

## Talasemia

### Wstęp: Anemia

Pierwszymi objawami anemii (niedokrwistości) są osłabienie, bladość skóry, spadek koncentracji, obniżona aktywność i bóle głowy. Przyczyną jest zmniejszenie zawartości hemoglobiny w krwinkach czerwonych, której wartość zależy od dynamicznej równowagi pomiędzy tworzeniem się komórek w szpiku kostnym i niszczeniem krwinek czerwonych przez układ monocyty/makrofagi w śledzionie. Całkowita ilość krwinek czerwonych opisuje ilościowo erytropoezę, podczas gdy jakość erytropoezy jest wyrażona przez stężenie hemoglobiny. Określenie stanu równowagi erytropoezy możliwe jest dzięki następującym parametrom: hemoglobina (HGB), liczba krwinek czerwonych (RBC), hematokryt (HCT). Anemia pojawia się wtedy, gdy zostaje zachwiana równowaga pomiędzy wytwarzaniem i niszczeniem krwinek czerwonych. Przyczyny mogą być wielorakie, np.: krwotok, niedobór żelaza, zaburzenia wykorzystania żelaza, hemoglobinopatie, guzy, białaczki, niedobory witamin, pasożyty i wiele innych przyczyn.

Zgodnie z WHO (ang. World Health Organization), anemią określane jest zmniejszenie stężenia hemoglobiny lub hematokrytu, odpowiednio:

<b>HGB</b>	Mężczyźni	< 130 g/l (< 8,1 mmol/l)
	Kobiety	< 120 g/l (< 7,5 mmol/l)
<b>HCT</b>	Mężczyźni	< 40% (< 0,40 l/l)
	Kobiety	< 36% (< 0,36 l/l)

Niedokrwistość może być podzielona na makrocytową, normocytową, mikrocytową, hemolityczną, etc., w oparciu o następujące cztery grupy parametrów:

- Określenie retikulocytozy i sprawdzenie erytropoezy (RPI = Reticulocyte Production Index, czyli wskaźnik wytwarzania retikulocytów)
  - RPI > 2 wystarczająca erytropoeza
  - RPI < 2 niewystarczająca erytropoeza
- Średnia objętość krwinki czerwonej (MCV)
  - Mikrocyty < 80 fl
  - Normocyty 80 - 100 fl
  - Makrocyty > 100 fl
- Stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCH)
  - Hipochromiczne < 28 pg
  - Normochromiczne 28 - 32 pg
  - Hiperchromiczne > 32 pg
- Parametry opisujące hemolizę
  - LDH
  - Haptoglobina
  - Bilirubina

### Wskaźnik produkcji retikulocytów RPI

Aby ocenić, czy proces regeneracji krwinek czerwonych jest wystarczająco nasilony, należy skorygować liczbę retikulocytów (RET) względem hematokrytu; tak obliczane jest RPI. Prawdłowo dojrzewanie retikulocytów do dojrzałych krwinek czerwonych trwa cztery dni, z czego przez trzy dni w szpiku kostnym a jeden dzień we krwi obwodowej. W przypadku niedokrwistości, dojrzewanie retikulocytów będzie stopniowo przesuwane do krwi obwodowej – zależnie od hematokrytu (proces ten nazywany jest „przesunięciem”).

HCT	Czas przebywania retikulocytów we krwi obwodowej (przesunięcie)
45%	1,0 dni
35%	1,5 dni
25%	2,0 dni
15%	2,5 dni

### Obliczenie RPI

$$RPI = \frac{RET(\%) \times HCT (l/l)}{\text{przesunięcie} \times 0,45}$$

(0,45 = idealny hematokryt)

### Ocena

Norma	RPI = 1
Dostateczna regeneracja	RPI > 2
Niedostateczna regeneracja	RPI < 2

W czasie diagnozy i leczenia anemii należy pamiętać, że anemia jest zawsze jedynie objawem.

Jeśli liza komórek czerwonych zachodzi normalnie, przyczyną anemii może być niedostateczna erytropoeza (np. niedobór żelaza, witaminy B12/Kwasu foliowego, wyparcie przez białaczkę). Zwiększenie utraty krwinek czerwonych z prawidłową regeneracją (np. hemoliza wewnątrz- lub zewnątrzkrążyniowa, krwotok) może także być przyczyną anemii. Poza tymi dwoma grupami, istnieją także choroby, których etiologia jest złożona. Oznacza to, że problem niedostatecznej erytropoezy i zwiększone niszczenie krwinek czerwonych będzie wspólnie nasilać objawy anemii. Ta grupa obejmuje także talasemie.

### Hemoglobina

Hemoglobina jest barwnikiem krwi zawierającym żelazo. Składa się z części hemowej, wiążącej

żelazo oraz globiny. Białko hemoglobiny ma strukturę tetrameru, który jest złożony z połączenia par łańcuchów globiny. Wyróżnia się cztery różne rodzaje łańcuchów globiny:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  oraz  $\delta$ .

Główną funkcją hemoglobiny jest transport tlenu. Prawidłowe krwinki czerwone zawierają około 280 cząsteczek hemoglobiny, która stanowi 70% stężenia białek erytrocytów. W czasie 120 dni życia, każda krwinka czerwona przemierza dystans około 400 km i umożliwia wymianę  $O_2$  na  $CO_2$  około 175 tysięcy razy.

Najważniejszą cząsteczką hemoglobiny u dorosłych jest  $HbA_1$ , która jest złożona z dwóch łańcuchów alfa i dwóch beta ( $\alpha_2$  i  $\beta_2$ ), zawierających jedną grupę hemową.  $HbF$  ( $\alpha_2$  i  $\gamma_2$ ) oraz  $HbA_2$  ( $\alpha_2$  i  $\delta_2$ ) występują tylko w niewielkich ilościach.  $HbF$  przeważa u płodu.

		Noworodki	Dorośli
( $\alpha_2$ , $\beta_2$ )	Hb A <sub>1</sub>	20 – 40 %	95 – 98 %
( $\alpha_2$ , $\delta_2$ )	Hb A <sub>2</sub>	0,5 %	1,5 – 3,0 %
( $\alpha_2$ , $\gamma_2$ )	Hb F	60 – 80 %	< 1 %

## Talasemia

Talasemie należą do grupy dziedzicznych anemii hemolitycznych, spowodowanych ilościowym zaburzeniem wytwarzania łańcuchów globiny. Nieprawidłowości w budowie hemoglobiny są determinowane genetycznie. Zaburzenia syntezy globiny powodują powstanie różnych wariantów hemoglobiny. Zgodnie z czterema rodzajami łańcuchów globiny, wyróżnia się cztery podstawowe typy talasemii: alfa, beta, gamma i delta. Szczególne znaczenie kliniczne mają talasemie alfa i beta, ponieważ łańcuchy alfa i beta są głównymi składnikami prawidłowej hemoglobiny u osób dorosłych.

Obraz kliniczny przedstawia anemię hemolityczną, której ciężkość jest uwarunkowana genetycznie. Z zasady, jeden prawidłowy gen i jeden gen warunkujący talasemię (heterozygota) w większości przypadków będzie wywoływał łagodną formę choroby (talasemia minor). Dwa identyczne geny talasemii (homozygota) wywołują głębokie zaburzenia syntezy hemoglobiny i ciężką postać kliniczną.

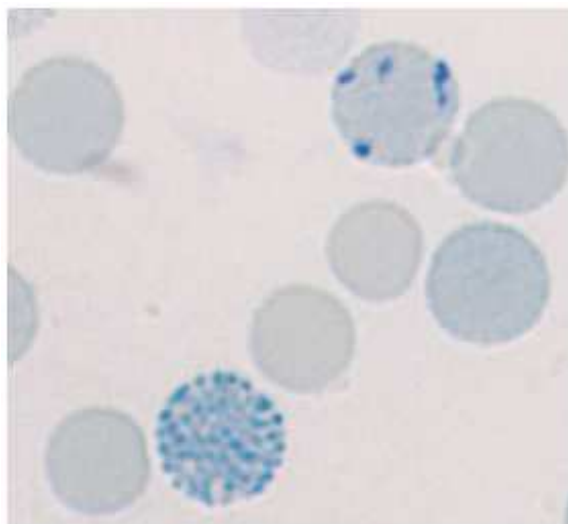
Zmieniona, niedojrzała i wadliwa hemoglobina powoduje przedwczesną śmierć czerwonych ciałek krwi., których czas życia wynosi 30 – 40 dni zamiast 120 dni. W tym procesie uwalniane jest żelazo, które częściowo magazynowane przez organy wewnętrzne i skórę, poważnie je uszkadza. Dodatkowo, szpik kostny rozrasta się i wypełnia dostępne miejsca w przestrzeni szpikowej, co ma

zauważalny wpływ na formę i strukturę kości. Kości twarzy, nóg i rąk są szczególnie narażone na uciążliwe dla pacjentów deformacje. Wątroba i śledziona ulegają powiększeniu, wypełniając całą jamę brzuszną.

## Talasemia alfa

U homozygot w talasemii alfa nie jest formowany łańcuch  $\alpha$ . Zamiast tego wytwarzany jest tetramer z łańcuchów  $\gamma$  (Hb Barta, śmiertelne) lub tetramer z łańcuchów  $\beta$  (HbH). Przy ostatnim nie obserwuje się nieefektywnej erytropoezy, ale zwiększoną hemolizę wywołaną uszkodzeniem błony krwinek czerwonych.

Diagnozą jest potwierdzenie obecności w krwinkach czerwonych HbH. Identyfikuje się ją przez wykrycie tetramerów  $\beta$  wewnątrz komórki w postaci ciałek inkluzyjnych po przyżyciowym barwieniu błękitem brylantynowo-krezylowym. Obecnie diagnoza jest potwierdzana przez badania genetyczne. Heterozygoty prezentują łagodną postać kliniczną choroby.



Ryc. 1. Komórki zawierające HbH; barwienie błękitem brylantynowo-krezylowym

## Talasemia beta

W Europie częściej występuje talasemia beta, która polega na zmniejszeniu lub zaburzeniu syntezy łańcucha  $\beta$ . Forma homozygotyczna jest identyczna z talasemią A2 i jest znana jako „beta talasemia major” pod nazwą „anemia Cooleya”.

- Talasemia major: całkowity brak łańcuchów  $\beta$ , anemia Cooleya. Początek choroby w czasie pierwszego roku życia, ciężka anemia hemolityczna (HGB 30–50 g/l), duża potrzeba transfuzji, wyraźne powiększenie śledziony i wątroby, hiposomia, żółtaczką, zniekształcenie szczęki.
- Talasemia intermedia: łańcuchy  $\beta$  są zredukowane, przewlekła anemia, często nie

ma potrzeby transfuzji, normalny wzrost, sporadycznie pojawiająca się żółtaczka, powiększenie śledzony.

- Talasemia minor: łańcuchy  $\beta$  są nieznacznie zredukowane, bezobjawowa, brak anemii lub przypadkowo wykrywana łagodna anemia mikrocytowa.

### Diagnostyka

1. Podstawowa diagnostyka (morfologia):
  - a. HGB, RBC, HCT, RDW-SD, RDW-CV, MCH, MCV
  - b. Retikulocyty
  - c. Jądrzaste krwinki czerwone (NRBC, erytoblasty) we krwi obwodowej
  - d. Morfologia krwinek czerwonych w ocenie mikroskopowej
2. Elektroforeza hemoglobiny
3. Barwienie błękitem brylantynowo-krezyłowym (ocena zawartości HbH w krwinkach czerwonych)
4. Cytologia szpiku kostnego i barwienie żelaza
5. Parametry hemolizy
6. Ferrytyna

### Morfologia

W celu szybkiego wykrycia i uniknięcia niekoniecznych badań, diagnostyka różnicowa niedoboru żelaza i anemii chorób przewlekłych może być wykonana poprzez analizę wskaźników czerwonych krwinek lub na podstawie rozkładu objętości krwinek czerwonych (RDW-SD, RDW-CV). Różne badania pokazują, że różnicowanie pomiędzy niedoborem żelaza a talasemią w przypadku  $RDW-CV < 15\%$  lub  $RDW-SD < 32\text{ fL}$  w połączeniu z  $MCV < 80\text{ fL}$  może zostać wykorzystane do diagnozy  $\beta$  talasemii minor. Także niektóre algorytmy wykorzystujące wskaźniki czerwonych krwinek – funkcje dyskryminacyjne – są pomocne w diagnozie.

Dwie najważniejsze funkcje dyskryminujące:

#### I. Wskaźnik Mentzera:

$MCV/RBC$

$< 13$   $\beta$ -thalassaemia minor

$> 13$  niedobór lub zaburzenia dystrybucji żelaza

#### II. Wskaźnik Greena:

$MCV^2 \times RDW-CV / HGB (g/l) \times 10$

$< 73$   $\beta$ -thalassaemia minor

$> 73$  niedobór lub zaburzenia dystrybucji żelaza

### Morfologia krwinek czerwonych

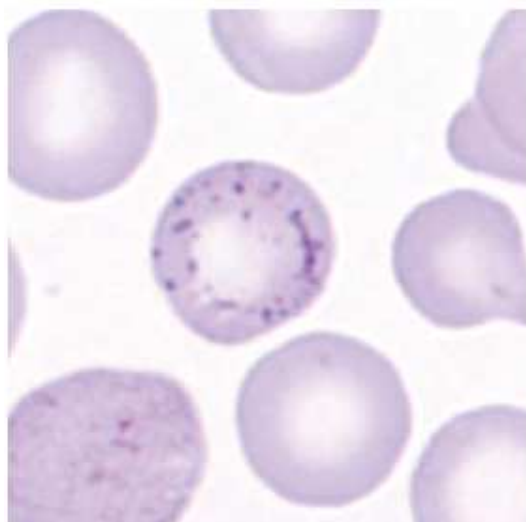
Anizocytoza, poikilocytoza, polichromazja, liczne krwinki tarczowate, nakrapianie zasadochłonne.

Nawet krwinki tarczowate, które posiadają okrągłą przestrzeń o zwiększonej gęstości hemoglobiny

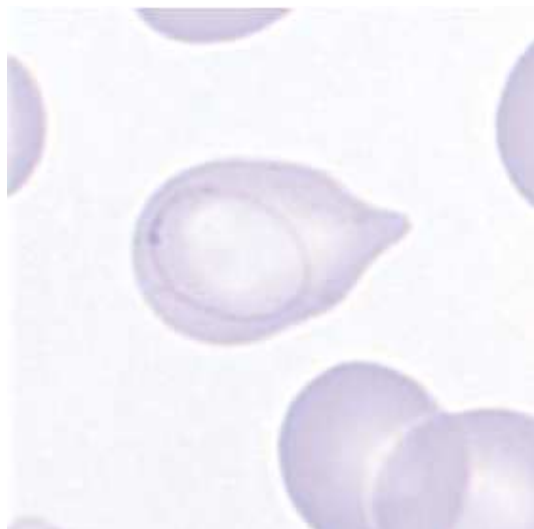
w obrębie środkowego przejaśnienia krwinek czerwonych nie są specyficzne dla talasemii. Jednakże występują częściej niż na przykład w anemii z niedoboru żelaza. Zaburzenia równowagi pomiędzy powierzchnią i objętością komórki są przyczyną zmiany jej kształtu. Zależnie od umiejscowienia krwinek czerwonych na szkiełku mikroskopowym, to środkowe przejaśnienie może być także widziane jako strefa na obrzeżu wewnętrznej części komórki. Nieprawidłowy kształt krwinek czerwonych, takich jak krwinki tarczowate występuje również w warunkach fizjologicznych – ich liczba jest uważana za patologiczną, jeśli przekracza 3% liczby krwinek czerwonych. Oznacza to, że w normalnym polu widzenia w powiększeniu 100-krotnym może znajdować się maksymalnie 5 nieprawidłowych krwinek czerwonych na jedno pole widzenia (około 200 krwinek czerwonych).

Resztki denaturowanego RNA (siateczka endoplazmatyczna) w krwinkach czerwonych są uwidaczniane w barwieniu Pappenheima jako nakrapianie zasadochłonne, które pokazuje nieadekwatne dojrzewanie komórek zarówno w przypadku przyspieszonego wytwarzania w wyniku hemolizy (retikulocytoza) lub jako zmiany krwinek czerwonych w przypadku talasemii, MDS, niedokrwistości złośliwej lub w zatruciu ołowiem. Obecność nakrapiania zasadochłonnego jest lepszym wskaźnikiem talasemii niż niedoboru żelaza, jednakże nie jest specyficzne dla talasemii.

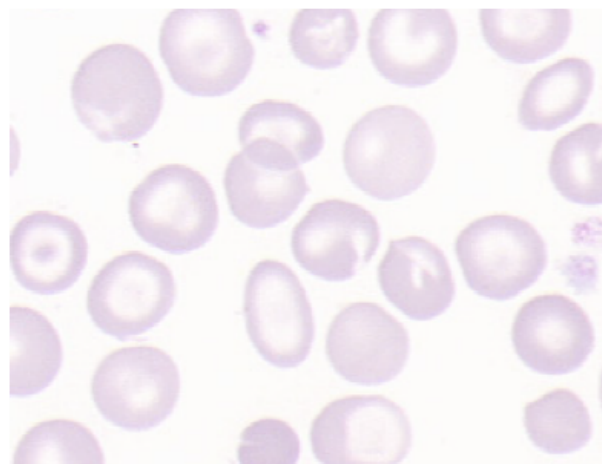
Poza nakrapianiem zasadochłonnym, w talasemii mogą pojawić się pierścienie Cabota, jednak zjawisko to należy do rzadkości.



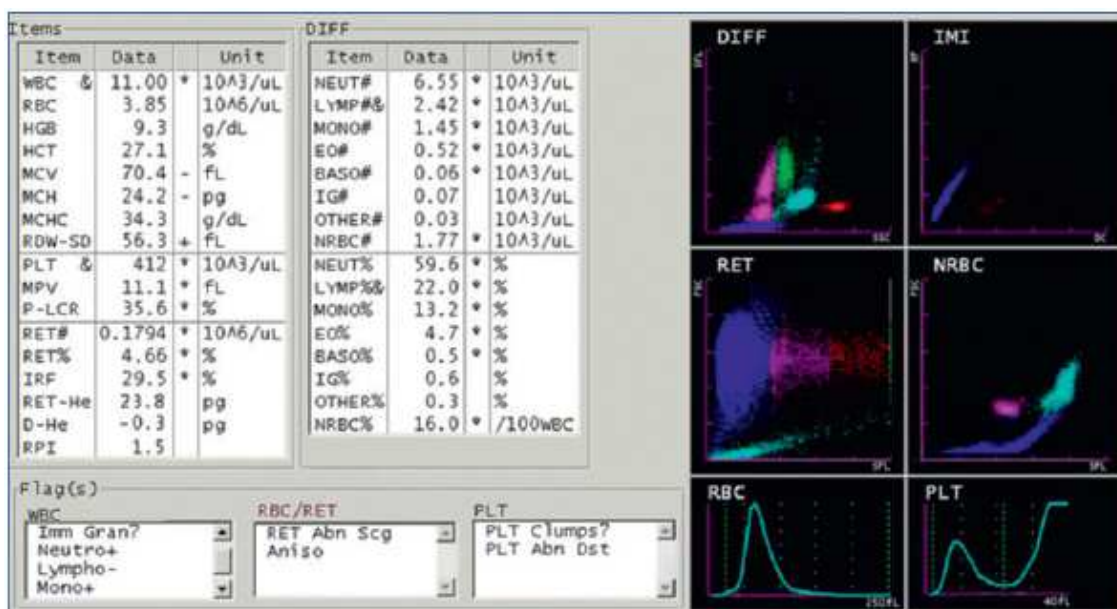
Ryc. 2. Nakrapianie zasadochłonne



Ryc. 3. Pierścień Cabota



Ryc. 4. Rozmaz krwi obwodowej w przypadku



Ryc. 5. Przypadek talasemii beta. Wynik z analizatora XE.

### Studium przypadku

Pacjent, mężczyzna lat 37,  $\beta$ -talasemia intermedia: wyniki z analizatora XE-2100 wskazują na anemię mikrocytową z prawidłowym MCHC, nieefektywną erytropoezę (RET/IRF) i obecność NRBC.

Pomiar NRBC jest możliwy dzięki fluorescencyjnej cytometrii przepływowej i wykorzystaniu barwnika fluorescencyjnego, który barwi kwasy nukleinowe w jądrze i cytoplazmie.

Wysoka liczba wyłącznie ortochromatycznych NRBC (E5) jest wskaźnikiem przewlekłej anemii. Obecność innych stadiów dojrzałości erytroblastów (E3, E4, E5) we krwi obwodowej często jest wskaźnikiem ostrego wzrostu erytropoezy w szpiku

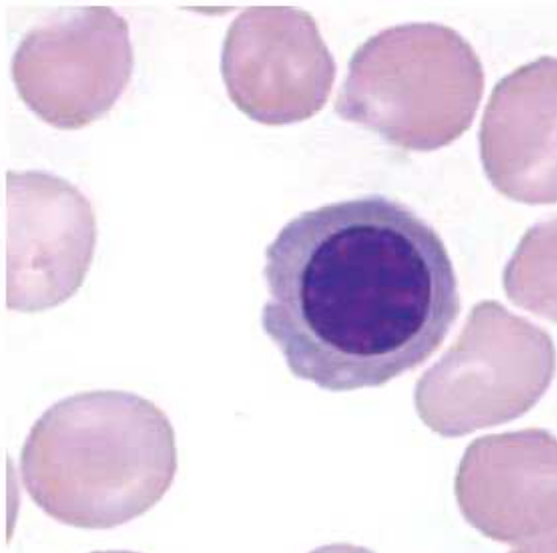
kostnym i raczej nie wskazuje na przewlekłą anemię.

### Leczenie

Standardowym leczeniem talasemii major są regularne przetoczenia krwi (co 2 lub 4 tygodnie). Poza ryzykiem infekcji, jednym z głównych problemów jest przeładowanie organizmu żelazem. Po okresie dobrych 30 lat, postęp terapii daje pacjentom znaczne polepszenie jakości i długości życia.

Rok	Forma terapii	Wynik
1960	Transfuzja	poprawa skutków niedoboru tlenu
1970	Związki	kontrola nadmiaru żelaza

	chelatujące	
1980	Przeszczep szpiku kostnego	możliwość wyleczenia talasemii, jeśli jest dawca
2000	Próby terapii genowej	wiarygodne leczenie talasemii??



Ryc. 6 Erytroblast ortochromatyczny

#### Źródła

[1] Ryan K et al: *Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Brit J Haematol* 149: 35-49, 2010

[2] Kohne E and Kleihauer E: *Hemoglobinopathies: Longitudinal Study Over Four Decades. Dtsch Arztebl Int* 107(5): 65-71, 2010

[3] Internet <http://en.wikipedia.org/wiki/Thalassemia> (free encyclopedia)

[4] [www.labtestsonline.org/understanding/conditions/thalassemia.html](http://www.labtestsonline.org/understanding/conditions/thalassemia.html)

[5] Internet [www.thalassemia.org/](http://www.thalassemia.org/) (Cooley's Anemia Foundation)