

Nowe obserwacje dotyczące alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków

w świetle doniesień XIII Europejskiego Sympozjum Immunobiologii Płytek i Granulocytów (3–6 lipca 2014, Bad Homburg, Niemcy)

New observations on fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia presented during the XIIIth European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology (July 3–6th 2014, Bad Homburg, Germany)

Agnieszka Wróbel, Katarzyna Guz, Małgorzata Uhrynowska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Jednym z wiodących tematów sympozjum były zagadnienia związane z alloimmunologiczną małopłytkowością płodów i noworodków (FNAIT, *fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia*). Prowadzono w tej dziedzinie zarówno badania kliniczne, badania dotyczące charakterystyki przeciwciał skierowanych do płytek krwi, jak i nowatorskie badania na modelach zwierzęcych.

Kjær Killie i wsp. z Tromsø w Norwegii analizowali naturalny przebieg alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków w kolejnej ciąży u kobiet, u których chorobę tę obserwowano u dziecka urodzonego z ciąży poprzedniej [1]. Na podstawie prowadzonych wcześniej obserwacji uważano, że choroba u kolejnego dziecka ma na ogół cięższy przebieg. W obecnych badaniach prospektywnych zespół norweski analizował przebieg kolejnych ciąż u 45 kobiet, u których stwierdzono obecność przeciwciał anti-HPA-1a w ciąży poprzedniej. W zależności od liczby płytek u pierwszego dziecka analizowaną grupę podzielono na trzy podgrupy: z ciężką małopłytkowością ($1-49 \times 10^9/l$), średnią ($50-149 \times 10^9/l$) i bez małopłytkowości ($>150 \times 10^9/l$). Żadna z kobiet nie była w pierwszej ciąży leczona immunoglobuliną. Po porównaniu liczby płytek u dziecka urodzonego z pierwszej ciąży z liczbą płytek u dzieci u-

rodzonych w kolejnej ciąży stwierdzono, że w 18% przypadków stopień małopłytkowości był niższy, w 52% nie było różnic w stopniu małopłytkowości dziecka w pierwszej i kolejnej ciąży, a w 30% przypadków obserwowano głębszą małopłytkowość. Wśród kobiet będących w pierwszej ciąży, u jednego dziecka wystąpił wylew do ośrodkowego układu nerwowego w 30. tygodniu ciąży; u żadnej z kobiet w kolejnej ciąży nie doszło do wylewu u płodu lub u dziecka. Zaobserwowano wyższe stężenie przeciwciał u kobiet, u których dzieci liczba płytek w kolejnej ciąży była niższa niż w pierwszej ciąży. W przypadkach, w których liczba płytek u dziecka w kolejnej ciąży była wyższa niż w ciąży poprzedniej, stężenie przeciwciał było niższe. Przeprowadzone badania nie potwierdzają, by ciężkość przebiegu FNAIT u kolejnego dziecka urodzonego przez matkę z przeciwciałami była zawsze nasiloną. Potwierdzają natomiast znaczenie badania stężenia przeciwciał dla przewidywania ciężkości przebiegu FNAIT.

Kapur i wsp. zaprezentowali wyniki badań nad stopniem glikozylacji przeciwciał skierowanych do płytek [2]. Za pomocą spektrometrii masowej oceniali różnice glikozylacji Asn297 we fragmencie FcIgG. Ten fragment immunoglobuliny warunkuje bowiem stopień wiązania przeciwciała z receptorem Fc

na komórkach fagocytujących. Wykazali istotnie niższy stopień fukozytacji przeciwciał IgG1 o swoistości anti-HPA-1a od kobiet, które urodziły dziecko z alloimmunologiczną małopłytkowością płodu/novorodka (FNAIT) (n = 48) w porównaniu ze stopniem fukozytacji w całej frakcji IgG1 izolowanej z surowicy. Przeciwciała o małej liczbie cząsteczek fukozy miały zwiększony stopień wiązania do Fc gamma RIIIa i Fc gamma RIIIb, lecz nie do Fc gamma RIIa, w porównaniu z przeciwciałami z dużą liczbą cząsteczek fukozy. W konsekwencji płytki opłaszczane przeciwciałami o niskiej zawartości fukozy były w większym stopniu fagocytowane przez granulocyty obojętnochłonne, zawierające na swej powierzchni receptory Fc gamma RIIIb(+) i przez monocyty zawierające receptory Fc gamma RIIIa(+). Stopień fagocytozy przez monocyty bez receptorów Fc gamma RIIIa(-) był niski. Dodatkowo stopień fukozytacji przeciwciał anti-HPA-1a korelował z liczbą płytek dziecka z FNAIT i z ciężkością przebiegu choroby. W przeciwieństwie do obserwacji u dzieci z FNAIT nie obserwowano zróżnicowania w stopniu fukozytacji w przeciwciałach anti-HLA powodujących oporność na przetoczone płytki, co wskazuje na to, że poziom fukozytacji może być zależny od antygeny, do którego skierowane są przeciwciała, lub od stanu fizjologicznego determinowanego przez ciążę.

Wihadmadyatami i wsp. z Justus Liebig University w Giessen w Niemczech scharakteryzowali nowy antygen Lap(a), który był powodem wytworzenia przeciwciał u kobiety w ciąży, prowadzących do wystąpienia ciężkiej małopłytkowości u jej dziecka [3]. Przeciwciała wykryte u kobiety w teście MAIPA reagowały wyłącznie z glikoproteiną GPIIb/IIIa płytek ojca dziecka. Reaktywność z tą GP wykazano również metodą immunoprecypitacji — wykazano, że przeciwciała reagują z GPIIb. Metodą sekwencjonowania cDNA otrzymanego z RNA wykazano, że GPIIb ojca dziecka niesie mutację C>G w pozycji 2511 w eksonie 25 GPIIb. Mutacja ta skutkuje zmianą aminokwasu Gln>His w pozycji 806 tej glikoproteiny zlokalizowanej w domenie calf-2. Autorzy dokonali ekspresji fragmentu GPIIb w linii komórkowej komórek ssaków i potwierdzili wiązanie przeciwciała anti-Lap(a) z utworzonym w nich epitopem. W tym samym regionie znajdują się epitopy wcześniej opisanych antygenów (HPA-3, HPA-9 i HPA-27). Badania krystalograficzne tego regionu wykazują, że nie jest on sztywny, co może powodować destabilizację znajdujących się w jego obrębie epitopów HPA. Dalsze badania HPA zlokalizowanych w domenie calf-2 GPIIb calf-2 mogą pomóc w zrozumieniu, dlaczego niektóre

testy serologiczne mają trudności w wykrywaniu labilnych epitopów na GPIIb. Autorzy przebadali 300 dawców krwi i nie wykazali obecności nowo odkrytego antygeny u żadnego z nich.

Eksteen i wsp. przedstawili wyniki badań nad wpływem przeciwciał anti-HPA-1a na funkcję trofoblastu [4]. W swoich poprzednich badaniach autorzy ci wykazali niską wagę urodzeniową chłopców urodzonych przez matki z wysokim stężeniem przeciwciał anti-HPA-1a. W obecnej pracy postawili hipotezę, że przeciwciała te mają wpływ na formowanie się łożyska. Wiadomo, że integryna 3, na której znajduje się antygen HPA-1a, występuje nie tylko na płytkach i megakariocytach, ale też jako integryna V3 (receptor dla witronektyny) na wielu innych komórkach, w tym na komórkach trofoblastu. Weryfikacji hipotezy o wpływie anti-HPA-1a na formowanie łożyska autorzy dokonali przy użyciu eksperymentalnego modelu z użyciem przeciwciał anti-HPA-1a i linii komórek trofoblastu (HTR8/SVneo) otrzymanej z ludzkiego łożyska z pierwszego trymestru ciąży. Badali wpływ anti-HPA-1a na adhezję i migrację komórek, używając systemu xCELLigence System. Badania wykonywano w specjalnych komorach. Wykazano, że przeciwciała anti-HPA-1a częściowo hamują adhezję i migrację komórek trofoblastu, co wskazuje na możliwość, że przeciwciała anti-HPA-1a utrudniają rozwój łożyska, a to z kolei doprowadza do zmniejszenia wagi urodzeniowej dzieci.

Fuhrmann i wsp. zajęli się analizą zdolności monoklonalnych przeciwciał anti-CD36 (anti-Nak^a) oraz surowic matek zawierających przeciwciała anti-Nak^a do indukowania niszczenia (CL, *clearance*) ludzkich płytek krwi (hPLT, *human platelets*) *in vivo* [5]. Przeciwciała skierowane do antygeny CD36 mogą powodować FNAIT, a także oporność na transfuzję płytek (PTR, *platelet transfusion refractoriness*). Co ciekawe, przypadki FNAIT związanej z obecnością przeciwciał anti-CD36 często są skorelowane z wielokrotnymi aborcjami. Autorzy pracy skonstruowali dwie hybrydomy produkujące przeciwciała anti-CD36 i scharakteryzowali dwa rodzaje przeciwciał monoklonalnych (klon 4F9 i 4G2) rozpoznających różne epitopy. Surowice pacjentek z podejrzeniem przeciwciał anti-Nak^a (n = 9) badano za pomocą zestawu komercyjnego, a swoistość przeciwciał potwierdzono w teście wychwytywania antygeny z zastosowaniem komórek transfekowanych CD36. W wyniku analizy surowicy z przeciwciałami anti-Nak^a pochodzącej od kobiety z FNAIT, u której wystąpiło wiele spontanicznych poronień, wykazano silną dodatnią reakcję

z komórkami transfekowanymi CD36 w metodzie cytometrii przepływowej. W teście enzymatycznym z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych do różnych glikoprotein krwinek płytkowych (MAIPA, *monoclonal antibody immobilization of platelet antigens*) surowica wykazała reakcję ujemną z klonem 4F9, a reakcję dodatnią z klonem 4G2. Wskazuje to, że przeciwciało monoklonalne 4F9 rozpoznaje podobne epitopy jak przeciwciała anti-Nak^a produkowane przez matki. Wstrzyknięcie 30 µg przeciwciał produkowanych przez klon 4F9 myszom NOD SCID prowadziło do eliminacji ludzkich płytek krwi z mysiego układu krążenia w przeciągu godziny [hPLT CL (średnia ± SD): 89 ± 3%, n = 3]. Takiego efektu nie było, gdy myszom podano to samo przeciwciało, ale poddane uprzedniej deglikozylacji. W badaniu cytometrycznym deglikozylowane 4F9 i 4F9 wykazały podobne wiązanie hPLT.

Wstrzyknięcie myszom 2 mg immunoglobuliny anti-Nak^a (IgG) jedynie nieznacznie zredukowało niszczenie hPLT w porównaniu z efektem podania IgG od zdrowego dawcy. Gdy płytki ludzkie wstrzyknięte myszom preinkubowano z cytrynianową surowicą anti-Nak^a przed wstrzyknięciem, uzyskiwano ich silne niszczenie w organizmie myszy.

Wyniki te wskazują, że w niszczenie hPLT przez przeciwciała monoklonalne anti-4F9 i anti-Nak^a w modelu *in vivo* mogą być zaangażowane różne mechanizmy. Ponieważ CD36 powszechnie występuje na różnych komórkach, udział składników komórkowych i humoralnych w niszczeniu komórek przez anti-Nak^a powinien być brany pod uwagę. Wykorzystanie deglikozylowanego klonu 4F9 do zapobiegania niszczeniu hPLT przez przeciwciała anti-Nak^a budzi nadzieje badaczy.

Killie i wsp. skonstruowali nowatorski mysz model FNAIT, w którym badali indukcję i odpowiedź immunologiczną na HPA-1a *in vivo* [6]. Jak wiadomo, wytwarzanie przeciwciał anti-HPA-1a i występowanie FNAIT są silnie skorelowane z obecnością allelu MHC klasy II DRB3*01:01. Peptydy uwalniane w trakcie niszczenia z integriny 3, zawierające w pozycji 33 leucynę definiującą antygen HPA-1a (peptyd HPA-1a), wiążą się z cząsteczkami MHC klasy II DRA/DRB3*01:01 i taki kompleks peptyd-MHC może aktywować HPA-1a-specyficzne komórki T u kobiet zimmunizowanych podczas ciąży dotkniętych FNAIT. Silny związek między allelem DRB3*01:01 i immunizacją sugeruje, że aktywacja komórek T przez kompleks peptyd HPA-1a-DRA/DRB3*01:01 jest czynnikiem determinującym immunizację.

W związku z tym, aby ocenić rolę kompleksu peptyd-MHC w rozwoju FNAIT oraz ocenić potencjalne sposoby interwencji prowadzących do immunoprofilaktyki czy leczenia konieczna jest znajomość procesu rozpoznania tego kompleksu przez komórki T. Killie i wsp. stworzyli model do badania specyficznej odpowiedzi HPA-1a-specyficznych komórek T z restrykcją DRB3*01:01 *in vivo*. Użyto do tego celu myszy transgenicznym zarówno pod względem ludzkiego CD4, jak i ludzkich haplotypów MHC klasy II, będących nośnikami alleli DRB3*01:01. Aby dokonać oceny myszy jako potencjalnego modelu służącego do poznania związanej z FNAIT odpowiedzi komórek T *in vivo*, zbadano najpierw, czy allele DRA/DRB3*01:01 były wyrażone na splenocytach myszy transgenicznym oraz czy mogły prezentować peptyd HPA-1a. W tym celu splenocyty myszy hodowano z płytkami HPA-1a dodatnimi lub ostrzykiwano peptydem HPA-1a, a następnie łączono z klonalnymi, HPA-1a specyficznymi komórkami T CD4 z restrykcją HLA DRB3*01:01 izolowanymi od kobiet zimmunizowanych antygenem HPA-1a. Ich proliferację oceniano w teście proliferacji CFSE. Ludzkie HPA-1a specyficzne komórki T proliferowały zwłaszcza w odpowiedzi na antygeny HPA-1a prezentowane przez splenocyty myszy transgenicznym. Zaobserwowano natomiast brak odpowiedzi w przypadku peptydu kontrolnego oraz płytek HPA-1a ujemnych. Aby ocenić, czy w tym modelu może być wywołana odpowiedź komórek T z restrykcją DRA/DRB3*01:01, myszy transgeniczne immunizowano płytkami HPA-1a dodatnimi, a następnie analizowano odpowiedź ich komórek T na HPA-1a metodą ELISPOT. Okazało się, że splenocyty myszy zimmunizowanych wydzielają cytokiny w odpowiedzi na stymulację antygenem HPA-1a. Uzyskane wyniki wskazują, że myszy z transgeniczną ekspresją HLA-DRA/DRB3*01:01 i ludzkiego CD4 mogą być stosowane jako model do badania odpowiedzi komórek T związanej z FNAIT w warunkach *in vivo*.

Zespół Instytutu Hematologii i Transfuzjologii zaprezentował na sympozjum wyniki standaryzacji badań antygeny HPA-1a za pomocą cytometru przepływowego [7]. Opracowany system badań, oparty na zastosowaniu metod automatycznych, pozwala na ustalenie obecności antygeny HPA-1a w 96 próbkach badanych w ciągu 1,5 godziny. Jest on obecnie używany do wykonania bezpłatnych przeglądowych badań HPA-1a u kobiet ciężarnych z terenu całej Polski, które prowadzone są w ramach grantu PREVFNAIT pt.: „Zapobieganie alloimmunologicznej małopłytkowości płodów

i noworodków w Polsce”. Kobiety HPA-1a ujemne są w grupie ryzyka wytworzenia przeciwciał anty-HPA-1a odpowiedzialnych za najczęstszy i najcięższy konflikt płytkowy. Informacje o projekcie znajdują się na stronie internetowej www.konfliktplytkowy.ihit.waw.pl.

Badania były finansowane ze środków Programu Polsko-Norweska Współpraca Badawcza, prowadzonego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Norweskiego Mechanizmu Finansowego na lata 2009–2014, w ramach Umowy Projektu nr Pol-Nor/203111/69/2013.

Piśmiennictwo

1. Kjær Killie M., Husebekk A., Kjeldsen-Kragh J., Skogen B., Tiller H. The natural course and clinical consequences of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) in subsequent pregnancies — a prospective observational follow-up study. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 19.
2. Kapur R., Kustiawan I., Vestrheim A. i wsp. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 19–20.
3. Wihadmadyatami A., Heidinger K., Röde L.A. i wsp. A New Platelet Alloantigen Lap(a), Associated with Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 20.
4. Eksteen M., Heide G., Tiller H. i wsp. Anti-HPA-1a antibodies affect the function of first trimester trophoblast cells. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 20.
5. Fuhrmann J., Zu X.Z., Xia W., Ye X., Bakchoul T., Santoso S. Anti-CD 36 Antibodies Induce Platelet Destruction In An In Vivo Mouse Model. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 28–29.
6. Killie I.L., Ahlen M.T., Husebekk A., Skogen B.R., Stuge T.B. Induction and detection of in vivo immune responses to HPA-1a in a novel murine model of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT). W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 29.
7. Wróbel A., Guz K., Orzińska A. i wsp. Standardization of automatic FACS analysis for HPA-1a typing. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 46.