

Wybrane zagadnienia dotyczące antygeny D w świetle doniesień prezentowanych na 23. Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Amsterdamie

Selected RhD topics
presented during the 23rd Regional Congress of the
International Society of Blood Transfusion in Amsterdam

Monika Pelc-Kłopotowska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Podczas zjazdu w Amsterdamie antygenowi D poświęcono wiele wystąpień — między innymi wykłady podczas sesji *Immunohematology — Rh*, *Immunohematology — Fetal Maternal Immunology* oraz plakaty prezentowane podczas sesji plakatowej.

Spośród doniesień przedstawionych podczas sesji *Immunohematology — Rh* na omówienie zasługuje prezentacja prof. Wagnera (Niemcy) pt.: *RhesusBase v2: a versatile source of information on published RHD alleles* [1]. Wraz z prof. Flegelem utworzył on funkcjonującą od roku 1999 tzw. „RhesusBase”, w której umieszczano dane dotyczące nowo identyfikowanych alleli *RHD*, informacje na temat antygeny D oraz jego wariantów, jak również ich immunogenności i podatności na immunizację. Zarówno struktura bazy, jak i sposób gromadzenia danych wymagały unowocześnienia; zadanie to wypełnił obecnie prof. Wagner. Nowa konstrukcja bazy umożliwi automatyczne gromadzenie danych o polimorfizmach genu *RHD* oraz szacowanie liczby opublikowanych alleli. Dane zbierane są automatycznie poprzez transfer informacji z bazy GeneBank i ze streszczeń opublikowanych w PubMed pod hasłami: „grupy krwi Rh”, gen *RHD*. W bazie uwzględniono także informacje zawarte w programie BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Prof. Wagner dokonał analizy i weryfikacji wszystkich danych umieszczonych obecnie w utworzonej nowej wersji RhesusBase pod względem fenotypu, rodzaju mutacji, grup alleli *RHD* i roku, w którym po raz pierwszy wykryto nową mutację.

W bazie znajduje się obecnie 108 publikacji i 261 danych uzyskanych poprzez automatyczny transfer z GeneBank. Znajdują się w niej informacje o 367 aktualnie poznanych allelach *RHD*, z których 170 nie zostało jeszcze objętych nomenklaturą ISBT. Jako „D słaby” zakwalifikowano 95 alleli, a 12 spośród nich posiada cechy, które kwalifikują je również do grona wariantów określanych, jako *D częściowy*. Jako *D częściowy* zakwalifikowano 86 alleli, do alleli *DEL* zakwalifikowano 30 a 58 do wariantów *RHD+/RhD-*. Kolejnych 59 *RHD* dodatknych scharakteryzowano, jako osłabiony wariant D lub RhD dodatni. W przypadku 40 alleli nie uzyskano danych dotyczących cech serologicznych, a dla 148 wariantów nieznan jest haplotyp Rh charakterystyczny dla danej odmiany. Haplotyp Ce występuje u 129 odmian, cE u 42, a ce u 43. Zdecydowana większość alleli umieszczonych w bazie została zidentyfikowana w populacji Euroazjatyckiej. Najczęściej występującym mechanizmem odpowiedzialnym za powstanie tak wielu odmian RhD była mutacja typu SNP (*single nucleotide polymorphism*), czyli zmiana pojedynczego nukleotydu (167). W bazie znajduje się 49 genów hybrydowych, 46 alleli powstało w wyniku wielokrotnych mutacji zmiany sensu, 27 to insercje lub delecje, a 26 to mutacje miejsc składania eksonów (tzw. *splice site*). Unowocześniona baza jest uniwersalnym źródłem aktualnych informacji dotyczącym alleli *RHD*.

Na sesji *Immunohematology — Fetal Maternal Immunology* Meshi i wsp. z Arabii Saudyjskiej przedstawili wyniki interesujących badań

Adres do korespondencji: mgr Monika Pelc-Kłopotowska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, e-mail: mpelc@ihit.waw.pl, ebrojer@ihit.waw.pl

przeprowadzonych na modelu mysim, w których zastosowano tzw. „mimotopy” peptydów RhD do szczepienia zwierząt w celu wywołania produkcji przeciwciał anti-RhD [2]. Dotychczas jedyną metodą generacji przeciwciał u dawców krwi, od których pozyskuje się immunoglobulinę anti-D stosowaną w immunoprofilaktyce konfliktu, jest szczepienie RhD dodatnimi ludzkimi krwinkami. Stosowanie do szczepień ludzkich allogenicznych krwinek czerwonych stanowi istotny problem etyczny i wywołuje obawy u wielu dawców. Opracowanie alternatywnych metod wywołania produkcji przeciwciał anti-D u ochotników jest więc bardzo istotne. Należy pamiętać, że rekombinowane monoklonalne przeciwciała anti-RhD nie są skuteczne w immunoprofilaktyce konfliktu matczyno płodowego. Metoda szczepień, którą analizowali badacze z Arabii Saudyjskiej, oparta jest na zastosowaniu do stymulacji produkcji przeciwciał tzw. białkowych mimotopów, czyli peptydów naśladujących naturalne epitopy antygenowe białka RhD (jego immunogenne fragmenty). Autorzy przeprowadzili badania na transgenicznym myszom HLA DR15. Antygen ten występuje u ludzi, którzy odpowiadają produkcją przeciwciał anti-RhD na kontakt z antygenem D (tzw. „odpowiadacze” — *responders*) i dlatego przewidywano, że mimotopy RhD będą generować odpowiedź immunologiczną u takich transgenicznych myszy. We wstępnych badaniach autorzy zidentyfikowali zestaw mimotopów peptydowych RhD, które na platformie mikromacierzy wiązały specyficznie monoklonalne przeciwciała anti-D. Zbadano czternaście takich mimotopów RhD z 7 surowicami z przeciwciałami anti-D i z 7 surowicami bez przeciwciał. Mimotop DM4 specyficznie wiązał przeciwciała monoklonalne anti-D (T27), co wykazano zarówno na platformie mikromacierzy, metodą ELISA, jak i w cytometrze przepływowym. Mimotop ten dołączono do fragmentu Pep6 białka RhD i takim złożonym peptydem uodparniano transgeniczne myszy. Przeciwciała nazwane anti-DM4 wytworzone przez myszy reagowały nie tylko z RhD dodatnimi ludzkimi krwinkami, ale, niespecyficzenie, z krwinkami RhD ujemnymi oraz krwinkami Rnull. Opracowanie metody szczepień za pomocą mimotopów RhD, które zastąpiłyby ludzkie krwinki czerwone stosowane dotychczas do immunizacji dawców, wymaga zatem dalszych badań.

Inne badania na analogicznym szczepie myszy transgenicznych (z antygenem HLA DR15) przedstawił zespół naukowców z Aberdeen [3]. Ich celem było z kolei opracowanie nowego systemu immunoprofilaktyki opartej na tłumieniu produkcji przeciw-

ciał anti-RhD poprzez podawanie drogą wziewną lub podskórną peptydów będących immunogennymi fragmentami białka RhD. Zespół prof. Urbaniaka rozpoczął te badania już wiele lat temu [4]. Taka procedura mogłaby w przyszłości posłużyć do immunoprofilaktyki. Obecnie stosowana immunoprofilaktyka polegająca na stosowaniu immunoglobuliny anti-D jest bowiem nieskuteczna u około 0.5–2% kobiet. Celem obecnego etapu prac zespołu z Aberdeen było wyprodukowanie peptydu, który będzie miał właściwości hamowania odpowiedzi immunologicznej na zasadzie blokowania komórek T helper Transgenicznym myszom HLA-DR15 podano badane peptydy donosowo lub podskórną. U zwierząt, którym podano te peptydy, uzyskano znaczące stłumienie produkcji przeciwciał anti-D po podaniu podskórną oczyszczonego białka RhD.

Kolejnym zagadnieniem poruszonym na Zjeździe było poszukiwanie czynników rokowniczych produkcji przeciwciał w odpowiedzi na alloantygeny komórek krwi, a szczególnie na antygen RhD. Jak wiadomo, nie wszystkie RhD ujemne kobiety ciężarne, których dzieci są RhD dodatnie, i nie wszyscy RhD ujemni ochotnicy szczepieni krwinkami RhD+ odpowiadają produkcją przeciwciał. Dodatkowo, u niektórych osób produkcja przeciwciał jest burzliwa i ich miano wysokie (tzw. *high responders*), u innych miano przeciwciał jest niskie (tzw. *low responders*). Od wielu lat możliwość identyfikacji tzw. „odpowiadaczy” i „nieodpowiadaczy” stanowi przedmiot badań transfuzjologów. Dwie prace prezentowane na Zjeździe dotyczyły poszukiwania polimorfizmów, które mogłyby być czynnikiem rokowniczym wskazującym na wystąpienie produkcji przeciwciał do alloantygenów komórek krwi, a szczególnie do antygeny RhD u ludzi.

W pracy badaczy australijskich [5] do identyfikacji potencjalnych markerów podatności na alloimmunizację zastosowano technikę Affymetrix Gene-Chip. Analizowano polimorfizmy typu SNP w genach zaangażowanych w procesy odpowiedzi immunologicznej i w procesy zapalne (zastosowano ImmunoInflammation-targeted SNP Kit). Dodatkowo, innymi technikami badano polimorfizmy w *Toll-like receptor 2* (TLR2) i w genie kodującym CD14, a także genotypy HLA-DRB1. Wykazano, że płęć oraz 13 SNP w badanych genach, a także allele HLA *DRB1*04* i *DRB1*15* były skorelowane ze statusem „odpowiadacza” i „nieodpowiadacza”. Wykazano też asocjacje intensywności odpowiedzi produkcji przeciwciał (tzw. *high responder* i *medium responder*) z allelami *DRB1*04*, *DRB1*14*, *DRB1*15* oraz z polimorfizmem Arg753Gln TLR2. Zastosowanie nowoczesnych, szerokich analiz

molekularnych jest więc dobrą drogą do poszukiwania genetycznych czynników predykcyjnych podatności na alloimmunizację.

Celem prac zespołu kierowanego przez prof. Brand z Holandii było sprawdzenie, czy markerem podatności na alloimmunizację nie jest antygen HLA DRB15 [6]. Badania wykonano w trzech grupach osób z przeciwciałami i w odpowiednich grupach kontrolnych. Były to matki dzieci z chorobą hemolityczną płodów/norodków, grupa chorych z przeciwciałami do antygenów krwinek czerwonych oraz z przeciwciałami anti-HLA i grupa chorych z przeciwciałami anti-HLA. Przeprowadzone analizy wykazały, że *HLA-DRB1*15* występuje statystycznie istotnie częściej u osób, które w wyniku kontaktu z alloantygenami obecnymi na komórkach krwi produkują przeciwciała. Związek ten jest silniejszy dla odpowiedzi na antygeny krwinek czerwonych niż na antygeny HLA.

Na Zjeździe prezentowano też wiele wyników badań nad polimorfizmem antygeny D. Badania te przedstawili naukowcy z różnych krajów, m.in. z Korei [7] i Afryki Subsaharyjskiej [8], Australii [9], Hiszpanii [10].

W dalszej części zostaną omówione tylko niektóre prace na ten temat.

Na specjalne podkreślenie zasługują badania zespołu z Amsterdamu prezentowane na sesji *Immunohematology — Rh* dotyczące analizy wariantów *RHD* u RhD ujemnych kobiet ciężarnych.

W Holandii od 2011 roku prowadzony jest program badania genu *RHD* płodu z DNA izolowanego z osocza matki w 27 tygodniu ciąży w celu kwalifikacji do śródciażowej i poporodowej profilaktyki anti-D. Immunoglobulinę podaje się tylko kobietom, których płód jest *RHD* dodatni. Do badań stosuje się metodę *real time* PCR z zastosowaniem primerów do exonów 5 i 7. Jest to metoda ilościowa, która pozwala na ustalenie czy wykrywany gen *RHD* pochodzi od matki czy od płodu. Liczba kopii genu pochodzącego od płodu jest bowiem zawsze znacznie mniejsza niż matki. W pracy prezentowano wyniki badań wykonanych u 24 057 kobiet. W tej grupie gen *RHD* wykryto u 275 kobiet. Były wśród nich geny kodujące warianty RhD ze słabą ekspresją, w tym warianty-DEL, możliwe do wykrycia tylko techniką adsorpcji/eucji, a także kobiety, u których gen *RHD* nie ulegał ekspresji. W tej ostatniej grupie potwierdzono obecność znanych już alleli *RHD* nieulegające ekspresji, w tym najczęściej tzw *RHD*Psi*. Zidentyfikowano też 20 nowych, nieopisanych dotychczas mutacji odpowiedzialnych za to zjawisko. W 7 przypadkach autorom nie udało się zidentyfikować mutacji odpowiedzialnej za brak ekspresji RhD [11].

Pisacka i wsp. z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Pradze (Czechy) oceniali częstość występowania antygenów „D słabe” i „D częściowe” w populacji czeskiej [12]. W latach 2000–2012 do Referencyjnego Laboratorium Immunohematologicznego (RLI) w Pradze przesłano 827 próbek, w których w rutynowych oznaczeniach antygeny D wykryto wariant RhD. W RLI próbki były badane metodami serologicznymi za pomocą przeciwciał monoklonalnych oraz metodą biologii molekularnej przy pomocy komercyjnie dostępnych testów opartych na technice PCR-SSP (firma Inno-Train). Wśród próbek przesłanych do badań zidentyfikowano 722 (87,3%) D słabe oraz 105 (12,7%) D częściowe. Wśród D słabych najczęściej występujące to: typ 1 (72%), typ 3 (17,2%), typ 2 (7,9%). W przypadku kategorii antygeny D najczęściej występującym wariantem okazał się DVII (48,6%), a drugim po nim wariant D kategorii VI (23,8%). Jedną z analizowanych próbek z antygenem DVII, zidentyfikowanym metodami serologicznymi oraz metodą biologii molekularnej, została wykorzystana w programie oceny jakości badań w laboratoriach immunologii transfuzjologicznej. Rozesłano ją do 102 laboratoriów transfuzjologicznych wykonujących badania za pomocą różnych technik: probówkową, mikrokolumnową, na mikropłytkach zarówno manualnie, jak i metodą automatyczną. Zdecydowana większość laboratoriów oznaczyła próbkę, jako RhD dodatnią. Obecność wariantu D stwierdzono jedynie w 3 laboratoriach wykonujących badania według algorytmu dla dawcy oraz w 4 laboratoriach, które próbkę traktowały, jako materiał od biorcy. Na tej podstawie Pisacka i wsp. sugerują, że częstość występowania DVII jest wyższa niż to wynika z danych zebranych w tej pracy, ponieważ DVII jest zidentyfikowane, jako prawidłowy antygen D.

Figueiredo i wsp. z Portugalii opisali przypadek 76-letniego mężczyzny z ostrą białaczką szpikową, któremu oznaczono grupę krwi jako O RhD dodatni z ujemnym wynikiem badań na obecność przeciwciał odpornościowych do krwinek czerwonych. Choremu w okresie 6 miesięcy przetoczono 33 jednostki krwi RhD dodatniej. W trakcie kolejnych badań wykryto w jego surowicy alloprzeciwciała anti-D. Bezpośredni test antyglobulinowy (BTA) był dodatni, a w eluacie obecne były przeciwciała anti-D. Metodą biologii molekularnej u chorego zidentyfikowano wariant DIIIc (*RHD-RHCE(3)-RHD*). Krwinki czerwone z kategorią DIIIc bardzo mocno reagują z monoklonalnymi przeciwciałami anti-D, a wykrycie tego wariantu możliwe jest tylko za pomocą badań genetycznych [13].

Polin z Linz (Austria) zaprezentowała wyniki badań genetycznych i serologicznych 804 próbek

pobranym od osób C+/E+ oznaczonych testami rutynowo stosowanymi, jako RhD ujemne. W grupie tej u 18 osób wykryto fragmenty genu *RHD*, a u 14 na krwinkach wykrywano antygen D. Badania w kierunku obecności genu *RHD* wykonano metodą PCR-SSP. Sekwencjonowanie całego genu *RHD* zastosowano w przypadku dodatniego wyniku amplifikacji oraz dla 17 próbek ze zmienioną ekspresją antygeny D. Wśród nich zidentyfikowano najbardziej znane allele determinujące antygen typu DEL: *RHD*(*del exon 8*) (*8*) i *RHD***DEL8 syn. RHD*(*IVS3+1 G>A*) (*4*). W grupie 17 próbek z niejasnym statusem D wykryto dwa nowe allele nazwane: *RHD***weak D typ 2.1* i *DIT-2*; każdy z nich posiada jeden dodatkowy nukleotyd w porównaniu do *RHD***weak D typ 2* i *DIT*. W sześciu próbkach zidentyfikowano *RHD***weak D typ 48* ze słabą ekspresją antygeny D, a jedną określono, jako DEL. Podsumowując, zastosowanie genotypowania *RHD* dla dawców krwi o fenotypie D-/C+/E+, pozwoliło u 1,7% osób wykryć wariant D, serologicznie określany jako DEL i zmienić grupę krwi dawcy na RhD dodatni [14].

Na omówienie zasługuje też praca dotycząca wykrywania i charakterystyki przeciwciał anti-RhD u osób z różnymi odmianami antygeny D. Od wielu lat immunohematolodzy prowadzą obserwacje dotyczące podatności takich osób na alloimmunizację antygenem RhD. Wiadomo, że osoby z niektórymi wariantami RhD, w tym również *D słabe* mogą produkować alloprzeciwciała anti-D po przetoczeniu RhD dodatniej krwi. Są również osoby z odmianami *D słabego* jak np. typ 2, u których wykrywa się anti-D wyłącznie o charakterze autoprzeciwciał. Ustalenie, czy obecne u badanej osoby anti-D mają charakter auto- czy alloprzeciwciał ma bardzo istotne znaczenie kliniczne podczas doboru krwi do transfuzji. Castilho L i wsp. z Brazylii przedstawili 5 przypadków *D słaby* typ 2 z przeciwciałami anti-D. Wariant D jako *RHD***weak D typ 2* zidentyfikowano za pomocą metod PCR-RFLP oraz AS-PCR. Badania serologiczne takie jak: autokontrola, BTA, eluat, porównanie miana przeciwciał i *score* przed i po autoadsorpcji pozwoliły ustalić, że wykrywane przeciwciała anti-D mają charakter autoprzeciwciał. Doniesienie to po raz kolejny potwierdziło, że przeciwciała anti-D wykrywane u osób *RHD***weak D typ 2* mają cechy

autoprzeciwciał i można im przetaczać krew RhD dodatnią [15].

Piśmiennictwo:

1. Wagner F „RhesusBase v2: a versatile source of information on published RHD alleles”. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
2. Meshi A. Characterisation of antigenicity of an RhD peptide mimotope and assessment of its immunogenicity in HLA-DR15 transgenic mice. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
3. Hall S., Hall M., Pickford J., Vickers A., Urbaniak J., Barker N. Combination peptide immunotherapy suppresses antibody and helper T cell responses to the RhD protein in HLA-transgenic mice. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
4. Hall A.M., Cairns L.S., Altman D.M., Barker N., Urbaniak J. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood* 2005; 105: 2175–2179.
5. Tan J.C.G., Armstrong N.J., Yuan F.F., Flower R.L., Dyer W.B., Capper H. Genetic polymorphisms and immune response pathways associated with different responder profiles of RhD immunized blood donors. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
6. Verduin E.P., Schonewille H., Claas F., Roelen R.L., Doxiadis I.I.N., Brand A. HLA-DRB1*15 is a marker for multiple antibody responders *Vox Sang.*(2013) 105 (supl. 1) 1–64.
7. Hong Y.J., Chang H.E., Hwang S.M. i wsp. Molecular characteristics of partial D in Korea. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
8. Silvy M., Granier T., Beley S., Chiaroni J., Bailly P. First comprehensive investigation of both RHD and RHCE allele distribution in Sub-Saharan Africa: the clinical implications for transfusion medicine. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
9. Hyland A., Gardener J., O'Brien H. i wsp. Managing diverse maternal RHD variants in alloimmunised and non-alloimmunised D negative pregnant women during fetal RHD genotyping. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
10. Trucco Boggione C., Lujan Brajovich M., Tarrago M., Racca A., Muniz-Diaz E., Nogues N., Cotorruelo C. Molecular structures identified in serologically D negative samples of an admixed population. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
11. Veldhuisen B., Thurik F., Jonkers R. i wsp. Molecular RHD variation of serological RhD negative women: implications for a fetal RHD screening programme to target anti-D prophylaxis. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 1–64.
12. Pisacka M., Sklenarova M., Kralova M., Vytiskova J. D VII: the most frequent partial D in Czech population with ‘Hidden Iceberg’ real incidence: Results of a proficiency survey and D Variant Database in UHKT. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
13. Figueiredo M., Chumakova A., Pereira J., Moser M.I., Rodrigues M. Being positive can be negative identification of a partial DIIC. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
14. Polin H., Ulrich S., Lanzer G. i wsp. RHD*WEAK D type 48 is prevalent in Southern Austria. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.
15. Castilho L., Machado D., Torres K.B., Gaspardi A.C., Guelsin G., Pellegrino J. Jr. Anti-D in patients expressing weak D type 2. *Vox Sang.* (2013) 105 (supl. 1) 65–299.