

Nieimmunologiczny obrzęk płodu w wyniku talasemii alfa. Opis przypadku zdiagnozowanego i leczonego prenatalnie w Polsce

Article history:
Received: 01.03.2019
Accepted: 12.07.2019

Non-immune hydrops fetalis as a result of thalassemia alfa. Description of the case diagnosed and prenatally treated in Poland

Streszczenie

Talasemia alfa to niedokrwistość wynikająca z mutacji w genach kodujących alfa-globinę lub w elementach regulatorowych klastra alfa-globiny. Zespół hemoglobiny Barta to najcięższa postać tej niedokrwistości, spowodowana defektem genetycznym prowadzącym do całkowitego braku syntezy alfa-globiny, najczęściej wynikającym z delecji obu kopii genów z każdego allelu. U chorych nie są syntetyzowane dwie dominujące hemoglobiny niezbędne dla prawidłowej ontogenezy – HbF w okresie płodowym oraz postnatalnie HbA. Hemoglobina dominującą jest hemoglobina Barta, składająca się wyłącznie z łańcuchów gamma-globiny. Choroba ujawnia się w okresie prenatalnym w postaci niedokrwistości oraz obrzęku płodu. Przypadek tej postaci talasemii alfa został zdiagnozowany i był skutecznie leczony prenatalnie w jednym z ośrodków w Polsce. W pracy przedstawiono jego opis kliniczny oraz zaprezentowano wyniki badań biochemicznych i molekularnych.

Abstract

Alpha thalassemia disorders are a group of anemias caused by mutations in alpha-globin encoding genes or in the regulatory elements of the alpha-globin cluster. Hemoglobin Bart's Hydrops Fetalis Syndrome (Hb Bart's) is the most severe form of alpha thalassemia which is caused by a genetic defect leading to a complete lack of alpha-globin synthesis. Most often it results from deletion of both gene copies from each allele. The two dominant hemoglobins necessary for normal ontogenesis are not synthesized – HbF during the fetal and HbA during the postnatal period. The disease manifests in the prenatal period in form of anemia and hydrops fetalis. Such form of alpha thalassemia has been diagnosed and successfully treated prenatally in one of the centers in Poland. The paper presents the clinical description of the case and the results of biochemical and molecular tests.

Joanna Skulimowska^{1*},
Paweł Turowski¹,
Edyta Klimczak-Jajor¹,
Marzena Dębska²,
Katarzyna Guz¹,
Ewa Brojer¹

¹Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

²II Klinika Ginekologii i Położnictwa Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

© 2019 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine. Published by Sciendo. All rights reserved.

Słowa kluczowe:

talasemia, zespół hemoglobiny Barta, transfuzja dopłodowa

Keywords:

thalassemia, Hb Bart's hydrops fetalis, intrauterine transfusion

Wstęp

Hemoglobina jest białkiem, którego funkcją jest transport tlenu z płuc do narządów i tkanek oraz uczestniczenie w procesie usuwania dwutlenku węgla z tkanek do płuc. Jest sferycznym tetramerem zbudowanym z 2 identycznych łańcuchów alfa-globiny i z 2 łańcuchów beta-globiny, połączonych z 4 podjednostkami hemu. Wrodzone zaburzenia ilościowe syntezy alfa- lub beta-globin prowadzą do talasemii alfa lub beta, jednej z najczęstszych dziedzicznych chorób monogenowych.

Rozpowszechnienie talasemii alfa jest szczególnie wysokie w krajach obszaru Morza Śródziemnego, na Bliskim Wschodzie, w południowo-wschodniej Azji oraz w Indiach. Wraz z migracją ludności występowanie talasemii alfa zwiększyło swój zasięg do innych obszarów świata, w tym także Polski [1, 2].

W przypadku stwierdzenia różnego stopnia mikrocytozy oraz hipochromii, przy prawidłowej gospodarce żelaza u pacjenta podejrzewa się talasemię. Badania biochemiczne, takie jak rozdział frakcji

hemoglobin metodą jonowymiennej wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej (*ion-exchange high-performance liquid chromatography* – HPLC) lub elektroforeza kapilarna (*capillary electrophoresis* – CE), określają stężenie hemoglobin HbA₂ oraz HbF i są pomocne w diagnostyce talasemii beta i niektórych hemoglobinopatii.

U nosicieli talasemii alfa stężenie HbA₂ zazwyczaj mieści się w granicach wartości referencyjnych. Talasemia alfa charakteryzuje się różnym stopniem niedokrwistości oraz powiązanych z nią objawów klinicznych. Identyfikacja ciężkich postaci talasemii alfa wiąże się z występowaniem hemoglobin H i Barta (HbH i Hb Bart's), których obecność można wykryć poprzez HPLC lub CE bądź elektroforezę jakościową na żelach agarozowych. Pełna diagnostyka talasemii alfa, w tym ustalenie nosicielstwa tej choroby, możliwa jest jednak jedynie przy zastosowaniu badań genetycznych.

Klaster genów alfa-globiny znajduje się na chromosomie 16p13.3 i zawiera geny: 5'-HBZ (zeta-ζ) – HBZP1 (pseudozeta) – HBM (mu) – HBAP1 (pseudoalfa1) – HBA2 (alfa-α) – HBA1 (alfa-α) – HBQ (theta)-3',

* Corresponding author: Joanna Skulimowska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel. 22 34 96 637 (679), fax 22 34 96 611, e-mail: jskulimowska@ihit.waw.pl, eklimczak@ihit.waw.pl

które ulegają następującej po sobie ekspresji w trakcie kolejnych faz rozwoju organizmu. Klaster genów beta-globiny znajduje się na chromosomie 11p15.4 i zawiera geny: 5'-*HBE1* (epsilon-ε) – *HBG* (gamma G – γG) – *HBA* (gamma A – γA) – *HBD* (delta-δ) – *HBB* (beta-β)-3'. Globiny zeta i epsilon są aktywowane tylko w określonym okresie rozwojowym. Do 8-10. tygodnia ciąży syntezie podlegają hemoglobiny Gower I (ζζεε), Gower II (ααεε) oraz Portland (ζζγγ), będące skutkiem ekspresji genów *HBZ*, *HBE1* i *HBA*. Po tym okresie zachodzi zahamowanie ekspresji genów *HBZ* oraz *HBE1*, przy zwiększającej się u zdrowego płodu ekspresji genów *HBA2* i *HBA1* oraz *HBG*, powodującej wzrost syntezy hemoglobiny płodowej F (HbF), a nieco później włączenie syntezy hemoglobiny A (HbA) [3]. Talasemia alfa jest spowodowana głównie przez delecje w obrębie klastra alfa-globiny obejmujące jeden z genów *HBA2* lub *HBA1* (talasemia alfa plus) lub oba geny (talasemia alfa zero). Najcięższą postacią talasemii alfa jest zespół hemoglobiny Barta (*hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome* – BHFS) występujący u homozygot z delecją lub inaktywacją obu genów alfa-globiny, u których nie zachodzi synteza funkcjonalnych łańcuchów alfa-globiny, zatem nie powstaje ani HbF, ani HbA. Syntetyzowana jest hemoglobina Barta, będąca tetramerem gamma-globiny. Po urodzeniu znacznie obniża się synteza gamma-globiny, a wzrasta beta-globiny, zatem hemoglobinę Barta zastępuje hemoglobina HbH, będąca tetramerem beta-globiny. Obie hemoglobiny mają bardzo wysokie powinowactwo do tlenu, będąc tym samym nieefektywnym jego dostarczycielem do tkanek. Hemoglobiny Barta i H są niestabilnymi globinami, tworzącymi precypitaty w erytrocytach, które przyjmują dysmorficzne kształty i są przedwcześnie niszczone.

Zależnie od rejonu świata, najpowszechniej występującymi mutacjami prowadzącymi do talasemii alfa, wynikającymi z delecji obu kopii genów alfa-globiny, są mutacje: --^{SEA} (Southeast Asian), --^{FIL} (Philippino), --^{THAI} (Thai), które występują w południowo-wschodniej Azji, --^{MED} (Mediterranean) czy też -(α)^{20.5} charakterystyczne dla Grecji, Turcji i Cypru [4, 5]. Najczęstsza w południowo-wschodniej Azji mutacja sprawcza --^{SEA} spowodowana jest delecją obejmującą obszar około 20,5 kb w klastrze alfa-globiny, zawierający geny *HBA1* i *HBA2* alfa-globiny oraz pseudogeny *HBQ1*, *HBAP1* i *HBM* [6].

Zespół hemoglobiny Barta klinicznie objawia się już w życiu płodowym niedokrwistością, obrzękiem uogólnionym płodu (*hydrops fetalis* – HF), hiperdynamicznym krążeniem oraz występowaniem hemoglobiny Barta jako głównej hemoglobiny [7, 8]. Mechanizmem kompensacyjnym anemizacji jest tworzenie się pozaszpikowych ognisk krwiotworzenia, prowadzących do uszkodzenia innych narządów, głównie wątroby i hypoalbuminemii [9]. Ciężka wewnątrzmaciczna hipoksja może doprowadzić do zgonu wewnątrzmacicznego lub w okresie okołoporodowym. U ciężarnych, u których występuje obrzęk płodu, obserwuje się zwiększoną częstość różnych powikłań, najcięższym z nich jest zespół Ballantyne'a (inaczej nazywany *mirror syndrome* – zespół lustrzany), charakteryzujący się występowaniem u matki uogólnionych obrzęków, niedokrwistości, nadciśnienia tętniczego oraz zaburzeń czynności wątroby [10]. Wraz z postępem prenatalnej diagnostyki ultrasonograficznej oraz badań genetycznych, również nieinwazyjnych, przy jednoczesnej dostępności terapii wewnątrzmacicznej płodu, w literaturze opisuje się coraz więcej przypadków przeżycia płodów obarczonych tą chorobą [11]. Leczenie prenatalne anemii w przebiegu talasemii

polega na wykonywaniu seryjnych transfuzji dopłodowych masy erythrocytarnej [12]. Po porodzie dziecko wymaga regularnych przetoczeń krwi, terapii chelatującej i innych działań leczniczych [13]. Jediną skuteczną i trwałą metodą leczenia jest przeszczepienie komórek macierzystych [14].

W obecnej pracy przedstawiono wyniki badań diagnostycznych prowadzących do rozpoznania w Polsce pierwszego przypadku obrzęku płodu wynikającego z zespołu hemoglobiny Barta, który był leczony skutecznie transfuzjami dopłodowymi.

Opis przypadku

Pacjentka lat 39, pochodzenia azjatyckiego, będąca w 24. tygodniu ciąży zgłosiła się ze skierowaniem na badanie echa serca płodu z powodu kardiomegalii, wykrytej podczas przesiewowego badania USG. Badanie wykazało znaczne powiększenie sylwetki serca płodu w stosunku do klatki piersiowej – wskaźnik sercowo-płucny HA/CA (*heart area / chest area*) wynosił 0,57. Ponadto wykryto holosystoliczną niedomykalność zastawki trójdzielnej, miernego stopnia wodobrzusze, hepatomegalię oraz nieprawidłowości w przepływach naczyniowych. Maksymalna prędkość skurczowa w tętnicy środkowej mózgu płodu MCA-PSV (*middle cerebral artery – peak systolic velocity*) była przyspieszona do 70 cm/s, co odpowiadało 2,08 MoM (*multiple of the median*). MoM – wskaźnik wielokrotności mediany dla danego wieku ciążowego, określający stopień niedokrwistości u płodu, oraz inne wykryte nieprawidłowości wskazywały na ciężką niedokrwistość oraz konieczność niezwłocznej terapii wewnątrzmacicznej. W ośrodku terapii płodu wykonano kordocentezę, podczas której potwierdzono niedokrwistość (Hb – 6,3 g/dl, RBC – $2,6 \times 10^6/\mu\text{l}$, Hct – 27%, MCV – 101 fl, MCH – 24 pg, PLT – $114 \times 10^3/\mu\text{l}$, WBC – $82 \times 10^3/\mu\text{l}$). Równocześnie przetoczono dopłodowo 60 ml masy erythrocytarnej oraz wprowadzono wspomagającą terapię farmakologiczną objawów niewydolności krążenia za pomocą digoksyny.

W dalszych badaniach wykluczono niedokrwistość spowodowaną przyczynami immunologicznymi czy przeciekiem płodowo-matczynym (*fetomaternal hemorrhage* – FMH). Wykluczona została także niedokrwistość płodu w wyniku toksoplazmozy lub infekcji spowodowanych parwowirusem B19, wirusem cytomegalii lub różyczki. W dalszym przebiegu ciąży monitorowano stan płodu w cotygodniowych badaniach ultrasonograficznych. W 31. tygodniu ciąży ponownie otrzymano podwyższony wynik MCA-PSV do 1,6 MoM. Wykonano drugą kordocentezę, podczas której oznaczono podstawowe parametry morfologiczne, wskazujące na niedokrwistość: Hb – 9,2 g/dl, RBC – $4,1 \times 10^6/\mu\text{l}$, Hct – 34%, PLT – $156 \times 10^3/\mu\text{l}$, WBC – $47 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Planowano także drugie przetoczenie masy erythrocytarnej, jednak nie doszło do transfuzji. Z powodu nieprawidłowości w odczycie kardiokrtograficznym (KTG), wskazującym na zagrażającą zamartwicę płodu, podjęto decyzję o zakończeniu ciąży cesarskim cięciem. Pacjentka urodziła córkę o wadze 1590 g, 45 cm długości, w stanie ocenionym na 4-8-9 punktów w skali Apgar.

Nawracający charakter niedokrwistości u płodu oraz pochodzenie wietnamskie rodziców sugerowały wrodzony defekt syntezy hemoglobiny. Podczas drugiej kordocentezy pobrano próbkę krwi pępowinowej do badań biochemicznych i genetycznych

w kierunku talasemii alfa, pobrano również materiał od rodziców. U matki stwierdzono niewielką mikrocytozę oraz obniżone stężenie hemoglobiny i MCH: RBC $5,2 \times 10^9/\mu\text{l}$; Hb 10,9 g/dl; MCV 76,1 fl; MCH 21 pg. Morfologia krwi obwodowej ojca dziecka (RBC $6,3 \times 10^9/\mu\text{l}$; Hb 12,7 g/dl; MCV 71,2 fl; MCH 20 pg) wskazywała na mikrocytozę oraz hipochromię. Próbki krwi od matki i ojca oraz krwi pępowinowej także poddano badaniom biochemicznym i molekularnym w kierunku talasemii alfa. Badania wykonano też w próbce krwi dziecka 4 dni po urodzeniu i po ostatniej transfuzji.

Materiał i metody

Materiałem do badań diagnostycznych była krew matki, ojca i dziecka pobrana na EDTA. W trakcie ciąży pobrano również krew pępowinową od płodu podczas wykonywania transfuzji dopłodowej (*intrauterine transfusion* – IUT). Krew zdrowych dawców, krew pępowinowa pobrana po porodzie od zdrowej ciężarnej oraz kontrole DNA ze znanymi delecjami w klastrze alfa-globiny stanowiły materiał porównawczy. Rodzicom zbadano podstawowe parametry morfologiczne, a następnie wykonano badania biochemiczne obejmujące oznaczenie HbA₂, HbF oraz elektroforezę hemoglobin na alkalicznych i kwaśnych żelach agarozowych (Sebia). Oznaczenie stężenia HbA₂ wykonywano za pomocą mikrokolumnowej chromatografii anionowymiennej przy użyciu zestawu Beta-Thal HbA₂ Quick Column (Helena Biosciences), stężenie HbF metodą alkalicznej denaturacji. Próbki krwi rodziców, krwi pępowinowej dziecka i kontrolnej poddano także analizie HPLC.

DNA izolowano zestawem Nucleospin Dx Blood firmy Macherey Nagel. Podstawowe delecje powodujące talasemię alfa wykrywano metodą gap-PCR z zestawem primerów obejmującym siedem delecji: $-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-\text{FIL}$, $-\text{SEA}$, $-\text{MED}1$, $-(\alpha)^{20,5}$, $-\text{THA}1$. Technika MLPA potwierdzano uzyskane wyniki. Korzystano z zestawu P-140 HBA firmy MRC-Holland. Analizę wyników przeprowadzono programem Coffalyser.

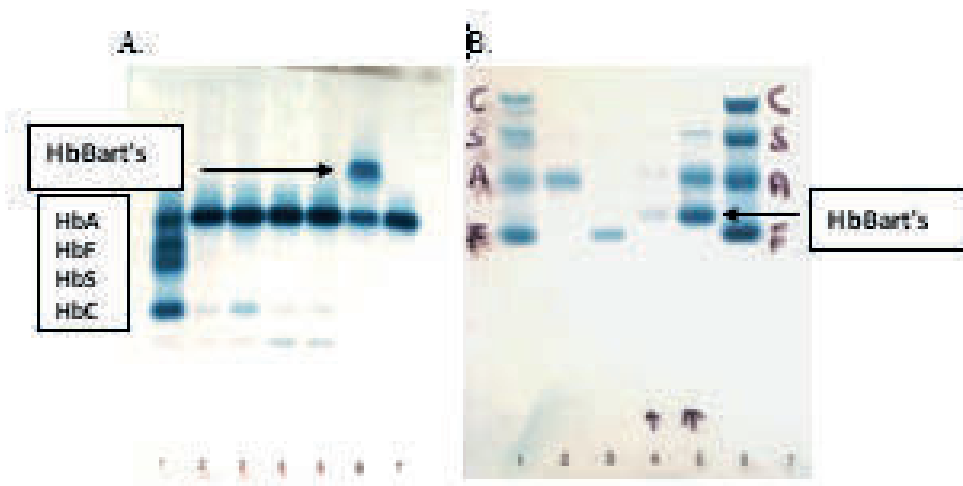
Wyniki

Obraz ultrasonograficzny kardiomegalii u płodu przedstawiono na rycinie 1. Wyniki jakościowej elektroforezy hemoglobin w środowisku zasadowym i kwaśnym zaprezentowano odpowiednio na rycinach 2A i 2B. U płodu dominującą hemoglobina jest hemoglobina Barta, a pozostałą frakcją stanowi HbA. W kontrolnej krwi pępowinowej dominuje frakcja HbF, a pozostałą część stanowi HbA. Rozdział elektroforetyczny hemoglobin w rodziców nie wykazał nieprawidłowości.



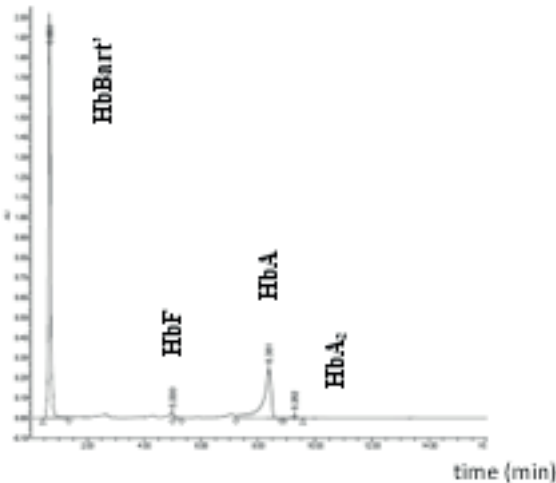
Ryc. 1 Kardiomegalia u płodu
Fig. 1. Cardiomegaly in the fetus

Wyniki ilościowej oceny frakcji hemoglobin techniką HPLC przedstawiono na rycinie 3. U płodu HbA stanowiła ok. 33%, natomiast hemoglobina Barta ok. 65%. Frakcje HbA₂ i HbF stanowiły razem mniej niż 2%. Kontrola z krwi pępowinowej zawierała ok.



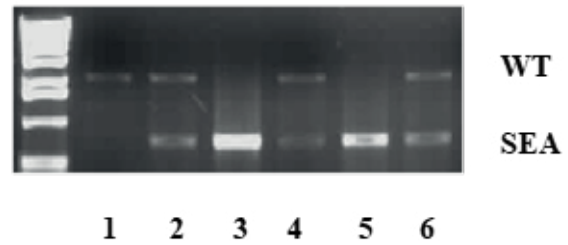
Ryc. 2. Obraz elektroforezy hemoglobin w środowisku zasadowym (A) i kwaśnym (B)
A: ścieżka 1 – próbka kontrolna (mieszanina A, F, S, C), ścieżka 4 – matka, ścieżka 5 – ojciec, ścieżka 6 – krew pępowinowa. B: ścieżka 1, 6 – próbka kontrolna (mieszanina A, F, S, C), ścieżka 3 – kontrolna krew pępowinowa, ścieżka 4, 5 – krew pępowinowa
Fig. 2. Agarose hemoglobin electrophoresis at alkaline pH (A) and acidic pH (B)
A: lane 1 – control sample (mixture A, F, S, C), lane 4 – mother, lane 5 – father, lane 6 – cord blood. B: lane 1, 6 – control sample (mixture A, F, S, C), lane 3 – control cord blood, lane 4 and 5 – cord blood

93% HbF, 6% HbA i niewielką frakcją HbA₂. Badania krwi rodziców wykazały wartości HbA₂ oraz HbF w granicach normy: u matki HbA₂ – 2,5%, HbF – 0,9%, u ojca HbA₂ – 2,6%, HbF – 1,1%.



Ryc. 3. Rozdział chromatograficzny hemoglobiny krwi pępowinowej techniką HPLC
Rozdział chromatograficzny krwi pępowinowej wykazał hemoglobiny HbBart's i HbA oraz niewielkie ilości HbF i HbA₂
Fig. 3. Chromatographic separation of cord blood hemoglobins on HPLC
System Chromatogram of cord blood showed elevated HbBart's, and HbA and small amounts of HbF and HbA₂

Wyniki badań molekularnych opartych na gap-PCR przedstawiono na rycinie 4. W DNA dorosłego, zdrowego dawcy nie znaleziono żadnej z 7 mutacji delecyjnych wykrywanych przez ten test. W materiale kontrolnym oraz u obojga rodziców wykryto prążek odpowiadający prawidłowemu allelowi oraz prążek wskazujący na delecję SEA. Na tej podstawie zdiagnozowano u tych osób heterozygotyczną postać talasemii alfa typu zero. U płodu wykryto tylko jeden prążek odpowiadający delecji SEA, wskazujący na homozygotyczną postać talasemii alfa typu zero, warunkującą BHFS.



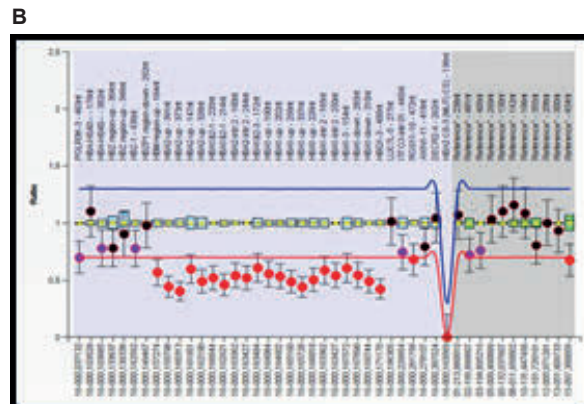
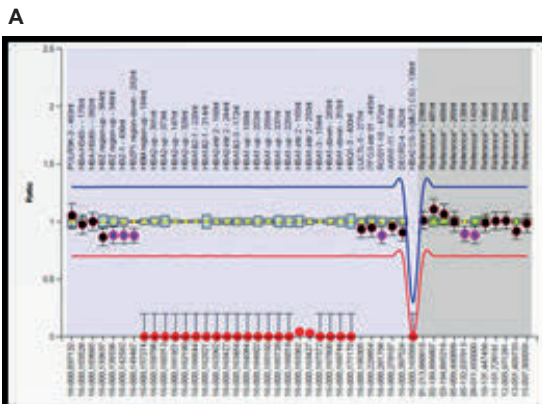
Ryc. 4. Obraz elektroforetyczny produktów otrzymanych w gap-PCR
Ścieżka 1 – zdrowy, ścieżka 2 – kontrola SEA, ścieżka 3, 5 – krew pępowinowa, ścieżka 4 – matka, ścieżka 5 – ojciec

Fig. 4. Amplification products of the gap-PCR
Lane 1 – wild type, lane 2 – control for SEA, lane 3 – cord blood, lane 4 – mother, lane 5 – cord blood, lane 6 – father

Na rycinie 5 przedstawiono wyniki badań techniką MLPA. Potwierdzają one wyniki uzyskane z gap-PCR, tzn. heterozygotyczną postać mutacji SEA u obojga rodziców oraz homozygotyczną postać mutacji SEA u płodu. Po porodzie powtórzono badania z krwi dziecka i uzyskano identyczne wyniki genetyczne, które zostały potwierdzone w ośrodku Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford.

Dyskusja

W prezentowanej pracy przedstawiono pierwszy przypadek w Polsce rozpoznanego prenatalnie zespołu hemoglobiny Barta, najcięższej postaci talasemii alfa. Pierwszym sygnałem nieprawidłowego stanu płodu było wykrycie kardiomegalii w rutynowym badaniu USG. Wtedy ciężarną objęto opieką specjalistyczną w ośrodku terapii płodu. Powiększenie sylwetki serca płodu w stosunku do klatki piersiowej jest objawem nieswoistym, mogącym mieć przyczynę kardiologiczną bądź pozasercową, wskazującym na niewydolność krążenia [15]. Kardiomegalia może być także wynikiem anemii płodu, następującym z powodu infekcji wirusowej, konfliktu serologicznego



Ryc. 5. Histogramy MLPA pokazujące warianty liczby kopii w próbkach krwi pępowinowej płodu (A-homozygotyczna delecja SEA) i matki (B-heterozygotyczna delecja SEA)
Fig. 5. MLPA histograms showing copy number variations (CNVs) in samples of cord blood (A-homozygous SEA deletion) and mother (B-heterozygous SEA deletion)

lub innych, genetycznie uwarunkowanych przyczyn. Badanie echa serca diagnozowanego płodu wykazało znaczną niedokrwistość i konieczność niezwłocznej terapii wewnątrzmacicznej. Dzięki pomiarowi prędkości maksymalnej w tętnicy środkowej mózgu *MCA-PSV*, który jest uznawany za jeden z najdokładniejszych nieinwazyjnych wskaźników występowania anemii płodu, w opisywanym przez nas przypadku stan płodu był cyklicznie monitorowany badaniem dopplerowskim [16, 17]. Kordocenteza pełniła rolę diagnostyczno-terapeutyczną, umożliwiając pobranie materiału do badań oraz równoczesne leczenie płodu poprzez transfuzję koncentratu krwinek czerwonych i leków.

Oznaczanie poziomu hemoglobiny wspomaga decyzje odnośnie do częstości wykonywanych transfuzji oraz ilości podawanego koncentratu krwinek czerwonych. W wyniku terapii zmiany obrzękowe mogą być całkowicie wyeliminowane do momentu porodu. Zwrócono uwagę, że głównie transfuzje dopłodowe przyczyniły się do zwiększenia przeżywalności tych płodów/dzieci i w tym wypadku są one jedyną, ratującą ich życie terapią. Podstawową korzyścią z transfuzji wewnątrzmacicznych jest umożliwienie przeżycia płodu do czasu osiągnięcia dojrzałości do życia pozałożowego oraz redukcja hipoksyjnego uszkodzenia narządów i zmian neurologicznych u dzieci, które przeżyją okres ciąży. Dodatkową korzyścią z podawania krwinek czerwonych zdrowego dawcy jest supresja hematopoezy płodowej.

Transfuzje mogą jednak prowadzić do przeciążenia żelazem i jego gromadzenia się w tkankach narządów wewnętrznych. Ze stosunkowo wysoką częstością występują u tych dzieci problemy neurologiczne lub ogólnorozwojowe. Złoża żelaza, które gromadzą się w przysadce mózgowej, podwzgórzcu, tarczycy i gonadach, prowadzą do hipogonadyzmu, niedoczynności tarczycy z opóźnionym dojrzewaniem i zaburzeń w budowie ciała. Zatem równocześnie z transfuzjami prowadzi się terapię chelatującą. Standardy programów powtarzanych transfuzji wymagają utrzymania stężenia hemoglobiny na poziomie 9-10 g/dl. Zwykle takie wartości zapewniają transfuzje przypadające co 3-4 tygodnie. Niemal wszyscy poddawani transfuzjom pacjenci mają znaczną splenomegalię, wzmożoną retikulocytozę i hemolizę.

W opisywanym przypadku równocześnie z terapią wykonano z krwi płodu wiele badań określających przyczynę niedokrwistości. Wykluczono infekcje wirusowe oraz alloimmunizację i przeciek płodowo-matczyny. Nawracająca niedokrwistość pomimo przetoczenia masy erytrocytarnej wzbudziła podejrzenie wrodzonej wady syntezy hemoglobiny, szczególnie z powodu azjatyckiego pochodzenia rodziców.

W Wietnamie, podobnie jak w innych krajach południowo-wschodniej Azji delecja SEA stanowi dominujące podłoże talasemii alfa. Szacuje się, że przynajmniej 5-15% mieszkańców regionu południowo-wschodniej Azji jest nosicielami delekcji typu alfa zero [18]. Talasemia alfa jest najczęstszą przyczyną nieimmunologicznego obrzęku płodu (*non-immune hydrops fetalis* – NIHF) w południowo-wschodniej Azji i stanowi 60-90% wszystkich przypadków tej choroby. Rodzice, którzy tak jak rodzice badanego przez nas dziecka, są nosicielami mutacji alfa zero, mają 25% ryzyko posiadania dziecka z BHFS. Wobec zwiększającej się liczby osób pochodzących z regionów endemicznych występowania talasemii alfa, możliwość występowania tej choroby jako podłoża niedokrwistości u płodu musi

być brana pod uwagę również w Polsce, szczególnie w przypadku rodzin pochodzących z Azji.

Badania niezbędne do diagnostyki BHFS obejmowały analizy biochemiczne i genetyczne. Materiał do badań stanowiła zarówno krew pępowinowa płodu, jak i krew obojga rodziców. Metody biochemiczne pozwoliły na wykrycie i oszacowanie ilości hemoglobiny Barta. HPLC wykazało u płodu około 33% HbA, pochodzącej z transfuzji, natomiast hemoglobina Barta stanowiła około 65%. Identyczne obserwacje w rozkładzie jakościowym hemoglobin po pierwszej transfuzji zawarto w pracy Chmait i wsp. [18]. Obniżenie stężenia lub całkowite wyeliminowanie hemoglobiny Barta zachodzi stopniowo w wyniku kolejnych transfuzji.

Zasadnicze znaczenie w procesie diagnostycznym miało zastosowanie metod genetycznych, które wykazały delecyjną postać talasemii alfa u płodu i u jego rodziców. Rodzice są nosicielami mutacji --SEA, natomiast u płodu wykryto homozygotyczną postać delekcji. Podkreślić należy, że u obojga rodziców rozdział elektroforetyczny hemoglobin nie wykazał nieprawidłowości. Nosicielstwo patologicznych genów można było wykazać jedynie metodami molekularnymi.

Wyniki uzyskano przy pomocy dwóch niezależnych metod. Jomoui w najnowszej pracy podkreśla konieczność stosowania podwójnych metod w badaniach prenatalnych wraz z kontrolą kontaminacji matczynym materiałem [19, 20].

Delekcja obu kopii genów alfa-globiny, do których należy wykryta u płodu mutacja --SEA, klasyfikowana jest, podobnie jak --FIL, --THAI, --MED czy też --(α)^{20.5} do grupy talasemii alfa typu alfa zero, charakteryzującej się całkowitym brakiem syntezy alfa-globiny z danego allelu. Jednakże delekcja SEA nie obejmuje genu HbZ, zatem są syntetyzowane globiny embrionalne, umożliwiające przeżycie płodu, jednak ich poziom syntezy, wynoszący od 10% do 20% syntezy globin u zdrowego płodu, jest niewystarczający dla jego prawidłowego rozwoju. Niektóre delekcje obejmujące geny hemoglobin embrionalnych, np. --FIL, --THAI skutkują całkowitym brakiem syntezy hemoglobin ekspresji genów klastra alfa-globiny, co najczęściej prowadzi do terminacji ciąży bez zdiagnozowania przyczyny.

Od kilku lat w IHiT wykonywane są badania genetyczne w kierunku talasemii alfa. Zaobserwowano, że blisko połowa chorych z podejrzeniem niedokrwistości uwarunkowanej genetycznie z prawidłowym lub obniżonym stężeniem HbA₂ okazała się nosicielami talasemii alfa, a 65% z nich to heterozygoty talasemii alfa typu zero [21]. Pacjentami byli prawie wyłącznie chorzy pochodzenia kaukaskiego. W przypadku wykrycia nosicielstwa talasemii alfa typu zero u rodziców niezbędne jest wykonanie diagnostyki prenatalnej w kierunku talasemii u płodu.

Skuteczna diagnostyka BHFS powinna prowadzić do wdrożenia odpowiedniej terapii u płodu i noworodka. Zastosowanie transfuzji dopłodowych stanowi podstawową metodę leczenia w okresie prenatalnym, umożliwiającą przeżycie dziecka do momentu porodu, lecz nie pozwala na wyleczenie choroby. Po urodzeniu, dzieci są nadal zależne od transfuzji, a nieefektywna erytropoeza sprzyja przeciążeniu żelazem, zatem równocześnie z transfuzjami prowadzi się terapię chelatującą. Ostateczne wyleczenie jest możliwe dopiero poprzez przeprowadzenie transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych. W 2013 r. powstał międzynarodowy rejestr żyjących chorych z BHFS, utworzony przez BHFS International

Consortium, zawierający szczegółowe dane dotyczące przebiegu ciąży, leczenia w okresie płodowym i po urodzeniu oraz stanu klinicznego pacjentów. Obecnie rejestr obejmuje dane 69 pacjentów, z których blisko połowa nie była wcześniej opisana w literaturze. Najstarszy opisywany pacjent ma ponad 30 lat [22].

Podsumowując, wczesna diagnostyka oraz odpowiednie leczenie spowodowały, że dzieci z BHSF mają coraz lepsze rokowanie. W dalszym ciągu obraz kliniczny choroby jest różnorodny. Tym bardziej ważną wydaje się profilaktyka i odpowiednie badania diagnostyczne rodziców. Jeśli u płodu stwierdzono niedokrwistość o nieznaną przyczynę, należy ocenić prawdopodobieństwo wystąpienia BHSF. Jeśli ryzyko to jest wysokie (rasa żółta rodziców, talasemia w wywiadzie rodzinnym) niezbędne jest pobranie próbki krwi płodu na badania metodami biologii molekularnej. Skuteczna diagnostyka w okresie prenatalnym pozwoli na wyjaśnienie przyczyny niedokrwistości i obrzęku u płodu oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia u dziecka, a także konsultację i przygotowanie rodziców.

Piśmiennictwo References

- Wkład autorów / Authors' contributions**
Według kolejności.
- Konflikt interesu / Conflict of interest**
Nie występuje.
- Finansowanie / Financial support**
Finansowanie w ramach planu naukowego IHiT.
- Etyka / Ethics**
Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami UE oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.
- [1] Turowski P, Uhrynowska M, Brojer E. Talasemie – patofizjologia, podstawy molekularne i diagnostyka. *Hematologia* 2013;4: 239–56.
- [2] Turowski P. Talasemie i patologiczne warianty hemoglobiny. In: Robak T, Warzocha K, eds. *Hematologia*. Gdańsk: Via Medica; 2016, p. 600–9.
- [3] Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of α -thalassemia, *Blood Cells Mol Dis* 2018;70:43–53.
- [4] Vichinsky EP. Alpha thalassemia major—new mutations, intrauterine management, and outcomes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;35–41.
- [5] Thomas E, Yeo GS, Tan TY. Hemoglobin Bart's Hydrops Fetalis Syndrome. In: Datta S, Hepner DL, eds. *Anesthetic and obstetric management of high-risk pregnancy*. New York: Springer; 2004, p. 253–64.
- [6] Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Ann NY Acad Sci* 2005;1054:25–32.
- [7] Pecker LH, Guerrero MF, Loehelt B, et al. Homozygous α -thalassemia: Challenges surrounding early identification, treatment, and cure. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(1):151–5.
- [8] Yurdakök M. Non-immune hydrops fetalis. *JPNIM* 2014;3(2):e030214.
- [9] Jatavan P, Chattipakorn N, Tongsong T. Fetal hemoglobin Bart's hydrops fetalis: pathophysiology, prenatal diagnosis and possibility of intrauterine treatment. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018;31(7):946–57.
- [10] Kreger EM, Singer ST, Witt RG, et al. Favorable outcomes after in utero transfusion in fetuses with alpha thalassemia major: a case series and review of the literature. *Prenat Diagn* 2016;36(13):1242–9.
- [11] Dębska M, Kretowicz P, Tarasiuk A, Dangel J, Dębski R. Skuteczna terapia prenatalna i dobre wyniki odległe leczenia płodu ze skrajnie ciężką chorobą hemolityczną – opis przypadku. *J Ultrason* 2014;14:217–22.
- [12] Zwiers C, van Kamp I, Oepkes D, Lopriore E. Intrauterine transfusion and non-invasive treatment options for hemolytic disease of the fetus and newborn – review on current management and outcome. *Expert Rev Hematol* 2017;10(4):337–44.
- [13] Amid A, Chen S, Brien W, Kirby-Allen M, Odame I. Optimizing chronic transfusion therapy for survivors of hemoglobin Barts hydrops fetalis. *Blood* 2016;127:1208–11.
- [14] Elsaid MY, Capitini CM, Diamond CA, et al. Successful matched unrelated donor stem cell transplant in Hemoglobin Bart's disease. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(11):1522–3.
- [15] Respondek-Liberska M. Kardiomegalia u płodu. In: Pietryga M, Brązert J, eds. *Podstawy praktycznej ultrasonografii w ginekologii i położnictwie*. Poznań: Wyd. Exempulum; 2009, p. 697–704.
- [16] Tarasiuk A, Dębska M, Jędrasiak J, Witwicki JM, Dębski R. Wpływ terapii prenatalnej płodu z nieimmunologicznym obrzękiem uogólnionym na przebieg okresu noworodkowego – opis trzech przypadków. *Perinatol Neonatol Ginekol* 2010;3,4:313–8.
- [17] Chodkowski M, Świątkowska-Freund M, Preis K. Ocena wartości maksymalnej prędkości w tętnicy środkowej mózgu płodu między 18. a 39. tygodniem ciąży w polskiej populacji. *Ginekol Pol* 2015;86(11):806–10.
- [18] Chmait RH, Baskin JL, Carson S, Randolph LM, Hamilton A. Treatment of alpha(0)-thalassemia (--SEA)/--(SEA) via serial fetal and post-natal transfusions: Can early fetal intervention improve outcomes? *Hematology* 2015;20(4):217–22.
- [19] Karnpean R, Fucharoen G, Fucharoen S, et al. Accurate prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis in daily practice with a double-check PCR System. *Acta Haematol* 2009;121:227–33.
- [20] Jomoui W, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, et al. Genetic origin of $\alpha(0)$ -thalassemia (SEA deletion) in Southeast Asian populations and application to accurate prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *J Hum Genet* 2017;62:747–54.
- [21] Klimczak-Jajor E, Skulimowska J, Turowski P, et al. Analiza mutacji talasemii alfa u chorych diagnozowanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii. *Acta Haematol Pol* 2016;47(4):248–53.
- [22] Songdej D, Babbs C, Higgs DR; BHFS International Consortium. An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Blood* 2017;129(10):1251–9.