémiách upozorniť na metabolizmus železa. Keďže ide o vrodenú hemolytickú anémiu, prežívanie erytrocytov je v rôznom stupni skrátené a pri ich rozpade sa uvoľňuje väčšie množstvo železa. Toto sa hromadí v parenchymatóznych orgánoch, hlavne v pečeni, so všetkými negatívnymi následkami. Situáciu môže zhoršovať príjem alkoholu, hepatopatia alebo prítomnosť mutácií hereditárnej hemochromatózy, ktoré tiež spôsobujú poruchy v metabolizme

železa. U vybraných pacientov s vysokými hodnotami feritínu a siderémie je potrebné vyšetriť aj obsah Fe v suchom tkanive pečene (metóda MRI).

Našou štúdiou sme urobili prvý krok v tejto oblasti. Je dôležité, že hemoglobinopatie sa dostali do povedomia našich lekárov a že sa mikrocytové anémie prestali liečiť automaticky preparátmi železa. Zvýšilo sa aj povedomie o tejto problematike v populácii a pacienti sami vyhľadávajú lekára. Pokročili sme aj v diagnostike, elektroforéza hemoglobínu sa stala súčasťou väčších hematologických laboratórií, rozšírila sa genetická diagnostika nielen pre beta-talasémie, ale aj pre alfa-talasémie a iné hemoglobinopatie. Napokon treba dodať, že naše výsledky sa dostali do medzinárodných registrov (European Network for Rare and Congenital Anaemias – ENERCA, Thalassaemia International Federation – TIF) (10, 11).

Literatúra

1. Sakalová A. Current problems of diagnosis and treatment of congenital haemolytic anemia. *Slov. Lek.* 1992;2/16 (8-9):39-45.
2. Fábryová V, et al. Anémie. Martin: Osveta; 2017.
3. Wood B, Higgs D. Molecular basis of thalassaemia syndromes. In: Beaumont C, Beris P, Bezaud Y, et al. Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism. Paris: ESH; 2009:251-263.
4. Fábryová V, Božek P, Drakulova M, Kollárová A, Lалуho-ová Striežencová Z, Macichová M. Care for haemoglobinopathy patients in Slovakia. *Centr Eur J Public Health.* 2017;25(1):67-71.
5. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood.* 2010 Jun 3;115(22):4331-6.
6. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108:532-540.
7. Vives Corrons JL, Manu Pereira M. ENERCA. The European network for patients with rare anaemias. *J Rare Dis Diagn Ther.* 2015;1(1):1-9.
8. Piel F. Global epidemiology of haemoglobinopathies: New management challenges. EHA learning centre. 2015 Jun; 12:103588.
9. Divoka M, Partschová M, Kucerova J, Mojzicková R, Cermak J, Pospišilova D, et al. Molecular characterization of beta-thalassaemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and unique mutations. *Hemoglobin.* 2016;40(3):156-162.

10. ENERCA, TIF, IOM. Haemoglobinopathies on the Move: Is Europe ready [online]? ENERCA; 2013. Available from: <https://www.enerca.org/media/upload/arxius/Training/Novartis_OncologyReport_2013.pdf>. Accessed December 20, 2016.
11. Thalassaemia International Federation. The future of hemoglobin disorders and rare anaemias in Europe: observations, key findings and recommendations. Consensus document Thalassaemia international federation (TIF), 4th Pan-European conference 7-9 November 2014, Athens, Greece.

**Doc. MUDr. Viera Fábryová,
CSc., mim. prof.**
Hematológia
Nemocnica sv. Michala
Satinského 1, 811 08 Bratislava
viera.fabryova@nsmas.sk

