

Sickle cell anaemia : comparative clinical and molecular studies of Nigerian and Kuwaiti patients

Citation for published version (APA):

Adekile, A. D. (1996). *Sickle cell anaemia : comparative clinical and molecular studies of Nigerian and Kuwaiti patients*. Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 6

SUMMARY

CHAPTER 6

SUMMARY

The main objective of this dissertation is to compare the clinical features and patterns of morbidity of Nigerian and Kuwaiti SS patients and to identify possible factors that influence the observed patterns. Apart from identifying the common causes of hospitalisation, and defining clinical features of steady state patients, the spleen was used as an index organ to study the pathophysiology of the disease. The major differentiating molecular factors examined were β^S haplotypes and frequency of co-existent α -thal trait.

A review of the relevant literature is presented in **Chapter 1b**. It gives a brief history of SS disease, laboratory diagnosis, pathophysiology, clinical features and management. The factors which influence its clinical severity were discussed in detail. These include co-existent α -thal, Hb F levels, RBC enzyme deficiencies (e.g. G6PD) and environmental factors. The factors influencing Hb F levels in SS disease were also discussed in detail and they include age, gender, α -thal, mutations in the promoter regions of the G_γ - and A_γ -globin genes, mutations in the β -globin gene LCR and the promoter region.

Chapter 2 gives details about the patients and the methodology used in the different studies reported.

Chapter 3 is a collection of clinical and molecular studies carried out on Nigerian patients.

Chapter 3a is adapted from two papers which describe our original observations on the spleen in Nigerian SS patients. The chapter identifies the frequency of splenomegaly in a group of 139 SS patients and focuses on the clinical and laboratory parameters in those with PGS, *i.e.* aged above 8 years, with a spleen of ≥ 10 cm below the costal margin and which had been palpable for at least 6 months. The findings were compared to those in a group of SS patients without palpable spleens matched for age, sex and social class. The former had lower levels of blood cellular elements and Hb (probably secondary to hypersplenism) and increased levels of serum bilirubin. They also had more frequent hepatomegaly which was associated with digital clubbing in some. Retrospective analysis of hospital admissions showed that gross splenomegaly is associated with frequent anaemic crisis. Moreover, the PGS group had significantly higher levels of serum IgM, and hepatic histopathology showed moderate-to-severe sinusoidal dilatation and portal lymphocytic infiltration while a few showed evidence of new fibrous tissue formation and basement membrane degeneration. There was also uniform response to prolonged proguanil therapy. All these findings suggest that PGS is similar to TSS, which is a malaria hypersensitivity state and that some have hepatic pre-cirrhotic pathological features.

Chapter 3b is a comparative study of the spleen among Nigerian and American SS patients. Since there had been anecdotal reports attributing splenomegaly in SS disease to the effects of malaria, the study was designed to compare patients in a malaria endemic region (Nigeria) to those in a malaria free zone (America). It was found that in steady state patients, the frequency of splenomegaly was 23% in the former and 8% in the latter. There was a linear relationship between the spleen size and serum immunoglobulins among Nigerians. In both groups there was evidence of hypersplenism in those with splenomegaly. Reticulo-endothelial function (from circulating pitted red cells) appeared to be intact and even enhanced in those with large spleens. Among the Nigerians in the study, there was an association between spleen size and the level of anti-malaria antibody levels. In both populations, co-existent α -thal did not appear to influence splenomegaly. The study provided further support for the influence of malaria on the pathogenesis of splenomegaly in Nigerian SS patients.

Chapter 3c. This paper describes the frequency of α -thal-2 trait which is the only type of α -thal seen in Nigeria, among a large group of SS patients ($n = 284$) and their AS and AA relatives ($n = 62$) drawn from the different tribes of Nigeria. The frequency was found to be about 25% in both SS and controls. However, there were significant differences in the frequencies among the tribes. It was highest among Ibos (33%) and lowest among Fulanis (0.04%). Among the SS group, α -thal trait was associated with increased survival and higher Hb levels. Patients with α -thal trait had lower levels of some anti-malaria antibody titres, suggesting less intense immune stimulation probably secondary to lower parasite rates.

Chapter 3d. This paper describes the pattern of β^S -globin gene cluster haplotypes in over 600 chromosomes from Nigerian SS patients and their relations. Haplotype #19 was the most prevalent, seen in 93% of chromosomes, while #17 was seen in 3.4%, and #20 in 1%, and 2.4% represented atypicals. There were no observed differences among the different tribes within the country. There was one family in whom several members carried a hybrid chromosome with haplotype #19 characteristics juxtaposed to haplotype #3 characteristics. The details of this hybrid are provided and are similar to chromosomes described from Turkey and Kuwait.

Chapter 4. These chapters contain studies carried out on Kuwaiti patients.

Chapter 4a describes the common clinical features and the causes of acute illness among Kuwaiti SS patients. It also documents the prevalent β^S haplotypes and α -thal patterns among them. Complications of the disease, *e.g.* acute chest syndrome, leg ulceration, severe fulminant infections, etc., are not common. Vaso-occlusive crisis is the most common cause of acute illness. Splenomegaly occurs in about 21.2%, hepatomegaly and gallstones in 15.2% each. The predominant haplotype is the Saudi Arabia/India haplotype #31, with a few cases of Benin and Bantu haplotypes. The frequency of α -thal trait in the SS and AS individuals is about 40%, with the $-\alpha(3.7 \text{ kb})$ deletion occurring in 27.5% and nondeletional α -thal in about 13%.

Chapter 4b. Spleen function was assessed in a group of 20 Kuwaiti patients using ^{99m}Tc -labeled tin colloid uptake. Seven (35%) had normal visualisation, while the spleen was partially demonstrable in 25%, and not seen at all in 40%. In the group

with normal uptake, the frequency of α -thal trait was 57.1%, while in the group with no function, it was 18.8%, thus demonstrating the positive association between co-existent α -thal and normal spleen function.

Chapter 4c. This paper describes the molecular characteristics of the major haemoglobinopathies in Kuwait and underscores the genetic heterogeneity of the population. Three mutant α -thal alleles were identified: $-\alpha(3.7 \text{ kb})$ deletion, the poly A signal (AATAAA \rightarrow AATAAG) mutation, and the $\alpha 2$ IVS-1 5' splice junction pentanucleotide (GAGGTGAGG \rightarrow GAGG) deletion. Twelve different β -thal alleles were characterised, the commonest being Mediterranean alleles. The two β^S haplotypes encountered were the Saudi Arabian (#31) and the Benin (#19).

Chapter 5. This chapter gives an overall discussion of all the studies reported and the conclusions reached. The possible modes of introduction of the observed mutants (β^S haplotypes #31, #19, and #20, and deletional and nondeletional α -thal) to Kuwait and Nigeria are discussed. The major conclusion is that the less severe clinical course among Kuwaitis is related to the β^S haplotype with consequent elevated Hb F and the higher frequency of co-existent α -thal trait.

In summary, the data presented in this dissertation show that sickle cell anaemia is a milder disease among Kuwaitis than Nigerians. However, the frequency of splenomegaly in steady state is similar in both groups but when enlarged, the spleen tends to be much larger in Nigerian patients. The predominant β^S haplotype among Nigerians is the Benin (#19), while among Kuwaitis it is the Saudi Arabia/India (#31). While the frequency of α -thal-2 (3.7 kb deletion) trait is similar in both groups (about 25%), nondeletional α -thal is found in an additional $\sim 13\%$ of Kuwaiti patients. In the latter, α -thal trait is associated with normal spleen function and absence of severe recurrent infections and gallstones. The same could not be documented for Nigerians. It therefore appears that the milder disease among Kuwaitis is a function of both the Saudi Arabia/India haplotype and the higher frequency of α -thal determinants.

SAMENVATTING

SAMENVATTING

De belangrijkste doelstelling van dit proefschrift was de vergelijking van de klinische verschijnselen en morbiditeitspatronen van patiënten die homozygoot zijn voor de sikkkelcelmutatie in Nigeria en Kuwait.

Vervolgens was het de bedoeling de factoren te identificeren die een invloed hebben op de waargenomen patronen. Naast de onderkenning van de belangrijkste oorzaken van hospitalisatie en de definitie van klinische verschijnselen van patiënten in een stabiele situatie, werd de milt gebruikt als een index orgaan voor de bestudering van de pathofysiologie van de ziekte. De belangrijkste onderscheidende moleculaire factoren die onderzocht werden, waren β^s haplotypen en de frequentie van tegelijk aanwezige heterozygotie voor alpha-thalassemie.

Een overzicht van de relevante literatuur is gepresenteerd in hoofdstuk 1b. Het geeft een korte historie van sikkkelcelanemie, laboratorium diagnostiek, pathofysiologie, klinische verschijnselen en management. De factoren die de klinische ernst beïnvloeden, worden in detail besproken. Deze betreffen onder meer tegelijk aanwezig alpha-thal, HbF niveaus, erythrocyt enzym deficiënties (b.v. G6PD) en omgevingsfactoren. De factoren die de HbF niveaus bij sikkkelcelanemie beïnvloeden, zijn leeftijd, alpha-thal, mutaties in de promotor regio's van de α gamma- en β gamma-globine genen, mutaties in het β -globine gen LCR en de promotor.

Hoofdstuk 2 gaat in op de patiënten en de methodologie die in de verschillende studies gebruikt is.

Hoofdstuk 3 is een verzameling van klinische en moleculaire onderzoeken uitgevoerd bij Nigeriaanse patiënten.

Hoofdstuk 3a betreft onderzoek met betrekking tot de milt bij Nigeriaanse sikkkelcelanemie patiënten. Naast de frequentie van splenomegalie bij 139 patiënten komen in dit hoofdstuk de klinische en laboratoriumparameters in de patiënten met PGS, d.w.z. boven de leeftijd van 8 jaar, met een milt van ≥ 10 cm onder de ribbenboog en die palpabel was voor meer dan 6 maanden. De bevindingen werden vergeleken met die in een groep van sikkkelcelanemie patiënten zonder palpabele milt van dezelfde leeftijd, geslacht en sociale status. De eerste groep had lagere aantallen bloedcellen en Hb en verhoogde serum bilirubine waarden. Ze hadden ook vaker hepatosplenomegalie die bij sommigen samenhang met onregelmatige verdikkingen van de vingergewrichten.

Retrospectief onderzoek toonde aan dat ernstige splenomegalie is geassocieerd met frequente anemische crises. Bovendien had de PGS groep significant hogere serum IgM waarden en de leverhistopathologie liet matig tot ernstige sinusoidale dilatatie en portale lymfocyttaire infiltratie zien, terwijl enkelen tekenen vertoonden van nieuwe bindweefselvorming en basaal membraan degeneratie. De respons op langdurige proguanil therapie was identiek. Alle bevindingen doen vermoeden dat PGS gelijk is aan TSS, hetgeen een malaria overgevoeligheid is en dat sommigen pre-cirrhotische leverafwijkingen hebben.

Hoofdstuk 3b is een vergelijkende studie van de milt bij sikkkelcelanemie patiënten uit Nigeria en Kuwait. Aangezien splenomegalie bij sikkkelcelanemie in enkele mededelingen aan de effecten van malaria is toegeschreven, werd het onderzoek zo opgezet dat een

vergelijking plaatsvond tussen patiënten in een malaria endemisch gebied (Nigeria) en een malaria vrij gebied (Amerika). Gevonden werd dat bij stabiele patiënten 23% van de eerste en 8% van de tweede groep splenomegalie vertoonde. Bij de Nigerianen werd een lineair verband gevonden tussen de grootte van de milt en de serum immunoglobuline waarden. In beide groepen werden aanwijzingen gevonden voor hypersplenie bij patiënten met splenomegalie. Reticulo-endotheliale functies bleken intact en zelfs versterkt bij patiënten met een grote milt. Bij de Nigerianen werd een verband vastgesteld tussen de grootte van de milt en de anti-malaria antilichaam titer. In beide populaties bleek tegelijk aanwezig alpha-thal niet van invloed te zijn op de splenomegalie. Het onderzoek maakte een invloed van malaria op het ontstaan van splenomegalie bij sikkelcelanemie patiënten aannemelijk.

Hoofdstuk 3c beschrijft de frequentie van alpha-thal-2, hetgeen het enige alpha-thalassemie type is dat gevonden wordt in Nigeria, bij 284 patiënten met sikkelcelanemie en hun heterozygote en homozygoot normale verwanten (n=62) afkomstig van verschillende Nigeriaanse stammen. Zowel bij de sikkelcelanemie patiënten als de controles was de frequentie ongeveer 25%. Er waren echter significante verschillen tussen de stammen. De Ibos vertoonden de hoogste frequentie (33%) en de Fulanis de laagste (4%). Bij sikkelcelanemie patiënten was alpha-thal-2 geassocieerd met een hogere levensverwachting en hogere Hb waarden. Patiënten met alpha-thal-2 hadden lagere waarden van enige anti-malaria antilichaam titers, hetgeen suggestief is voor een minder intense immuun stimulatie, mogelijk ten gevolge van lagere parasiet aantallen.

Hoofdstuk 3d. Hierin wordt de β^s -globine gencluster haplotypering van meer dan 600 chromosomen van Nigeriaanse sikkelcelanemie patiënten en hun verwanten beschreven. Haplotype 19 kwam het meeste voor, bij 93% van de chromosomen. Nr. 17 werd gevonden bij 3,4% en Nr. 20 bij 1%, terwijl bij de resterende 2,4% slechts atypische haplotypen voorkwamen. Er werden geen verschillen waargenomen tussen de verschillende stammen. In een familie werd bij meerdere familie-leden een hybride chromosoom gevonden dat gedeeltelijk bestond uit haplotype Nr. 19 naast Nr. 3 kenmerken. De details van deze hybride zijn beschreven en komen overeen met die beschreven zijn bij patiënten uit Turkije en Kuwait.

Hoofdstuk 4. Hierin worden de onderzoeken bij patiënten uit Kuwait beschreven.

Hoofdstuk 4a geeft de meest voorkomende klinische kenmerken en de oorzaken van acute problemen bij sikkelcelanemie patiënten. Het beschrijft ook de β^s haplotypen en alpha-thal patronen. Complicaties van de ziekte kwamen niet vaak voor. Vaso-occlusieve crisis is de meest voorkomende oorzaak van acute ziekte. Splenomegalie komt voor bij 21,2%, hepatomegalie en galstenen elk bij 15,2%. Het meest voorkomende haplotype is het Saudi Arabische/indische haplotype Nr. 31, met daarnaast enkele Benin en Banke haplotypen. De frequentie van alpha-thal bij homozygote en heterozygote sikkelcelanemie is ongeveer 40%. De -alpha(3,7kb) deletie wordt gevonden bij 27,5% terwijl ongeveer 13% geen deletie vertoont.

Hoofdstuk 4b. De miltfunctie werd onderzocht in een groep van 20 patiënten uit Kuwait met behulp van ^{99m}Tc -gelabeld tin colloïd opname. Zeven (35%) keer was de milt normaal aantoonbaar, in 25% partieel en in 40% in het geheel niet zichtbaar. In de groep met

normale opname was de frequentie van alpha-thal 57,1% terwijl in de groep zonder functie het percentage 18,8% was. Dit toont de positieve associatie tussen gelijktijdig voorkomend alpha-thal en een normale miltfunctie aan.

Hoofdstuk 4c. Hierin worden de moleculaire kenmerken van de belangrijkste hemoglobi-nopatieën in Kuwait beschreven en onderstreept de genetische heterogeniteit van de populatie. Drie mutante alpha-thal allelen werden geïdentificeerd: -alpha(3,7kb) deletie, de poly A signaal (AATAAA → AATAAG) mutatie en de alpha2IVS-I 5' splice junction pentanucleotide (GAGGTGAGG → GAGG) deletie. Twaalf verschillende β-thal allelen werden gekarakteriseerd, de meest voorkomende waren Mediterrane allelen. De twee β^s haplotypen die gevonden werden, waren het Saudi Arabische (Nr. 31) en het Benin haplotype (Nr. 19).

Hoofdstuk 5. Dit hoofdstuk bestaat uit een algemene discussie van alle gerapporteerde onderzoeken en de bereikte conclusies. De mogelijke manieren waarop de waargenomen mutanten (β^s haplotypen Nr. 31, Nr. 19 en Nr. 20, en de deletie en nondeletie alpha-thal) in Kuwait en Nigeria zijn geïntroduceerd werden besproken. De belangrijkste conclusie is dat het mildere verloop van de ziekte in Kuwait is gerelateerd aan het β^s haplotype met een daaraan gekoppelde verhoging van het HbF en de hogere frequentie van het tegelijk voorkomende alpha-thal.

De gegevens die gepresenteerd worden in dit proefschrift laten zien dat sikkelcelanemie in Kuwait een mildere ziekte is dan in Nigeria. De frequentie van splenomegalie in stabiele fase van de ziekte is gelijk in beide groepen maar wanneer vergroting optreedt dan is deze veel sterker in Nigeriaanse patiënten. Het dominante β^s haplotype in Nigeria is het Benin haplotype (Nr. 19), terwijl in Kuwait dat het Saudi Arabisch/Indische (Nr. 31) is. Terwijl de frequentie van de alpha-thal-2(3,7 kb deletie) gelijk is bij beide groepen (ongeveer 25%) wordt bij de patiënten uit Kuwait bovendien in ongeveer 13% nondeletie alpha-thal gevonden. Bij de laatste groep is alpha-thal geassocieerd met normale miltfunctie en afwezigheid van ernstige herhaalde infecties en galstenen. Hetzelfde kon niet worden gevonden bij de Nigerianen. het lijkt er dan ook op dat het mildere verloop van de ziekte in Kuwait een gevolg is van het Saudi Arabische/Indische haplotype en de hogere frequentie van alpha-thal determinanten.

