

P r a c a p o g l ą d o w a
Review articles

Grażyna Kuśnierz-Alejska

Antygen D z układu Rh, jego słabe odmiany i kategorie **RhD antigen, its weak expression and categories**

Z Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT w Warszawie
Kierownik: Prof. dr hab. med. B. Żupańska

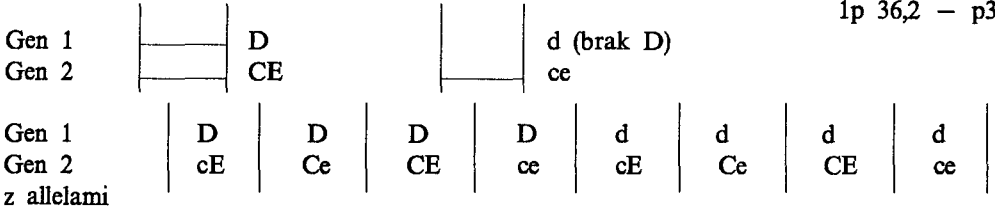
Słowa kluczowe: Układ Rh – Antygen D – Ekspresja antygeny D – Kategorie antygeny D
Key words: Rh System – D antigen – Expression of D antigen – Categories of D antigen

STRESZCZENIE: W pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat układu grupowego Rh krwinek czerwonych, opartą na najnowszych badaniach biochemicznych i genetycznych. Uwzględniono głównie informacje dotyczące antygeny D, jego zróżnicowania ilościowego i jakościowego, a także diagnostyki poszczególnych odmian i kategorii tego antygeny. Równocześnie przedstawiono sposób interpretacji wyników badań serologicznych w odniesieniu do biorców i dawców krwi oraz możliwość wystąpienia konsekwencji klinicznych, związanych z niewłaściwym postępowaniem w poszczególnych przypadkach.

SUMMARY: This review presents current knowledge about Rh blood groups system, based on the latest biochemical and genetical investigations. This paper provides information related to the D antigen, mainly as regards the D weak and D categories. The interpretation of serological results in recipients and blood donors is presented as well as potential clinical complications resulting from improper proceddures.

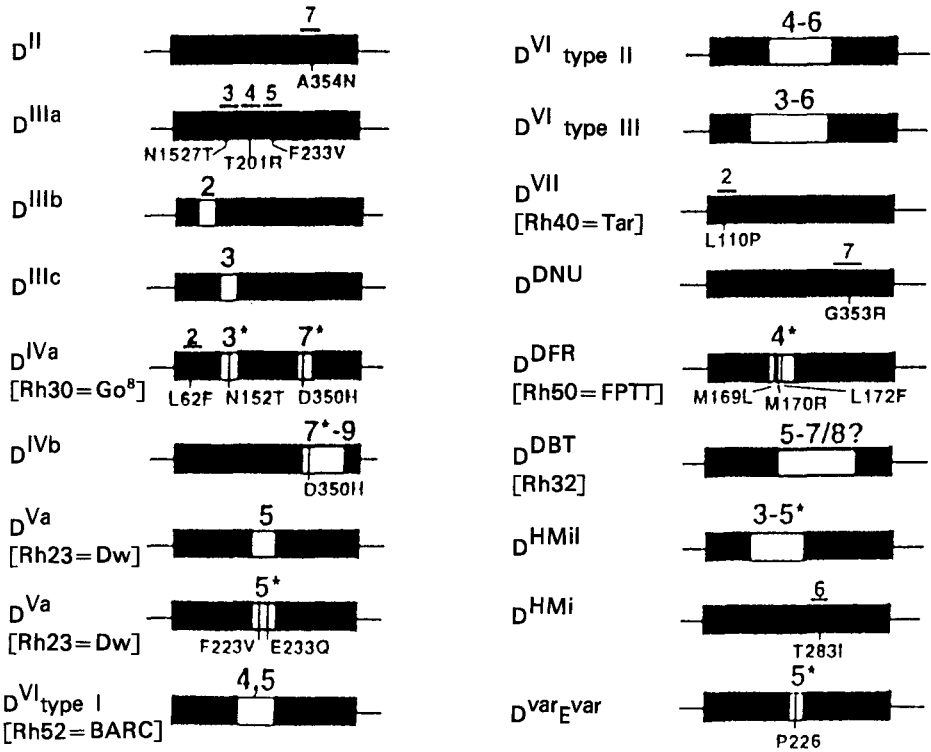
Układ Rh jest największym kompleksem antygenów krwinek czerwonych spośród układów grupowych człowieka. W jego skład wchodzi ich aż 45, są numerowane od Rh1 do Rh52, z wyłączeniem 7 antygenów (1, 4). Spośród znanych 45-ciu: 20 antygenów Rh cechuje polimorfizm w poszczególnych dużych grupach etnicznych (częstość od 1 do 99), 17 antygenów występuje z wyjątkowo niską częstością natomiast 8 z nich zalicza się do antygenów powszechnych.

Badania genomu DNA, metodami biologii molekularnej, wykazały obecność dwóch, w 96% homologicznych, genów strukturalnych Rh na chromosomie 1: RHD i RHCE (rycina 1). Wiadomo już na pewno, że gen d nie istnieje, jednak do tej pory symbol ten jest stosowany i oznacza nieobecność genu D. U osób Rh ujemnych występuje w haplocyocie tylko gen RHCE i jest odpowiedzialny za syntezę antygenów C, c, E, e (poprzez alternatywne wycinanie odpowiednich fragmentów DNA) (2, 4). Wykrywanie i identyfikacja genów Rh nie jest łatwa, ze względu na ich dużą heterogenność. Określanie poszczególnych alleli wymaga stosowania swoistych primerów albo też kombinacji wielu primerów do wykrywania słabych odmian antygeny D, w tym także kategorii antygeny D częściowego, uwarunkowanych powstawaniem hybrid pomiędzy genami RHD i RHCE (rycina 2).



U osób D+ funkcjonują 2 geny
D- funkcjonuje 1 gen

Ryc. 1. Geny Rh
Fig. 1. Rh genes



Ryc. 2. Kompleksy genowe antygenów D częściowych (wg Cartrona)
Fig. 2. Gene complex of partial D antigens (by Cartron)

Nośnikami antygenów Rh są nieglikozylowane białka hydrofobowe, wykazujące pomiędzy sobą bardzo istotną (92%) homologię oraz w 32% identyczne z glikoproteiną Rh50. Rdzeniem kompleksowej błonowej struktury Rh jest tetramer, składający się z 4 jednostek: 2 białek Rh30 (D i nie D) i 2 glikoprotein Rh50. Białko Rh50, którego locus występuje na chromosomie 6, jest odpowiedzialne za ekspresję antygenów Rh. W odróżnieniu od

proteiny Rh30, jest N-glikozylowana i nie posiada antygenów grupowych. Obydwu proteinom towarzyszą łańcuchy współdziałających z nimi glikoprotein CD47, LW i glikoforyny B.

Antygeny układu Rh stanowią integralny składnik błony komórkowej krwinki czerwonej i od nich w dużym stopniu zależy jej prawidłowe funkcjonowanie. W wyjątkowych przypadkach genetycznie uwarunkowanego fenotypu Rh_{null}, charakteryzującego się całkowitym defektem w zakresie antygenów tego układu grupowego, obserwowane jest osłabienie lub całkowity brak antygenów, których nośnikami są glikoproteiny, współdziałające z kompleksem błonowym Rh. Nie zaobserwowano jednak odwrotnej zależności, to znaczy defekty w wymienionych wyżej białkach nie wpływają na ekspresję antygenów Rh. Fenotyp Rh_{null} typu amorficznego uwarunkowany jest brakiem Rh30, natomiast typu regulatorowego — brakiem Rh50. W obydwu przypadkach, u chorych z tak zwanym zespołem Rh_{null}, obserwowane są podobne anomalie hematologiczne i biologiczne, prowadzące do niedokrwistości o różnym nasileniu (1, 4, 8, 9).

Antygen D

Na podstawie obecności lub nieobecności antygeny D na krwinkach ludzkich dokonano ogólnego podziału na osoby Rh dodatnie i Rh ujemne. Z klinicznego punktu widzenia jest to antygen bardzo ważny, gdyż przez swoją znaczną immunogenność wywołuje najczęściej alloimmunizację poprzetoczeniową oraz matczy-no- płodową (4). Na fakt ten nie miały wpływ ma również częstość występowania antygeny D, która w populacjach rasy białej kształtuje się w granicach 82—88%. U osób nie posiadających tego antygeny, a stanowiących około 15% naszej populacji, już u 80% może dojść do odpowiedzi immunologicznej na antygen D w wyniku przetoczenia dużej dawki krwi Rh dodatniej.

Częstość antygeny D u Murzynów afrykańskich dochodzi do 95%, natomiast w niektórych populacjach Dalekiego Wschodu, antygen D występuje niemal w 100% jako antygen powszechny (4, 17). W wyniku rutynowych badań prowadzonych pośród Chińczyków z Hong Kongu oraz Japończyków, tylko u około 3 na 1000 przebadanych osób nie wykrywano antygeny D na krwinkach. W populacjach tych występowała jednak nietypowo zwiększona proporcja niezwykle słabego i nie wykrywalnego w badaniach rutynowych antygeny D_{e1} (17, 19, 20).

Ze względu na duże kliniczne znaczenie antygeny D, w praktyce transfuzjologicznej zwraca się szczególną uwagę na jego rutynowe badanie. W tym celu, szczególnie w badaniach dawców krwi, stosowane są odpowiednio czułe techniki serologiczne oraz właściwie dobrane zestawy odczynników diagnostycznych.

Badania biologii molekularnej potwierdziły wcześniejszą hipotezę, że antygen D jest kompleksem zróżnicowanym zarówno ilościowo jak i jakościowo (1, 4, 18, 21). Wyprodukowanie ponad 150 różnych przeciwciał monoklonalnych pozwoliło na scharakteryzowanie jego 36 epitopów co jednak nie świadczy, że nie istnieje ich więcej.

Ekspresja antygeny D

Ekspresja antygeny D jest uzależniona od liczby miejsc antygenowych. Liczba ta może być różna, określana w zależności od genotypu Rh. Zależy ona również od stosowanych technik oraz rodzaju przeciwciał anti-D używanych do tych badań. Na przykład Scott i inni (21), na krwinkach osób DcE/DcE określali od 15800 do 33000 miejsc antygenowych, natomiast na krwinkach D- liczby te wynosiły 110000 do 202000 (21). Daniels (4) podaje, że badania krwinek z poliklonalnymi znakowanymi radioaktywnie przeciwciałami anti-D wykazały, iż

w przypadkach prawidłowego antygenu D występuje od 9900 do 202000 miejsc antygenowych – najmniej w genotypie DCe/dce a najwięcej na krwinkach osób D⁻/D⁻. Jak już wspomniano wcześniej, proteina Rh50 kompleksu błonowego krwinki jest odpowiedzialna za ekspresję antygenów Rh. Nieobecność proteiny CE na krwinkach D⁻ prowadzi do wyraźnie zwiększonej ekspresji D, ponieważ wszystkie cząsteczki protein Rh50 mogą się łączyć w pary z proteinami RhD. W przypadkach słabego antygenu D (D^u), najwyższe określane liczby miejsc antygenowych to około 9000 natomiast najniższe od 100 do 300 (4, 16). Gorick i inni (6), stosując 7 różnych monoklonalnych przeciwciał anti-D oraz te same krwinki od osoby z genotypem DCe/DcE, uzyskiwali też różne liczby miejsc antygenowych od 8000 do 26000. Podobnie, w badaniach 10 próbek różnych krwinek ze słabym antygenem D za pomocą 3 monoklonalnych przeciwciał anti-D, wyniki wymienionych autorów okazały się różne, ponieważ wykrywali od 170 do 1870 miejsc antygenowych na poszczególnych krwinkach.

Jak wskazują najnowsze badania, ekspresja antygenu D jest w pełni wyrażona już przed 10-ym tygodniem życia płodu, natomiast – co podejrzewano wcześniej – nie występuje w trofoblastcie (1).

Słabe odmiany antygenu D (D^u)

Słabo wyrażony antygen D, w zależności od jego zróżnicowanej ekspresji, może być wykrywany bezpośrednio tylko przez niektóre surowice ludzkie lub monoklonalne odczynniki anti-D. Najślabsze odmiany antygenu D są możliwe do ujawnienia tylko w pośrednim teście antyglobulinowym i przy zastosowaniu surowic anti-D i odczynników monoklonalnych, zawierających przeciwciała IgG, gdyż nie są aglutynowane przez większość odczynników IgM (3, 6, 22). Definicja słabego D, uzależniona od stosowanych odczynników oraz technik badania, utrudnia ustalenie częstości występowania tego fenotypu. Wiadomo, że spotykany jest on częściej w populacjach rasy czarnej niż białej.

Flegel i inni (5) zgłosili wykrycie różnic w sekwencji nukleotydów u analizowanych osób ze słabymi odmianami antygenu D. Autorzy uważają, że sposób współdziałania protein RhD z proteinami Rh50 i rodzaj umocowania tego kompleksu w błonie krwinkowej są konsekwencją obserwowanych zmian molekularnych. Rutynowo, krwinki dawców oraz pacjentów są w wielu krajach badane odczynnikami IgM anti-D w teście aglutynacji. Jako uzupełnienie tych badań, w odniesieniu do dawców krwi, stosowany jest w niektórych ośrodkach pośredni test antyglobulinowy, wykonywany w celu wykrycia słabej ekspresji D. Jeżeli zastosowane są dwa potencjalnie aglutynujące odczynniki IgM, prawie wszystkie przypadki słabego D mogą być ujawnione (21). Tylko krwinki z wyjątkowo słabą ekspresją tego antygenu zostaną określone jako Rh⁻. Fakt ten, według niektórych autorów, jest do zaakceptowania (3, 22), bowiem określenie krwinek z bardzo słabym D jako Rh⁻ u chorych, spowoduje podanie im krwi Rh ujemnej bez żadnego niekorzystnego efektu, natomiast krwinki dawcy z takim fenotypem nie powinny być bardzo immunogenne dla biorców Rh⁻. Przeciwnicy tego poglądu zwracają jednak uwagę na możliwość wystąpienia konsekwencji klinicznych po podaniu krwi nawet z bardzo słabo wyrażonym antygenem D u osób produkujących przeciwciała anti-D, a szczególnie u kobiet ciężarnych (4, 7, 10, 22, 24).

Antygen D, podobnie jak inne antygeny tego układu grupowego, może ulegać depresji w przebiegu białaczki szpikowej i czasami w niedokrwistości autoimmunohemolitycznej (NAIH). Przypadki takie były też obserwowane w Zakładzie Serologii IHiT. U jednej chorej, w ostrej fazie niedokrwistości immunohemolitycznej, antygeny Rh, po stopniowo postępującej depresji, były nawet okresowo niewykrywalne w rutynowych badaniach serologicznych. Fakty te wskazują na konieczność uwzględnienia rozpoznania, przy ocenie wyników słabego antygenu D u chorych.

Antygen D częściowy

Częściowy antygen D charakteryzuje się brakiem jednego lub kilku epitopów, występujących na prawidłowych krwinkach Rh+. W związku z tym osoby z takim fenotypem, określone jako Rh+, mogą wytworzyć alloprzeciwciała anty-D, skierowane do nieobecnych epitopów antygeny D na krwinkach. W takich tylko przypadkach ujawniany był w przeszłości antygen D częściowy. W 1962 roku Tippet i Sanger wyłoniły 6 kategorii częściowego antygeny D, na podstawie badań krzyżowych z różnymi ludzkimi surowicami anty-D (4). Postępujący rozwój badań biologii molekularnej wraz z sukcesywną produkcją dużej liczby odczynników monoklonalnych, skierowanych do poszczególnych epitopów antygeny D, wzbogaciły znacznie wiedzę na temat jakościowego zróżnicowania w zakresie kategorii częściowego antygeny D. W 1996 roku, na podstawie zidentyfikowanych 24 epitopów Rh, został wyselekcjonowany zestaw 9 monoklonalnych odczynników anty-D (5 IgG i 4 IgM), umożliwiający diagnostykę kategorii antygeny D także u osób nie posiadających w surowicy skierowanych do niego przeciwciał. Dotychczas ustalono następujące kategorie częściowego antygeny D: II, IIIa, IIIb, IIIc, IVa, IVb, Va, VI (typ II, typ III), VII, D^{DNU}, D^{DFR}, D^{DBT}, D^{HMI}, D^{HMI}, D^{DHR}, D^{DMH} (4, 5, 11, 14, 15, 19, 22, 25). Obecnie nie jest wyodrębniana kategoria I, ponieważ krwinki takie reagują ze wszystkimi przeciwciałami anty-D, pochodzącymi od osób D+ i D-, z wyjątkiem autologicznych.

Zastosowanie technik biologii molekularnej umożliwiło wyjaśnienie mechanizmów, powodujących tworzenie fenotypów D częściowego (5, 12, 16, 21). Zostały rozpoznane trzy: konwersje genów, delecja i mutacja punktowa. Najczęściej spotykana jest konwersja genów. W okresie mejozy, w następstwie niewyrównania linii chromosomów, może dojść do wymiany jednego lub kilku egzonów między genami RHD i RHCE. Powoduje to pojawienie się nowego genu, kodującego zmieniony polipeptyd. Przy zastąpieniu egzonów RHD przez egzony RHCE, powstałemu w błonie erytrocytów polipeptydowi może brakować niektórych epitopów D. Udowodniono, że na przykład w fenotypie D^{IIIb} nastąpiła wymiana egzonu 2, w D^{IIIc} egzonu 3, w D^{IVb} egzonów 7–9, w D^{Va} egzonu 5, w fenotypie D^{VI}Ce egzonów 4–6. W fenotypie D^{VI}Ce stwierdzono natomiast delecję genu D w zakresie egzonów 4–6. Wymienione mechanizmy mogą również prowadzić do pojawienia się nowych antygenów. Sekwencja aminokwasów w zmienionym polipeptydzie może być immunogenna, zdolna do stymulowania produkcji przeciwciał, rozpoznających nową strukturą proteiny.

Na krwinkach z częściowym antygenem D wykrywane są rzadko spotykane antygeny, jak Go^a w kategorii IV^a, D^w w kategorii D^{Va}, Tar w kategorii D^{VII}, FPTT w kategorii DFR oraz BARC w fenotypie D^{VI}Ce (1, 4, 6, 13, 14, 17, 19, 23, 25). Jak wskazują wymienione fakty i zaawansowane w tym kierunku badania, drogą do określania kategorii antygeny D może stać się wyselekcjonowany panel monoklonalnych przeciwciał, skierowanych do antygenów o bardzo niskiej częstości występowania (21).

Częściowy antygen D może występować także na krwinkach, charakteryzujących się jego słabą ekspresją. Określenie kategorii tego antygeny staje się wówczas bardzo utrudnione.

W populacji europejskiej najczęściej spotykaną kategorią antygeny D częściowego jest D^{VI}, wykrywana przeważnie podczas stwierdzenia w surowicy przeciwciał anty-D (4, 11). Osoby z takim fenotypem, występującym z częstością 0,02 do 0,04%, powinny być zaliczane do grupy Rh minus, gdyż łatwo wytwarzają przeciwciała odpornościowe do nieobecnych na krwinkach epitopów antygeny D. Spośród wysoko aktywnych ludzkich surowic diagnostycznych, około 20 do 35% reaguje z krwinkami D^{VI}, w związku z czym mogą być one oznaczone jako Rh+. Aby temu zapobiec, zestaw odczynników do typowania Rh powinien zawierać przynajmniej jeden odczynnik monoklonalny, nie reagujący z krwinkami D^{VI} (21). Kobiety

z częściowym antygenem D należy objąć profilaktyką konfliktu Rh, ponieważ produkowane przez nie przeciwciała anti-D mogą spowodować chorobę hemolityczną noworodka. Dotychczas nie obserwowano przypadków uodpornienia antygenem kategorii D^{VI} i uważa się, że nie jest on immunogeny. Krew dawców z takim fenotypem można więc bezpiecznie podawać osobom Rh ujemnym, z wyjątkiem osób – szczególnie kobiet, które produkują przeciwciała odpornościowe anti-D. Krwinki dawców z częściowym antygenem D pozostałych kategorii jak również z jego słabą ekspersją jest przeznaczana dla biorców Rh+.

Piśmiennictwo

- Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, Colin Y.: Insights into the structure and function of membrane polipeptides carrying blood group antigens, *Vox Sang*, 1998, 74(2), 29–642.
- Colin Y, Cherif-Zachar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP.: Genetic basis of the RhD-positive and RhD- negative blood group polymorphism, *Blood*, 1991; 78: 2747–2752.
- Contreras M, Knight RC.: Controversies in transfusion medicine. Testing for Du testing: ProTransfusion 1991, 31; 273–277.
- Daniels G.: Rh blood group system, *Human Blood Groups*, Blackwell Science, Oxford, 1995: 257–365.
- Flegel WA Gassner C, Muller TH, Schonitcer D, Schunter F, Wagner FF.: The molecular basis of weak D, *Vox Sang*, 1998, 74, (1), 55.
- Gorick B, McDougall DCJ, Ouvehand WH.: Quantitation of D sites on selected weak D and partial D red cells, *Vox Sang*, 1993, 65: 136–14022.
- Hill Z, Vacl J, Kalasowa E, Calabkowa M, Pintera J.: Haemolytic disease of newborn due to anti-D antibodies in a Du positive mother, *Vox Sang*, 1974 27; 92–94.
- Kuśnierz-Alejska G, Seyfried H, Nowak A, Bodzak J.: Zespół Rhnull – problemy diagnostyczne i terapeutyczne, *Acta Haematol Pol*, 1996; 27: 89–95.
- Kuśnierz-Alejska G, Bugajna I, Olechnowicz J, Wojciechowska B.: Fenotyp Rhnull – obserwacja alloprzeciwciał w przebiegu ciąży, *Acta Haematol. Pol* 1998; 29: 295–299.
- Lacey PA, Caskey CR, Werner D.J, Moulds J.J.: Fetal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh positive Du variant mother, *Transfusion* 1983, 23: 91–94.
- Leader KA, Kumpel BM, Poole GD, Kirkwood JT, Merry AH, Bradley BA.: Human monoclonal anti-D with reactivity against category DVI cells used in blood grouping and determination of the incidence of the category DVI phenotype in the Du population, *Vox Sang* 1990, 58: 106–111.
- Liu W, Smythe JS, Scott ML, Jones JW, Voak D, Avent ND.: Site-directed mutagenesis of the human D antigen: definition of D epitopes on the sixth external domain of the D protein expressed on K562 cells, *Transfusion*, 1999; 39: 17, 25.
- Lomas C, Bruce M, Watt A, Gabra GS, Muller S, Tippett P.: Tar(+) individuals with anti-D, a new category DVII, *Transfusion*, Abstract, 1986; 26: 560.
- Lomas C, Grassmann W, Ford D.: FPTT is a low-incidence Rh antigen associated with a new partial Rh D phenotype DFR, *Transfusion*, 1994; 34: 612–616.
- Lomas C, McColl K, Tippett P.: Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D, *Transfusion Medicine*, 1993; 3: 67–69.
- Lomas C, Tippet P, Thompson KM, Melamed MD, Hughes-Jones NC.: Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories, *Vox Sang*, 1989; 57: 261–264.
- Mak KH, Yan KF, Cheng SS, Yuen MY.: Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens, *Transfusion*, 1993; 33: 348–351.
- Merry KH, Hodson C, Moores S.: Variation in level of Rh(D) antigen expression, *Transfusion*, 1998; 28: 398.
- Okubo Y, Seno T, Yamano H, Yamaguchi H, Lomas C, Tippett P.: Partial D antigens disclosed by a monoclonal anti-D in Japanese blood donors, *Transfusion*, 1991; 31: 782.
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tonuta T, Nagao N.: A D variant D_{ab}, *Transfusion*, 1984; 24: 542.
- Scott ML, Voak D, Jones J, Mushens RE, Carter C, Hughes-Jones NC.: An IgM monoclonal anti-D that detects low grade Du and all categories/variants tested except D^{VI} – superior typing reagent, *Vox Sang*, 1994; 67(2): 52.
- Tippett P, Lomas C, Wallace M.: Partial D antigens; definition of terms of epitopes, *Vox Sang*, 1995.
- Wallace M, Lomas FC, Beckers E, Bruce M, Campbell G, Chatfield. S, Nagao N, Okubo Y, Opalka A, Overbecke M, Voak D.: A partial D phenotype associated with the low incidence antigen Rh 32, *Transfusion Medicine*, 1997; 7: 233–238.
- White CA, Stedman CM, Frank S.: Anti-D antibodies in D- and Du positive women: a cause of haemolytic disease of the newborn, *Am J Obstet Gynecol*, 1983; 145: 1069–1075.
- Yahalom V, Rahimi-Levene N, Shinar E, Tippett P, Lomas C, Poole J, Daniels G, Levene C.: RhD Variants in Israel – 1978–1998, *Blood Transfusion, Abstracts, VI Reg. European Congress ISBT, Israel*, 1999: 68.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.10.1999 r. i została zakwalifikowana do druku 10.12.1999 r.

Adres Autora: Instytut Hematologii i Transfuzjologii; 00-957 Warszawa; ul. Chocimska 5