

НЕОНАТАЛНА АЛОИМУННА ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ - ПАТОГЕНЕЗА И ЛАБОРАТОРИЯ

Стоянка Танчева¹, Христина Атанасова², Радка Недялкова², Даниела Малчева³

¹Катедра по обща медицина и клинична лаборатория, Факултет „Медицина“, Медицински университет – Варна

²Студент, УС „Клиничен лаборант“, Медицински колеж, Медицински университет – Варна

³СМДЛ „Статус“ – Варна

NEONATAL ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA (NAIT) - PATHOGENESIS AND LABORATORY

Stoyanka Tancheva¹, Hristina Atanasova², Radka Nedyalkova², Daniela Malcheva³

¹General Medicine and Clinical Laboratory, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Student, TRS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

³SMDL STATUS - Varna

РЕЗЮМЕ

Нашият интерес бе провокиран от тежката изолирана тромбозитопения ($48 \times 10^9/L$) при бебе, родено чрез цезарово сечение, новородено – първо раждане след два поредни спонтанни аборта след третия месец на бременността на майката.

Материал и методи: Като материал използвахме капилярна кръв, взета с антикоагулант ЕДТА, изследвана на автоматичен хематологичен брояч „Mindray“-BC-3000Plus и кръвна натриева оксидна цитратна, оцветена по Романовски-Гимза. Rh групата на майката, установена по данни на досието от бременността, беше положителна.

Резултати и обсъждане: Лабораторните резултати, показващи тромбозитопения, абортите, установени чрез миналата анамнеза, както и липсата на видими генетични аномалии по бебето доведоха до подозрение за фетална/неонатална алоимунна тромбозитопения (F/NAIT).

Изводи: Въпреки че много от случаите са леки, NAIT е една от най-честите причини за тежка тромбозитопения и интракраниална хеморагия при плода и новороденото. Диагнозата NAIT трябва да се има предвид в диференциално-диагностичен план винаги, когато добре проявяващото се на бял свят новородено е с тежка тромбозитопения.

Ключови думи: NAIT, тромбозитопения, интракраниална хеморагия

ABSTRACT

Introduction: Our interest was provoked by severe isolated thrombocytopenia ($48 \times 10^9/L$) in a baby born by Caesarean section. It was a newborn - firstborn after two consecutive spontaneous abortions after the third month of pregnancy.

Materials and Methods: As a material, we used capillary blood taken with an EDTA anticoagulant, tested on an automatic hematology counter Mindray-BC-3000Plus and a blood smear stained by Romanowsky-Giemsa. The mother's Rh group, as determined by the pregnancy record, was positive.

Results and Discussion: Laboratory results showing thrombocytopenia, abortions identified from a past history, and the absence of visible genetic abnormalities in the baby have led to a suspicion of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (F/NAIT).

Conclusion: Although many cases are mild, NAIT is one of the most common causes of severe thrombocytopenia and intracranial hemorrhage in the fetus and the newborn. The diagnosis of NAIT should be considered in the differential diagnosis plan whenever the newborn is with severe thrombocytopenia.

Keywords: NAIT, thrombocytopenia, intracranial hemorrhage

УВОД

Феталната/неонаталната алоимунна тромбоцитопения (F/NAIT) е една от най-честите причини за ранна поява на тежка изолирана тромбоцитопения ($<50 \times 10^9/L$) при новородени и се среща при приблизително един на 1000 раждания. Неонаталната алоимунна тромбоцитопения (NAIT) се причинява от майчините имуноглобулинови G (IgG) антитела, образувани срещу несъвместими човешки тромбоцитни алоантигени (HРА), пренасяни върху тромбоцитите на плода. Интересът ни към този синдром бе провокиран от тежката изолирана тромбоцитопения ($48 \times 10^9/L$) при бебе, родено чрез цезарово сечение, новородено – първо раждане след два поредни спонтанни аборта след третия месец на бременността на майката. Въпреки че много от случаите са леки, NAIT е една от най-честите причини за тежка тромбоцитопения и интракраниална хеморагия. Нашите цел и задачи бяха да изработим лабораторна констелация, която бързо и надеждно да насочва неонатолога към диагностиката на този не съвсем рядък и понякога много опасен синдром, както и да дадем препоръки за реализиране на неговия скрининг и профилактика в България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Като материал използвахме капилярна кръв, взета с антикоагулант ЕДТА, изследвана на автоматичен хематологичен брояч Mindray-BC-3000Plus и кръвна натривка, оцветена по Романовски-Гимза. Rh групата на майката, установена по данни от досието от бременността, беше положителна.

РЕЗУЛТАТИ

Лабораторните резултати, показващи тромбоцитопения, абортите, установени чрез миналата анамнеза, както и липсата на видими генетични аномалии по бебето доведоха до подозрение за фетална/неонатална алоимунна тромбоцитопения (F/NAIT).

ОБСЪЖДАНЕ

При неонаталната алоимунна тромбоцитопения (NAIT) феталните тромбоцити се сенсibilизират от анти-НРА IgG и се унищожават от монокитно-фагоцитната система (1).

Мембраната на тромбоцитите е покрита с антигени, които могат да индуцират имунен отговор. Имуният отговор срещу тромбоцитните

повърхностни антигени води до образуване на антитромбоцитни антитела, което е в основата на повечето имунни тромбоцитопении (2).

Човешките тромбоцитни алоантигени (НРА) са силно полиморфни. Досега са открити повече от 35 различни тромбоцитни антигена, индексирани в базата данни за имунополиморфизъм. Човешките тромбоцитни антигени (НРА-s) са полиморфизми в гликопротеините на тромбоцитните мембрани. Те могат да стимулират производството на алоантитела, които се образуват след като са били в контакт с тромбоцитни антигени на чужди тромбоцити (PLT) (3). Антителата срещу тези антигени са означени като анти-НРА.

Най-важните рецептори, локализирани върху тромбоцитната мембрана са:

1. Интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (α -интегрин), известен като фибриногенен рецептор – той е отговорен за връзката с фибриногена (4).
2. Комплексът GPIb-IX-V, който функционира като рецептор за фактора на von Willebrand, свързва тромбоцита с vWF и с тромбина (5) и
3. Интегрин $\alpha 2\beta 1$ (β -интегрин), който функционира като колагенов рецептор (6).

Единадесет от човешките тромбоцитни антигени (НРАs), са разположени върху най-разпространения рецептор на повърхността на тромбоцитите: интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (7).

Антитромбоцитните антитела са предимно IgG. Имуноглобулин G има сравнително малка молекулна маса (IgG 150 kD). Мономерната му структура дава възможност да преминава плацентарната бариера и така реализира своята антигенозависима клетъчна цитотоксичност по отношение на тромбоцитите на плода.

Тромбоцитите на фетуса наследяват тромбоцитни антигени както от бащата, така и от майката. В повечето случаи тези антигенни структури са идентични. Ако обаче детето наследи тромбоцитен антиген от бащата, който майката не притежава, майчината имунна система разпознава този антиген като „чужд“ и развива антитела срещу него. Това е алоимунно нарушение, понеже майката отговаря с имунен отговор към генетичните компоненти от страна на бащата. Тези алоантитела се прехвърлят от майката към плода през плацентата, понеже тяхната молекулна маса (Ig G) им позволява това. В плода те се прикрепват към мембраната на неговите тромбоцити, маркирайки ги за унищожаване (8).

Неонаталната алоимунна тромбоцитопения (NAIT) е резултат от разрушаването на тромбоцитите на плода от майчините алоантитела, които преминават през плацентата и се свърз-

ват с феталните тромбоцитни антигени, наследени от бащата. Това се случва още при първата бременност, но степента на имунизация, а от тук и честотата на развитие на NAIT при една и съща двойка родители, корелира линейно с броя на бременностите (9).

Типът антиген HPA варира в зависимост от етническата принадлежност, което директно причинява разлики в честотата и антиген-специфичността на анти-HPA антителата и заболяемостта от NAIT (10).

При бялата раса най-често участващият антиген при тежък F/NAIT е човешки тромбоцитен (PLT) антиген **HPA-1a**, отчасти защото антитялото срещу този антиген уврежда и ангиогенезата. Антигенната система на HPA-1a се определя като аминокиселинна промяна на левцин-до-пролин при остатък 33 от зрелия гликопротеин α IIb β 3 (а интегрин). При кавказките популации по-голямата част (>75%) от случаите на NAIT се дължат на fetomaternal несъвместимост на HPA-1a (11).

Присъствието на HPA антитела е тясно свързано с човешки левкоцитен антиген (HLA). Представянето на HPA-1a пептиди и последващо производство на анти-HPA-1a алоантитела се свързва с конкретен човешки HLA генотип, HLA-DRB3*01:01. В 90% от случаите на HPA-1a fetomaternal алоимунизация, майката носи тази HLA молекула. Напоследък се установява, че HLA-DRB4*01:01 също играе роля в представянето на HPA-1a пептид. Комбинацията от двата HLA генотипа: DRB3*01:01 и DRB4*01:01 антигени е свързана с по-тежки случаи на F/NAIT и влияе на отговора на антенаталното лечение (12).

Понастоящем HPA антителата не се изследват рутинно, а NAIT винаги се диагностицира след раждането на първото дете (13). При това заболяване още няма разработени програми за антенатален скрининг (14). За съжаление, неонатална алоимунна тромбоцитопения се диагностицира, когато е засегнат плодът или новороденото. В много проучвания се съобщава, че титърът на анти-HPA антитялото е добър индикатор за тежестта на NAIT. Нивата на анти-HPA антитялото имат значими корелации с риска (15) и тежестта на неонаталната тромбоцитопения (16).

Най-сериозният изход от тежката NAIT е интракраниален кръвоизлив (ICH), водещ до неврологични последствия при 20% от съобщените случаи или смърт при 10% (17). Случаите на ICH се появяват in utero. Ако има съмнение за NAIT, е много важно да се потвърди диагнозата, тъй като бъдещите бременности могат да бъдат по-тежко

засегнати, с по-тежка тромбоцитопения и вътрешноинтракраниален хематом.

При липса на скрининг на базата на популацията подозрение за фетална/неонатална алоимунна тромбоцитопения (F/NAIT) се появява в случай на проблеми с кръвенето. Понякога тези кръвоизливи се откриват или се подозират по време на феталния живот, в случай на ултразвукови аномалии, особено в мозъка на плода (18). По-често подозренията за F/NAIT се появяват след раждането и са резултат от проблеми с кръвене при новороденото или от случайно откриване на тежка тромбоцитопения в началото на живота. Освен това FNAIT се диагностицира спорадично в случай на анамнестични данни за предходни раждания на деца с кръвоизливи. Бременност след първото засегнато дете, претърпяло интракраниален хематом ICH, трябва да се разглежда като бременност с висок риск.

Диагнозата неонатална алоимунна тромбоцитопения (NAIT) трябва да се има предвид в диференциално-диагностичен план винаги, когато добре появяващото се на бял свят новородено е с тежка тромбоцитопения (19). Бързото прилагане на съвместима тромбоцитна трансфузия с продукт, съдържащ антиген-отрицателни тромбоцити, е средство на избор при лечението на тежката тромбоцитопения или активното кръвене.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лабораторните изследвания, при диагностицирането на този синдром включват:

1. Тежка изолирана тромбоцитопения ($<50 \times 10^9/L$) при новороденото.
2. Генотипиране на HPA на майката, бащата и детето, за да се установят възможни несъвместимости на HPA.
3. По-нататък потвърждаването на NAIT изисква изследване на кръвта на родителите с имунологични тестове на тромбоцитите. Откриването на специфични антитромбоцитни антитела може да се извърши, като се използва тест за непряка имунофлуоресценция на тромбоцитите или тест за тромбоцитен антиген (20).
4. Майката ще има нормален брой на тромбоцитите, тъй като антителата не атакуват нейните тромбоцити.
5. Кръвта се изпраща в специална лаборатория, за да се прецени дали майката и бащата имат несъответстващи тромбоцитни антигени и дали тя произвежда антитела срещу тромбоцитен антиген, открити при бащата.
6. Типирането на HLA.

Съвременни високоспециализирани маркери, които ни позволяват да предвидим тежестта на F/NAIT по време на бременност:

1. Фукозилиране и галактозилиране на анти-НРА алоантителата – гликозилиращият модел на Fc-частта на анти-НРА алоантителата (фукозилиране и галактозилиране) корелира с неонаталния брой на тромбоцитите, както и с тежестта на заболяването (21). Моделът на гликозилиране на антитромбоцитен IgG е стабилен по време на бременност и прогнозира клиничен изход при алоимунна тромбоцитопения.
2. Нивата на CRP в кръвта от пъпна връв са свързани също така с тежестта на заболяването (22). C-реактивният протеин повишава IgG-медираните фагоцитни реакции и тромбоцитопенията.
3. Типизиране HLA-DRB3*01:01 алел, който е свързан с по-висок риск от алоимунизация в случай на НРА-1а несъвместима бременност, е обстойно оценен по тази причина и е доказано, че този и някои други HLA алели имат допълнителна стойност като предиктор на тежестта на заболяването (23). HLA-DRB3*01:01 е предиктор за имунизация срещу човешки тромбоцитен антиген-1а, но не корелира с тежестта на феталната и неонаталната алоимунна тромбоцитопения.

F/NAIT е тромбоцитният аналог на хемолитичната болест на плода и новороденото (Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn – HDFN). Преди петдесет години HDFN представляваше значителен фетален и неонатален здравен проблем, докато днес болестта почти е ликвидирана след въвеждането на обща RhD типизация на бременните жени и рутинно прилагане на RhD профилактика на RhD-отрицателни жени след раждането на RhD-позитивно дете. Няколко страни (Норвегия, Дания, Великобритания и Холандия) вече са подкрепили прилагането на програми за скрининг за F/NAIT (24). Досега обаче нито една страна не прилага програма за скрининг за FNAIT.

СКРИНИНГ И ПРЕПОРЪКИ

Понастоящем няма прост, сигурен, прецизен и валидиран скрининг тест за FMAIT, но доколкото НРА-1а е преобладаващата причина за F/NAIT и за тежестта на кръвоизлива, то НРА-1а скринингът ще доведе до най-оптималната превенция на тежки усложнения при кървене (25).

Липсата на международен консенсус по отношение на оптималното пренатално диспансеризиране и наблюдение на жени, имунизирани с НРА-1а, идентифицирани в скринингова програма, не дава икономическата сигурност на фармацевтичните фирми да започнат разработването на лекарствен продукт, който да предотврати НРА-1а-имунизация по същия начин, както анти-D може да предотврати RhD имунизацията.

ЛИТЕРАТУРА

1. Curtis BR. Recent progress in understanding the pathogenesis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2015;171(5):671–68
2. Basire A, Picard C. Platelet allo-antibodies identification strategies for preventing and managing platelet refractoriness. *Transfus Clin Biol.* 2014;21(4-5):193–206).
3. Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, Curtis B, McFarland J, Bougie D, Aster R. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2010;50:324–33
4. Wang Y, Andrews M, Yang Y, et al. Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms[J] *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2012;12:126–132.
5. Rossi KQ, Lehman KJ, O'Shaughnessy RW. Effects of antepartum therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia on maternal lifestyle. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:1783–1788.
6. Bussel JB, Primiani A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. *Blood Rev.* 2008;22:33–52
7. Rossi KQ, Lehman KJ, O'Shaughnessy RW. Effects of antepartum therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia on maternal lifestyle. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:1783–1788.).
8. Delbos F, Bertrand G, Croisille L, Ansart-Pirenne H, Bierling P, Kaplan C. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: predictive factors of intracranial hemorrhage. *Transfusion.* 2016;56(1):59–66
9. Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S, Collaborative Study G. The

- natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med.* 2004;14(6):399–408
10. Kamphuis MM, Tiller H, van den Akker ES, Westgren M, Tiblad E, Oepkes D. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Management and Outcome of a Large International Retrospective Cohort. *Fetal Diagn Ther.* 2017;41(4):251–7
 11. Ohto H, Yamaguchi T, Takeuchi C, Tohyama Y, Sato A, Morita S. Anti-HPA-5b-induced neonatal alloimmune thrombocytopenia: antibody titre as a predictor. Collaborative study group. *Br J Haematol.* 2000;110(1):223–227
 12. Bertrand G, Martageix C, Jallu V, Vitry F, Kaplan C. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* 2006;4(3):628–637
 13. Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue.* 2015;13(3):380–390
 14. Kamphuis M, Paridaans N, Winkelhorst D, et al. Lower-dose intravenous immunoglobulins for the treatment of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a cohort study. *Transfusion.* 2016;56:2308–2313
 15. Sonneveld ME, Natunen S, Sainio S, et al. Glycosylation pattern of anti-platelet IgG is stable during pregnancy and predicts clinical outcome in alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2016;174:310–320
 16. Kapur R, Heitink-Polle KM, Porcelijn L, et al. C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia. *Blood.* 2015;125:1793–1802.
 17. Wienzek-Lischka S, Konig IR, Papenkort EM, et al. HLA-DRB3*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2017;57:533–540
 18. Vinograd CA, Bussel JB. Antenatal treatment of fetal alloimmune thrombocytopenia: a current perspective. *Haematologica.* 2010;95:1807–1811.
 19. Roberts I, Stanworth S, Murray NA. Thrombocytopenia in the neonate. *Blood Rev.* 2008;22:173–186
 20. Scheffer, PG, Ait Soussan, A, Verhagen, OJ, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a. *BJOG* 2011; 118: 1392- 5.
 21. Madsen, C, Prahm, KP, Nilsson, C, et al. [Establishing a screening programme in Denmark for foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia]. *Ugeskr Laeger* 2018; 180.
 22. Kjeldsen-Kragh, J. Screening for fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: is it possible and what are the potential outcomes? *ISBT Sci Ser* 2018; 13: 187- 93.
 23. Petermann R, Bakchoul T, Curtis BR, Mullier F, Miyata S, Arnold DM, Subcommittee on Platelet Immunology. Investigations for fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: communication from the SSC of the ISTH, *J Thromb Haemost.* 2018; 16(12): 2526-2529

Адрес за кореспонденция:

ас. д-р Стоянка Танчева Илиева, д.м.
 Катедра „Обща медицина и клинична
 лаборатория“
 Медицински университет – Варна
 ул. „Марин Дринов“ 55
 Варна, 9000
 e-mail: tanq_tancheva@abv.bg