

# Problemy diagnostyczne we wrodzonej niedokrwistości hemolitycznej

## Diagnostic difficulties in a congenital hemolytic anemia

Ewa Mendek-Czajkowska<sup>1</sup>, Justyna Spychalska<sup>2</sup>, Krzysztof Warzocha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

<sup>2</sup>Pracownia Niedokrwistości Uwarunkowanych Genetycznie, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Streszczenie

W pracy przedstawiono przypadek trudności diagnostycznych u 20-letniego mężczyzny z objawami niedokrwistości, stanów gorączkowych, żółtaczki, limfadenopatii i hepatosplenomegalii. Z dostarczonej dokumentacji wynikało, że próby wyjaśnienia przyczyny niedokrwistości z towarzyszącą splenomegalią podejmowano wielokrotnie od wczesnego dzieciństwa pacjenta. W wyniku przeprowadzenia kompleksowych badań diagnostycznych rozpoznano wrodzoną niedokrwistość dyserytropoetyczną (CDA) typu II. Ustalenie właściwego rozpoznania CDA umożliwiło wdrożenie leczenia chelatorami żelaza, zapobiegając wystąpieniu wtórnej hemochromatozy.

**Słowa kluczowe:** wrodzona niedokrwistość dyserytropoetyczna, patogeneza, objawy kliniczne, leczenie

*Hematologia* 2013; 4, 2:179–183

### Abstract

Difficulties encountered with making a diagnosis is described in a case study of a 20-year-old man presenting with anaemia, fever, jaundice, lymphadenopathy and hepatosplenomegaly. The patient's medical records reveal that since early childhood, attempts had been made to resolve the reasons behind a pre-existing anaemia and splenomegaly. However, after performing a complex series of diagnostic tests, type II of congenital dyserythropoietic anemia (CDA) was finally diagnosed. This accurate diagnosis, thus enabled chelator therapy to be commenced so as to prevent the occurrence of secondary haemochromatosis.

**Key words:** congenital dyserythropoietic anemia, pathogenesis, clinical features, therapy

*Hematologia* 2013; 4, 2:179–183

### Wprowadzenie

Do Kliniki Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii przyjęto 20-letniego chorego, by ustalić przyczynę stanów gorączkowych, postępującego pogorszenia tolerancji wysiłku z towarzyszącym zażółceniem powłok skórnych, limfadenopatią

oraz splenomegalią. Z dostarczonej dokumentacji wynikało, że próby wyjaśnienia przyczyny niedokrwistości normocytowej, której towarzyszyły niska retikulocytoza, hiperbilirubinemia oraz splenomegalia, były podejmowane wielokrotnie od wczesnego dzieciństwa pacjenta. W okresie szkolnym chory otrzymywał suplementację preparatami

**Adres do korespondencji:** Ewa Mendek-Czajkowska, Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–796 Warszawa, e-mail: ewaczajkowska1@op.pl

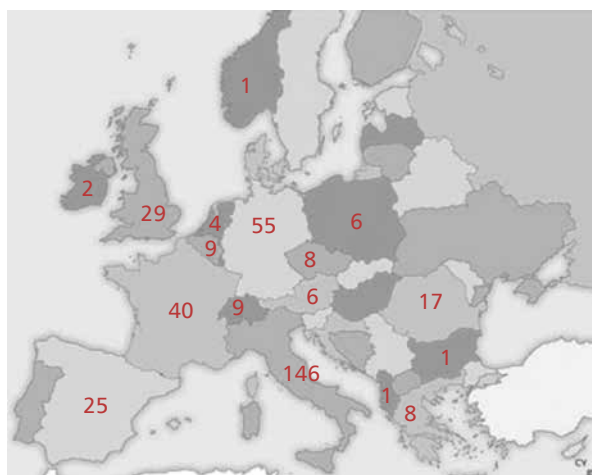
**Tabela 1.** Cechy charakterystyczne określonych podtypów wrodzonych niedokrwistości dyserythropoetycznych (CDA)**Table 1.** Characteristic features of different types of congenital dyserythropoietic anaemia (CDA)

Cecha	CDA typu I	CDA typu II	CDA typu III
Dziedziczenie	Autosomalnie recesywne	Autosomalnie recesywne	Autosomalnie dominujące
Morfologia erytroblastów	Makrocytoza, dwujądrzastość, międzyjądrowe mostki chromatynowe, nieciągła błona jądrowa, struktura chromatyny <i>swisse cheese</i>	Dwu- lub wielojądrzastość, <i>karryorhexis</i> , zaburzenia cytokinezy	Gigantoblastoza, wielojądrzastość (do 12 jąder), nakrapianie zasadochtonne
Nazwa/ <i>locus</i> genu	<i>CDAN1</i> /15q (15.1.3)	<i>SEC23B</i> /20p11.23-20p12.1	Nieznany/15q (21-25)

żelaza, zarówno w trakcie kolejnych hospitalizacji, jak i w warunkach ambulatoryjnych. Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych wówczas badań nie wyjaśniono przyczyny niedokrwistości hemolitycznej z towarzyszącą splenomegalią. W czasie hospitalizacji w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii dodatkowo prowadzono diagnostykę w kierunku choroby układowej przebiegającej z limfadenopatią i stanami gorączkowymi, w tym o etiologii wirusowej lub/i nowotworowej.

Wrodzone niedokrwistości dyserythropoetyczne (CDA, *congenital dyserythropoietic anemias*) stanowią heterogenną grupę rzadko rozpoznawanych niedokrwistości o nieznannej etiologii, charakteryzujących się wzmożoną nieefektywną erythropoezą, wielojądrzastością jąder erytroblastów w ocenie cytomorfologicznej aspiratów szpiku oraz wtórnym gromadzeniem żelaza w tkankach. Przyczyną objawowej niedokrwistości jest niszczenie erytroblastów w szpiku, co jest powodem braku wyraźnie podwyższonej retikulocytozy. Uwzględniając kryteria morfologiczne erytroblastów, typ dziedziczenia oraz charakterystyczne zmiany w kariotypie opracowano klasyfikację z podziałem na trzy grupy (tab. 1). Do 2010 roku w rejestrze niemieckim zarejestrowano 740 przypadków wszystkich podtypów CDA (ryc. 1) [1].

Wczesne rozpoznanie niedokrwistości dyserythropoetycznej zapewnia chorym wdrożenie właściwego leczenia na podstawie monitorowania gospodarki tkankowej żelazem, co zapobiega hemochromatozie wtórnej. W tej grupie chorych w większości przypadków przebieg niedokrwistości jest łagodny i nie wpływa na długość przeżycia. W okresie zaostrzeń hemolizy wskazane jest przetaczanie krwi. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa usunięcie śledziony może wpłynąć korzystnie na przebieg niedokrwistości, jednak — ze względu na bardzo małą grupę chorych i krótki czas obserwacji — trudno ustalić standard postępowania [2–4].



**Rycina 1.** Liczba przypadków wrodzonej niedokrwistości dyserythropoetycznej typu II rozpoznanych w Europie w ciągu 42-letniej obserwacji (na podstawie [1])

**Figure 1.** European geocodes of the congenital dyserythropoietic anemia type cases diagnosed in Europe in a 42-yr period (based on [1])

## Opis przypadku

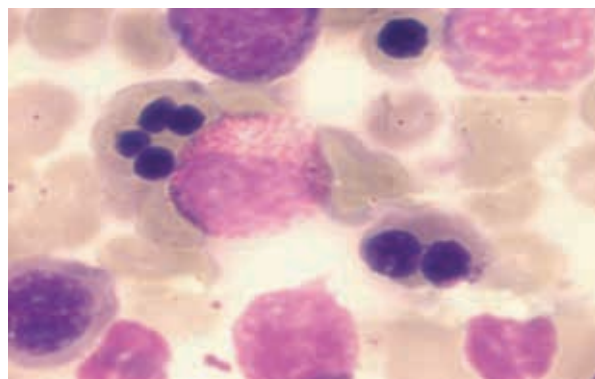
Przy przyjęciu do Kliniki pacjent był w średnim stanie ogólnym, miał wysoką gorączkę i zgłaszał postępujące pogorszenie tolerancji wysiłku oraz uogólnione dolegliwości bólowe. W szpitalu rejonowym, z którego chory został przeniesiony, stosowano szerokospektralną antybiotykoterapię, przetoczenia koncentratów krwinek czerwonych (kkcz) oraz leczenie objawowe. W badaniu przedmiotowym spośród odchyłeń od stanu prawidłowego, poza zażółceniem powłok skórnych, stwierdzono powiększenie obwodowych węzłów chłonnych oraz hepatosplenomegalię. W badaniu morfologii krwi stwierdzano niedokrwistość normocytową (stężenie hemoglobiny [Hb] 10,5 g/dl, liczba krwi-

nek czerwonych 3,76 T/l, średnia objętość krwinki [MCV, *mean corpuscular volume*] 82,6 fl) z retikulocytozą 2,5%. Poza tym uwagę zwracała obniżona leukocytoza (3,76 G/l) z przewagą limfocytów w rozmazie; liczba płytek krwi (217 G/l) pozostawała normie. W ocenie mikroskopowej krwinek czerwonych opisywano anizocytozę i poikilocytozę. Stężenie bilirubiny całkowitej wynosiło 3,01 mg/dl (bezpośrednia 0,31 mg/dl), przy prawidłowych parametrach biochemicznych wydolności wątroby i nerek. Zwracało uwagę podwyższone stężenie żelaza w surowicy 244  $\mu\text{g/dl}$  (norma 60–140  $\mu\text{g/dl}$ ) i oznaczona metodą izotopową niska utajona zdolność wiązania żelaza przez białka osocza 3,5  $\mu\text{mol/l}$  (norma  $33,9 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$ ). W badaniach obrazowych jamy brzusznej stwierdzono powiększoną wątrobę (do 200 mm) i śledzionę (180 mm), z obecnością pojedynczych węzłów chłonnych (do 30 mm) w okolicy wnęki wątroby. W badaniu radiologicznym klatki piersiowej nie wykazano patologii.

W ocenie cytomorfologicznej aspiratów szpiku, przy obrazie bardzo bogatokomórkowym, układ erytroblastyczny stanowił 82%, z obecnością erytroblastów dwu- i wielojądrzastych, między którymi występowały „mostki międzyjądrowe” (ryc. 2). W mikroskopie elektronowym stwierdzono obwodowo umieszczone cysterny retikulum endoplazmatycznego pod błoną komórkową (ryc. 3).

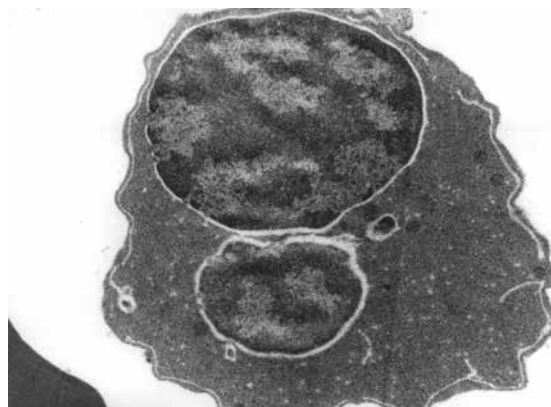
W badaniach serologicznych nie wykryto auto-przeciwciał ani składnika C3 dopełniacza, w surowicy natomiast były obecne zimne aglutyniny o swoistości anty-I, w mianie 1:8, wykazujące aktywność tylko w temperaturze 4 °C (cechy niewskazujące na patogenność wykrytych auto-przeciwciał), z silną ekspresją antygeny i na krwinkach czerwonych. Wynik testu lizy erytrocytów w zakwaszonej surowicy był dodatni. W surowicy stwierdzono obecność przeciwciał klas IgM i IgG świadczącą o aktywnym zakażeniu CMV (*cytomegalovirus*). Wyniki pozostałych wirusologicznych badań serologicznych były ujemne.

Wyniki badań izotopowych były typowe dla zespołu nieefektywnej erytropoezy i wykazały prawidłowy czas przeżycia krwinek czerwonych. Dodatkowo potwierdzono zwiększony wychwyty żelaza przez śledzionę i wątrobę charakterystyczny dla stanów nadmiaru żelaza w ustroju. W badaniu ferrokinetyki nadmierna radioaktywność powierzchniowa nad kością krzyżową wskazywała na nieefektywną erytropoezę z nadczynnością szpiku kostnego. Niemożliwe było wykonanie badań w kierunku wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych ze względu na zbyt krótki czas po przetoczeniu kkc. Na tym etapie diagnostyki



**Rycina 2.** Postacie morfologiczne erytroblastów zawierających więcej niż jedno jądro obserwowano w rozmazach szpiku chorego (barwienie May-Grunwald-Giemsa  $\times 100$ )

**Figure 2.** Morphological forms of erythroblasts containing more than one nucleus observed in bone marrow patient smear (stained by May-Grunwald-Giemsa  $\times 100$ )



**Rycina 3.** Obwodowo umieszczone cysterny imitujące podwójną błonę komórkową erytroblastów (powiększenie  $\times 10\,000$ )

**Figure 3.** Peripheral cistern looping like double membrane of erythroblasts (magnitude  $\times 10\,000$ )

wdrożono leczenie objawowe desferoksaminą oraz suplementację witaminą B<sub>12</sub> i kwasem foliowym.

Po upływie 3 miesięcy stan ogólny chorego zdecydowanie się poprawił: ustąpiły dolegliwości kliniczne, w badaniu przedmiotowym nie stwierdzano powiększonych węzłów chłonnych obwodowych, normalizacji uległa wielkość wątroby, a śledziona zmniejszyła się do 150 mm, ponadto nie obserwowano limfadenopatii. W badaniu morfologii krwi wykazano wzrost stężenia Hb do 10–11 g/dl, z prawidłową retikulocytozą; nadal stwierdzano anizocytozę i poikilocytozę krwinek czerwonych.

Kontynuowano diagnostykę w celu ustalenia przyczyny defektu erytrocytów po upływie

3 miesiący od daty ostatniego przetoczenia kkc. Ostatecznym potwierdzeniem rozpoznania CDA typu II było wykrycie nieprawidłowości w budowie glikokoniugatów błonowych krwinek czerwonych w postaci hipoglikozylacji białka prążka 3 i podwyższonego stężenia glikosfingolipidów oraz nieprawidłowości w budowie glikoforyny A. By potwierdzić genetyczne podłoże choroby, badaniom poddano rodziców i brata chorego. Stwierdzono obecność defektu w obrębie genu zlokalizowanego w chromosomie 20q11.2. Rodzice byli heterozygotami, brat chorego był zdrowy (homozygota).

Trzy lata temu u pacjenta wykonano zabieg cholecystektomii metodą laparoskopową. Obecnie wyniki badań służących do oceny gospodarki tkankowej żelaza są w zakresie wartości referencyjnych przy stabilnych parametrach morfologii krwi. Chory od 2000 roku pozostaje pod opieką Kliniki Hematologii i Poradni Chorych na Wrodzone Niedokrwistości Instytutu Hematologii i Transfuzjologii.

## Dyskusja

Przedstawiony przypadek zasługuje na omówienie z powodu długo nierozpoznanej niedokrwistości hemolitycznej w przebiegu CDA, której wyjaśnienie nastąpiło po wielu latach trwania choroby w trakcie diagnostyki podejrzenia innego schorzenia układowego. Podobnie jak w innych genetycznie uwarunkowanych niedokrwistościach hemolitycznych u pacjenta stwierdzano niedokrwistość z towarzyszącymi hiperbilirubinemią i splenomegalią. Zwracała jednak uwagę niewspółmiernie niska retikulocytoza. Dodatkowo współistniejące uogólnione powiększenie węzłów chłonnych i hepatosplenomegalia z towarzyszącymi objawami ogólnymi (pogorszenie tolerancji wysiłku, nadmierna potliwość, stany gorączkowe) były powodem rozszerzenia diagnostyki w kierunku choroby układowej. W tym zakresie potwierdzono jedyne aktywne zakażenie CMV; pozostałe serologiczne wykładniki zakażeń wirusowych, podobnie jak wyniki badań w kierunku choroby nowotworowej układu chłonnego, były ujemne.

Rozmazy aspiratów szpiku w ocenie w mikroskopie świetlnym były bardzo bogatokomórkowe; układ czerwokrwiński stanowił 81,5% utkania, w erytroblastach stwierdzono obecność podwójnych jąder z „mostkami międzyjądrowymi” oraz nieliczne komórki wielojądrzaste [5, 6]. W mikroskopie elektronowym stwierdzono obwodowo umieszczone cysterny imitujące podwójną błonę komórkową [7]. W ocenie histopatologicznej trepa-

nobiopatu utkanie krwiotwórcze reprezentowały głównie linia czerwokrwińska z cechami dyserytropoezy i mniej liczna linia białokrwińska. Liczba megakariocytów pozostawała na dolnej granicy normy, postacie były prawidłowe, ogniskowo stwierdzano zagęszczony rysunek włókien retikuliny podścieliska.

Na tym etapie diagnostyki, po wykluczeniu choroby nowotworowej układu chłonnego, zespołu mielodysplastycznego, autoimmunologicznej niedokrwistości hemolitycznej i niedokrwistości wieloniedoborowych, najwłaściwszym postępowaniem terapeutycznym było wdrożenie leczenia systemowego preparatami chelatującymi żelazo. W badaniu ferrokinetyki stwierdzono zwiększony wychwyt żelaza przez śledzionę i wątrobę charakterystyczny dla stanów nadmiaru żelaza w ustroju. Badania biochemiczne o wysokiej specyficzności składu błon komórkowych erytrocytów, wykazujące nieprawidłowości glikokoniugatów w postaci hipoglikozylacji białka prążka 3 i glikoforyny A oraz podwyższonego stężenia glikosfingolipidów, były ostatecznym potwierdzeniem rozpoznania CDA typu II, której przyczynami są nieefektywna erytropoeza i obwodowa hemoliza [8–14]. Nieprawidłowa budowa erytroblastów jest przyczyną ich nadmiernego niszczenia w szpiku i niskiej retikulocytozy we krwi obwodowej. Niszczenie wewnątrzszpikowe erytrocytów zależy od zmian strukturalnych glikokoniugatów wchodzących w skład białek prążka 3 i prążka 4,5 (odpowiedzialnych za transport jonów i glukozy do komórki). Erytrocyty o zmienionej budowie błon komórkowych mają zmniejszoną odkształcalność, co jest przyczyną ich nadmiernego niszczenia w układzie siateczkowo-śródbłonkowym, szczególnie śledzionowym [4].

Patogeneza niedokrwistości dyserytropoezy jest bardzo złożona, a przebieg kliniczny, jak wynika z obserwacji własnych i dostępnych w piśmiennictwie informacji, jest pozornie łagodny przy właściwym postępowaniu terapeutycznym. Najczęściej występuje dziedziczna autosomalnie recesywnie niedokrwistość typu II, zwana także wrodzoną wielojądrzastością erytroblastów z dodatnim testem lizy w zakwaszonej surowicy wskutek aktywacji dopełniacza (test Hama), czyli HEMPAS (*hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum test*). Zmutowany gen *SEC23B* odpowiedzialny za jej występowanie jest zlokalizowany na chromosomie 20 w *locus* 20q11.23-20p12.1 [11, 12, 15]. Gen *SEC23B* koduje białko SEC23 wchodzące w skład kompleksu COPII odpowiedzialnego za transport białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. Wskutek

mutacji w erytroblastach dochodzi do zaburzeń w transporcie i glikozylacji białek błonowych. Najczęściej występującymi objawami klinicznymi są: nadmierna męczliwość zależna od niedokrwistości o różnym stopniu nasilenia, zażółcenie powłok związane z hiperbilirubinemią, hepatosplenomegalia z towarzyszącą kamicią pęcherzyka żółciowego oraz postępująca niewydolność wielonarządowa w przebiegu hemochromatozy. W ocenie cytomorfologicznej szpiku obecne są erytroblasty dwu- i wielojądrzaste, głównie ortochromatyczne, zawierające dwa lub więcej jąder. W rozmazie krwi obwodowej stwierdza się krwinki czerwone z ziarnistościami zasadochłonnymi oraz opisuje anizocytozę i poikilocytozę; często występują sferocyty. Na krwinkach czerwonych stwierdza się równoczesne występowanie antygenów **I** oraz **I**. Zaburzenia biochemiczne erytrocytów typowe dla tej choroby są wynikiem upośledzonej glikozylacji białek błonowych prążka 3 i 4,5 (*glucose transporter-1 erythrocyte membrane protein*), przy jednoczesnej nadmiernej glikozylacji sfingolipidów [15, 16].

### Podsumowanie

W piśmiennictwie dominują opinie o łagodnym przebiegu klinicznym CDA typu II pod warunkiem wczesnego ustalenia rozpoznania i wdrożenia właściwego leczenia. Zdarzają się jednak opisy przypadków, w których powikłania zależne od niewydolności wielonarządowej w przebiegu hemochromatozy wtórnej doprowadziły do zgonu młodych chorych [17]. Nieprawidłowości stwierdzane w CDA należy różnicować ze znacznie częściej występującą wtórną dyserythropoezą w przebiegu niedokrwistości niedoborowych, zespołami mielodysplastycznymi czy długo trwającą niedokrwistością hemolityczną o podłożu autoimmunologicznym. Stwierdzenie nieefektywnej erythropoezy powinno zmierzać do wyjaśnienia jej przyczyn oraz być sygnałem do koniecznego monitorowania gospodarki tkankowej żelazem i podjęcia decyzji o wdrożeniu leczenia chelatującego.

### Piśmiennictwo

1. Heimpel H., Matuschek A., Ahmed M. i wsp. Frequency of congenital dyserythropoietic anemias in Europe. *Eur. J. Haematol.* 2010; 85: 20–25.
2. Heimpel H., Forteza-Vila J., Queisser W., Spiertz B. Electro and light microscopic study of erythroblasts of patients with congenital dyserythropoietic anemia. *Blood* 1971; 37: 299–310.
3. Mentezer W.C., Wagner G.M. Introduction to the hereditary hemolytic anemia. *The hereditary hemolytic anemias*. Churchill Livingstone, New York 1989: 16–19.
4. Sychalska J. Membranopatie krwinek czerwonych — patogeneza, obraz kliniczny i diagnostyka. *Hematologia* 2012; 3: 81–119.
5. Koehler M., Schmidt-Riese L., Brandeis W.E. Badania morfologiczne erytrocytów we wrodzonej anemii dyserythropoetycznej typu II. *Acta Haemat. Pol.* 1990; 2: 144–152.
6. Heimpel H., Kellermann K., Neuschwander N., Högel J., Schwarz K. The morphological diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia: results of a quantitative analysis of peripheral blood and bone marrow cells. *Haematologica* 2010; 95: 1034–1036.
7. Alloisio N., Texier P., Denoroy L. i wsp. The cisternae decorating the red cell membrane in congenital dyserythropoietic anemia (type II) derive from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1996; 87: 4433–4439.
8. Kościelak J. Diseases of aberrant glycosylation. *Acta Bioch. Pol.* 1995; 42: 1–10.
9. Zdebska E., Kościelak J. A single sample method for determination of carbohydrate and protrin contents of glycoprotein band separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Ann. Biochem.* 1999; 275: 171–179.
10. Zdebska E., Anselstetter V., Pacuszka T. i wsp. Glicolipides and glycopeptides of red cell membranes in congenital dyserythropoietic anemia type II (CDA II). *Br. J. Haematol.* 1987; 66: 385–391.
11. Gasporini P., del Giudice E.M., Delaney J. Localization of the congenital dyserythropoietic anemia II locus to chromosome 20q 11.2 by genome-wide research. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 1122–1166.
12. Bianchi P., Fermo E., Vercellati C i wsp. Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAII) is caused by mutations in the SEC23B gene. *Hum. Mutat.* 2009; 30: 1292–1298.
13. Schwarz K., Iolascon A., Verissimo F. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nat. Genet.* 2009; 41: 936–940.
14. Zdebska E., Mendek-Czajkowska E., Ploski R., Woźniewicz B., Kościelak J. Heterozygosity of CDAN II (HEMPAS) gene may be detected by the analysis of erythrocyte membrane glycoconjugates from healthy carriers. *Haematologica* 2002; 87: 126–130.
15. Zdebska E., Iolascon A., Sychalska J. i wsp. Abnormalities of erythrocyte glycoconjugates are identical in two families with congenital dyserythropoietic anemia type II with different chromosomal localizations of the disease gene. *Haematologica* 2007; 92: 427–428.
16. Zdebska E., Adamczyk-Popławska M., Kościelak J. Glycophorin A in two patients with congenital dyserythropoietic anemia type I and type II is partly unglycosylated. *Acta Biochim. Pol.* 2000; 47: 773–779.
17. Jabłońska-Skwiecińska E. Wrodzona niedokrwistość dyserythropoetyczna typu II — HEMPAS rozpoznawana błędnie jako wrodzona niedokrwistość hemolityczna. *Acta Haematol. Pol.* 1997; 28: 325–329.