

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/35456> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Hassan, Suha Mustafa

**Title:** Toward prevention of Hemoglobinopathies in Oman

**Issue Date:** 2015-09-22

## SAMENVATTING

Hemoglobinopathieën (HBP) behoren tot 's werelds meest voorkomende autosomaal recessief overervende aandoeningen, en komen vooral voor in Afrika, India, het mediterrane gebied, het Verre- en Nabije Oosten, waaronder ook Oman. HBP zijn het gevolg van mutaties die structurele afwijkingen veroorzaken in het hemoglobine molecule (abnormale hemoglobines) of de expressie van de globine genen beïnvloeden waarbij de globine synthese verlaagd of zelfs geheel afwezig is, met anemie tot gevolg. Draggers van HBP zijn doorgaans asymptomatisch, echter als risicopaar hebben zij 25% kans op een ernstig aangedaan kind.

Een van de belangrijkste uitdagingen op het gebied van volksgezondheid voor de meeste Arabische landen en Oman in het bijzonder, is de hoge prevalentie van HBP, m.n. sikkelcelziekte (SCZ) en beta-thalassemie Major (TM). De hoge prevalentie voor HBP in deze gebieden is het gevolg van positieve selectie van dragers door malaria tropica. Bovendien draagt in Oman de sociaal-cultureel bepaalde traditie van consanguine huwelijken bij tot een verhoogde incidentie van kinderen met een ernstige vorm van HBP. Ongeveer 10% van de Omaanse populatie is drager van SCZ, 3% is drager van beta-thalassemie terwijl tenminste de helft drager is van alfa-thalassemie. Ook al is de ziekte behandelbaar, op een HLA identieke beenmergtransplantatie na zijn er tot op heden geen mogelijkheden tot genezing. De Omaanse autoriteiten op het gebied van publieke gezondheidszorg hebben zich niet alleen gericht op de beste behandeling en patiëntenzorg, maar ook op het terugdringen van het aantal aangedane geboorten. De laatste tien jaar heeft het premaritaal identificeren van risicoparen en het aanbieden van genetisch advies door speciaal hiervoor opgerichte nationale klinieken, een bijdrage geleverd aan de preventie van HBP. Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar het mutatiespectrum van HBP en de genetische determinanten die de ernst van de ziekte beïnvloeden om zo een bijdrage te leveren in het ontwikkelen van een preventie strategie voor de ernstige vormen van HBP in Oman.

Om via premaritale counseling het genetisch risico op HBP in het nageslacht beter te kunnen bepalen werd het moleculaire spectrum aan globine genmutaties die voorkomen in Oman onderzocht. Hoofdstuk 4 heeft betrekking op een eerste studie onder 87 niet-verwante Omani, homo- of heterozygoot voor beta-thalassemie, afkomstig uit vier verschillende gebieden in Oman. Daarbij werden 11 verschillende beta-thalassemie mutaties aangetoond, waarbij tenminste 56% van de individuen eveneens hetero- of homozygoot bleek te zijn voor de meest voorkomende alfa-thalassemie deleties, m.n. de alfa3.7kb en alfa4.2kb deletie. Een breder spectrum aan mutaties werd verkregen door de studie beschreven in hoofdstuk 5 waarbij nog eens een groot aantal individuen (n=446), behorende tot verschillende stammen en afkomstig uit zeven verschillende gebieden, werden onderzocht. Hierbij werden 32 verschillende beta-thalassemie mutaties gevonden, waarvan 11 voor het eerst beschreven in de Omaanse populatie. Hoofdstuk 7 beschrijft de analyse van de alfa-globine gendefecten. Op basis van de hematologische bepalingen werden de in totaal 634 individuen ingedeeld in 7 groepen en op moleculair niveau onderzocht. Er werden 21 verschillende alfa-gendefecten gevonden, waarvan 15 voor het eerst in Oman. Twee nieuwe alfa-gendefecten werden in deze studie voor het eerst beschreven. In hoofdstuk 6 worden twee casussen apart beschreven, de eerste is een alfa-globine variant gevonden in een consanguin echtpaar die vermoedelijk

de ernstige hemolytische anemie verklaart bij de foetus. De tweede betreft een nieuwe promotor mutatie van het beta-globine gen geassocieerd met een borderline/licht verhoogde HbA<sub>2</sub>, indicatief voor een mild  $\beta^+$ -thalassemisch effect. De sterke heterogeniteit van veel voorkomende, zeldzame en nieuwe beta- en alfa-globine gedefecten (hoofdstuk 4, 5, 6 en 7) weerspiegelt het historisch migratiepatroon en etnische vermenging van de Omaanse bevolking en benadrukt de noodzaak van het implementeren van DNA tests om het genetisch risico in pre-maritale screening en counseling adequaat te kunnen bepalen. Vooral wanneer alfa- en beta-thalassemie defecten gecombineerd voorkomen, zijn DNA tests onmisbaar om een voorspelling van het risico voor het nageslacht op basis van het genotype te kunnen doen en cruciaal voor de 'state-of-the-art' prenatale diagnostiek in de toekomst.

In hoofdstuk 8 is gekeken naar factoren in de Omaanse HbP populatie die de HbA<sub>2</sub> meting en daarmee de diagnose beta-thalassemie trait beïnvloeden, zoals delta-gedefecten en ijzerdeficiëntie. Dit is met name belangrijk bij dragerschapscreening van beta-thalassemie aangezien een co-existerend delta-gedefect (delta-thalassemie of delta-globine variant) in een drager de HbA<sub>2</sub> normaliseert met een verkeerde diagnose tot gevolg. Hiertoe werden 33 gevallen met een verlaagd HbA<sub>2</sub> percentage onderzocht. Er werden 10 verschillende delta-gen defecten gevonden in 20 individuen, waarvan twee niet eerder in de literatuur gerapporteerd. Het bepalen van en kennis over het delta-globinegen mutatiespectrum draagt stellig bij tot de betrouwbaarheid van pre-maritale screening en genetische counseling voor beta-thalassemie in de Omaanse populatie.

Afhankelijk van de complexiteit van het genotype en het haplotype kunnen sikkkelcelpatiënten onderling een enorme variabiliteit in morbiditeit en reactie op therapie vertonen. In hoofdstuk 9, 10 en 11 worden de klassieke hiermee geassocieerde determinanten onderzocht. In hoofdstuk 9 werd de associatie tussen fenotype en (sub)haplotype onderzocht in 125 patiënten met sikkkelcelziekte. Van de in totaal 11 verschillende haplotype combinaties bleek het klinisch mildere Aziatische HbS haplotype het meest voor te komen. In hoofdstuk 10 werd in 52 met Hydroxy-Ureum (HU) behandelde sikkkelcelpatiënten gekeken naar de responsie op behandeling in relatie tot de aanwezigheid van het XmnI polymorfisme (T/T of T/C) in de promotoren van de gamma globine genen. Hieruit bleek dat sikkkelcelpatiënten, homo- of heterozygoot voor het XmnI polymorfisme (T/T of T/C), effectiever reageerden op HU behandeling en daarmee een milder klinisch fenotype vertoonden dan patiënten zonder dit XmnI polymorfisme (C/C). In hoofdstuk 11 werd in hetzelfde cohort van 125 sikkkelcelpatiënten naar de invloed gekeken van de aan- of afwezigheid van alfa-thalassemie op de klinische ernst in patiënten met hetzelfde beta-genotype en haplotype. Daarbij werd gevonden dat de algehele hematologische condities door aanwezigheid van alfa-thalassemie gunstiger zijn, maar dat een verbetering in de algemene ernst van het ziektebeeld alleen merkbaar is wanneer groepen patiënten met eenzelfde haplotype met elkaar worden vergeleken. Van deze correlerende studies kan worden geconcludeerd dat noch haplotype of sub-haplotype, noch het XmnI polymorfisme, noch alfa-thalassemie alleen volledig de variatie in klinisch fenotype kan verklaren in patiënten met SCZ en dat andere, waarschijnlijk externe factoren een rol spelen in het verschil in expressie van de ziekte. Desalniettemin is het identificeren van genetische factoren noodzakelijk voor het stellen van de juiste diagnose en prognose en voor de beste behandeling op maat van aangedane kinderen.

In hoofdstuk 12 werd het nut van Next Generation Sequencing (NGS) tools zoals de Ion Torrent PGM als diagnostische screeningsmethode voor beta-thalassemie en HbS onderzocht. Hierbij werden DNA monsters van in totaal 297 Omaanse patiënten en dragers van beta-thalassemie en HbS getest op het voorkomen van mutaties in het beta-globine gen. Door gebruik te maken van barcode primers en uni-directionele sequentie-analyse werden van 100 individuen simultaan de mutaties in het beta-gen betrouwbaar gedetecteerd. Deze resultaten toonden aan dat de Ion Torrent in de toekomst de traditionele Sanger sequencing zou kunnen vervangen en dat het, mits financieel haalbaar, een krachtige diagnostische methode is voor toepassing in grootschalige nationale screeningsprogramma's voor HbP dragers of dragers van andere veelvoorkomende genetisch aandoeningen.

Een gedegen counseling voor het huwelijk is momenteel de enige formele optie in Oman om risicoparen te informeren over erfelijkheidsrisico. Hiermee zijn de opties voor preventie beperkt tot aanpassing van de partnerkeuze wanneer sprake blijkt te zijn van genetisch risico voor het nageslacht of continuering van het huwelijk in de hoopvolle verwachting van een niet-aangedaan kind. Het aanbieden van prenatale diagnostiek met als doel beëindiging van aangedane zwangerschappen is tot op heden het meest effectief in de preventie van ernstige vormen van hemoglobinopathie. In hoofdstuk 13 wordt beschreven wat de houding is van 35 Omaanse risicoparen ten aanzien van prenatale diagnostiek en abortus op medische indicatie. Hoewel de meerderheid van de risicoparen om prenatale diagnostiek zou hebben verzocht indien de mogelijkheid bestond, wordt de kijk op zwangerschapsbeëindiging sterk beïnvloed door de Islam en de opvattingen van de Muftee, de belangrijkste religieuze autoriteit van het land. Wanneer echter de publieke bewustwording over prenatale diagnostiek toeneemt en de autoriteiten op het gebied van volksgezondheid overeenstemming zouden bereiken met de religieuze autoriteiten, zou prenatale diagnostiek op den duur een mogelijkheid kunnen worden in Oman, zoals in andere moslim landen al het geval is.

Tot slot wil ik de hoop uitspreken dat de resultaten van dit proefschrift zullen bijdragen tot een betere zorg, een groeiend inzicht in de vraag hoe om te gaan met deze ernstige erfelijke ziekten en het voorkomen van ernstige vormen van HbP middels preventie in Oman.

