

Krvná skupina Langereis a naše kazuistiky tehotných žien s protilátkou anti-Lan

Kučeráková Marta¹, Laurincová Mária², Holienková Jana², Písačka Martin³, Králová Miroslava³, Pietrzyková Mária⁴, Babjak Pavol⁵, Marek Lubušský⁶, Libuša Ceizelová⁷, Lenka Matušicová⁷, Zuzana Čináková⁸

1Odd. hematológie a KB FNŠP Žilina, 2NTS SR Žilina, 3NRL pre imunohepatológiu UHKT Praha, 4NTS SR pracovisko Martin, 5Gynekol. odd. FNŠP Žilina, 6Gynekol. klinika FN Olomouc, 7Krvná banka UNB Kramáre, 8DFNSP Kramáre

Úvod: erytrocytový antigén Lan je antigénom s vysokou frekvenciou výskytu v populácii. Lan- fenotyp je v našej populácii zriedkavý. Protilátka anti-Lan patrí do kategórie klinicky významných, môže zapríčiniť hemolytickú potransfúznú reakciu a spôsobiť hemolytickú chorobu plodu a novorodenca. Minulý rok sme na našej ambulancii dispenzarizovali dve tehotné pacientky s touto protilátkou. Keďže skúsenosti s anti-Lan sú v literatúre dokumentované len vo forme kazuistík, sprostredkujeme Vám naše klinické a laboratórne skúsenosti.

História skupinových systémov LAN

Antigén Langereis získal pomenovanie podľa priezviska prvého známeho Lan negatívneho prabanda identifikovaného v r.1962, u ktorého sa po podaní krvi rozvinula ťažká hemolytická potransfúzna reakcia. Lan-fenotyp bol potvrdený aj u jeho brata. V roku 1990 Lan ISBT zaradila do „série“ 901 erytrocytových antigénov s číselným označením 901.002. Krvnú skupinu Langereis (LAN) sa podarilo zafinovať vďaka objasneniu biochemickej podstaty a genetického podkladu, čím získal status skupinového systému v ISBT nomenklatúre LAN (033) v roku 2012 [1, 6, 13].

Terminológia skupinových systému Langereis

ISBT označenie skupinového systému Langereis:

- symbol : LAN
- numerické : 033

Známy je v súčasnosti 1 antigén: LAN1 (033001); iné označenia tohto antigénu: Langereis, Gonsowski (Gn^a), So [1, 6, 13].

Fenotypy LAN

Skupinový systém Langereis zatiaľ rozpoznáva len 1 antigén- Lan, ktorý patrí do skupiny antigénov s vysokou frekvenciou výskytu v populácii, t. j. antigénov nachádzajúcich sa u viac ako 90 %, resp. 99,9 % populácie. Fenotyp Lan- je veľmi zriedkavý, dedičný recesívne a je podmienený nonsense, missence, frameshift a split-site mutáciami (v súčasnosti je známych minimálne 15 *ABCB6* „nulových“ mutácií). Prevalencia Lan- fenotypu v Japonsku je 1 : 50 000, v kaukazskej populácii približne 1 : 20 000, u černochovo v Južnej Afrike 1 : 1 500. Existujú kvantitatívne varianty, tzv. weak Lan, kedy je expresia antigénu veľmi slabá a tento fenotyp môže byť mylne vyhodnotený ako Lan- [7, 17]. McBean v svojej práci opisujú metodiku prietokovej cytometrie, ktorou je možné odlíšenie Lan⁺, Lan⁻, Lan^w fenotypu [10].

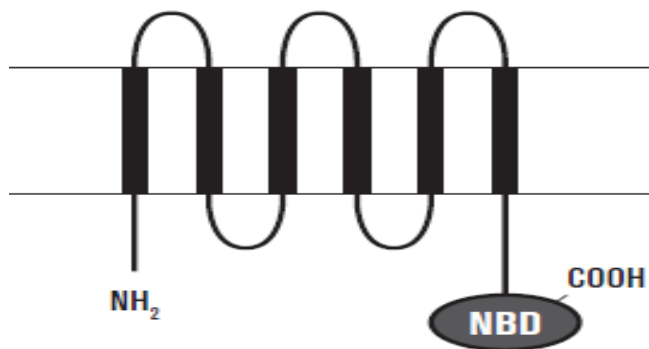
Genetika skupinového systému LAN

- gén pre LAN *ABCB6* je lokalizovaný na 2q36, skladá sa z 19 exónov a má približne 9,2 kb DNA.
- dedičnosť fenotypu Lan- je autozómovo recesívna. Nulové alely pre Lan- sa označujú *ABCB6*01N.01-ABCB6*01N.15*, alely kódujúce Lan weak fenotypy ako *ABCB6*01W.01-ABCB6*01W.04* [1, 14, 18].

Lokalizácia skupinového systému Langereis

Skupinový systém LAN je lokalizovaný na ABC transportnom proteíne, patriacom do podskupiny B (MDR/TAP) s číslom 6 (pre Homo sapiens). V bunkovej membráne sa nachádza ako homodimér, skladá sa z 842 aminokyselín a má približne 80 kDa [1, 12, 20]. Skladá sa z 2 hlavných domén: TMD (transmembránovej) a NBD (nukleotid-viažúcej) (obr.1). Niekoľkokrát prestupuje bunkovou membránou. Sekvencie TMD zodpovedajú substrátovej špecificite transportného proteínu. NBD alebo ABC-binding cassette doména obsahuje

väzbové miesto pre molekulu ATP, ktorú hydrolyzuje. Obsahuje klasické Walker A, Walker B a ABC označené motívy- definované sekvencie aminokyselín.



Obr.1. Molekula ABCB6, NBD- nukleotid viažúca doména [12]

Funkcia ABCB6

ABC proteíny vo všeobecnosti zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovej homeostáze.

- ABCB6 sa významným spôsobom podieľajú na modulácii porfyrínovej koncentrácie v bunkách vo fyziologických i patologických podmienkach. ABCB6 sa nachádza v mitochondriálnej membráne a podporuje vstup porfyrínu do mitochondrií, tým ovplyvňuje syntézu hému a hém obsahujúcich proteínov [4, 9].
- Majú protektívny účinok pred bunkovým oxidačným stresom.

Tkanivová distribúcia ABCB6

- ABCB6 je exprimovaný na povrchu erytrocytov a bol tiež potvrdený v plazmatickej membráne buniek hepatocelulárneho karcinómu.
- Antigény Lan sú dokázateľné aj na pupočníkových erytrocytoch. Pupočníkové erytrocyty majú vyššiu expresiu Lan ako erytrocyty dospelých [7, 17].

Klinický význam LAN

- Fenotyp Lan- nie je asociovaný s chorobnými symptómami.

Protilátka anti-Lan môže spôsobiť hemolytickú potransfúznú reakciu a hemolytickú chorobu plodu a novorodenca.

- Protilátka vzniká imunizáciou v súvislosti s tehotenstvom a po podaní transfúzií. Zatiaľ nebola potvrdená prirodzená nepravidelná anti-Lan.
- Anti-Lan môže spôsobiť hemolytickú potransfúznú reakciu. V r. 2017 napr. Angelina a kol. opísali prípad 83-ročného pacienta s karcinómom žalúdka a so známou aloprotilátkou anti-Lan, u ktorého po podaní všetkých dostupných Lan- erytrocytových TU z dôvodu ťažkého anemického syndrómu pristúpili k hemoterapii Lan+ erytrocytovými TU. Po 6 dňoch mal pacient klinické a laboratórne známky oneskorenej hemolytickej potransfúznej reakcie s poklesom hladiny hemoglobínu zo 109 g/l na 74 g/l, vzostupom hladiny bilirubínu a LDH. Na 8. deň mu podali Lan- erytrocytovú TU s želaným vzostupom Hb na 81 g/l.
- Prvý prípad anti-Lan HChN bol zaznamenaný v roku 1969. Novorodenec mal pozitívny PAT 3+ a ľahkú anémiu. Anti-Lan zvyčajne nespôsobuje závažnú formu hemolytickej choroby plodu a novorodenca (HChP/N), existujú však výnimky. Brooks a kol. zverejnili v r. 2014 kazuistiku hispánskej ženy, u ktorej počas 5. gravidity postupne narastal titer anti-Lan na hodnotu 1:128 (LISS/NAT) a pre známky HChP v 32. t. g. bola podaná 1 x intrauterinná transfúzia Lan- erytrocytovej TU. Gravidita bola ukončená o 25 dní.
- Anti-Lan protilátka spôsobila minimálne u jedného pacienta AIHA s miernou hemolýzou, s pozitívou PAT a s oslabeným fenotypom Lan [6, 8, 11, 15, 16, 18, 19].
- V prípadoch nálezu anti-HFA je často veľmi ťažké vyjadriť sa k potencionalnej klinickej významnosti protilátky. Jednou z metodík, ktorá tomu napomáha, je MMA (monocyte

monolayer assay). Arndt a Garraty retrospektívne zhodnotili výsledky 20-ročného obdobia používania MMA. Došli k záveru, že ak hodnota MMA je nižšia ako 5%, protilátka nie je klinicky významná, ak dosahuje 5,1 až 20% riziko hemolytickej potransfúznej reakcie po podaní inkompatibilnej krvi je asi 1/3 a pri hodnote viac ako 20% asi 2/3 [2].

Požiadavky na transfúziu liečbu:

- pri náleze anti-Lan protilátky so silnou reaktivitou sa odporúča podanie Lan- erytrocytových TU [21]. Pri slabšej reaktivite a nedostupnosti Lan- TU sa môžu podať najmenej inkompatibilné erytrocytové TU [6].

Laboratórna in vitro charakteristika LAN

- **antigén Lan**
 - Tani a kol. izolovali anti-Lan monoklonálnu protilátku (OSK43) v r. 2007 [2, 13].
 - Antigén Lan je rezistentný na opracovanie ficínom/papaínom, trypsínom, α -chymotrypsínom, pronázou, sialidázou, DTT 200 mM.
- **protilátka anti-Lan:**
 - je triedy IgG, obvykle podtriedy IgG1 a IgG3, niekedy IgG2 a IgG4,
 - reaguje v NAT,
 - niekedy viaže komplement [6, 13].

Kazuistika 1: pacientka narodená v r.1983. V r. 2005 jej boli realizované imunohematologické vyšetrenie ako prvodarkyni krvi- nález panreaktívneho skriningu protilátok, v tom čase sa protilátku nepodarilo špecifikovať. Z anamnézy- ako 13-ročná podstúpila appendektómiu s pooperačnými komplikáciami a s nutnosťou podania 3 erytrocytových TU. V r. 2012 bola hospitalizovaná na gynekologickom oddelení pre abort v 7. t. g., v tom čase sa pri vyšetrení krvnej skupiny opakovane potvrdil panreaktívny skrining protilátok.

Imunohematologický nález:

- fenotyp pacientky: O RhD NEG C+ c+E-e+ K- k+ P1- M+ N+ S+ s+ Le(a-b+) Jk(a+b-) Kp(a-b+) Lu(a-b+)Vel+
- panreaktivita séra/plazmy pacientky so všetkými diagnostickými erytrocytami v LISS/NAT/SA (nepriamy antiglobulínový test vyšetrený stĺpcovou aglutináciou v prostredí LISS), v enzýme (papaín, bromelín),
- PAT negat,
- protilátka reagovala s pupočníkovými ery, s DTT a pronázou opracovanými ery,
- protilátka - tepelná, triedy IgG, nonIgG1 a nonIgG3,
- titer 1:16 SA/LISS/NAT,
- **Záver:** susp. anti-HFA

Pre nedostupnosť panelov vzácnych diagnostických erytrocytov sme požiadali o pomoc NRL ÚHKT v Prahe, kde bola diagnostikovaná špecifická protilátka anti-Lan s odporúčením podania Lan- erytrocytových TU v prípade nutnosti hemoterapie.

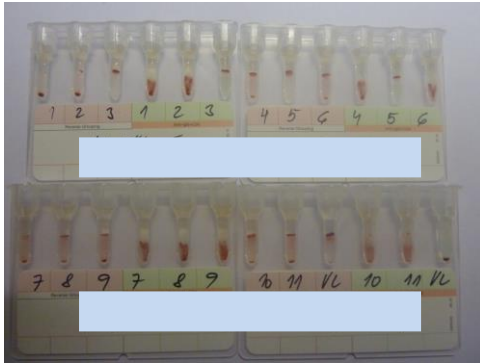
V novembri r. 2013 bola pacientka odoslaná na našu ambulanciu z dôvodu pozitívneho skriningu protilátok v 1.trimestri gravidity, s titrom anti-Lan 1:64 SA/LISS/NAT. Od 19. t. g. titer stúpol na 1:128, od 30 t. g. na 1:256. Pri vzostupe titra protilátky sme zaznamenali „prepnutie“ podtried protilátky na IgG1 pravdepodobne v zmesi s IgG2 a/alebo IgG4. Od tohto momentu sme sledovali aj „selektívny“ titer IgG1, ktorý nedosiahol hodnotu vyššiu ako 1:16 v LISS/NAT.

Vzhľadom k nejasnej klinickej významnosti tohto nálezu bola od začiatku gravidity v sledovaní na ambulancii pre rizikovú graviditu a boli u nej opakovane realizované gynekol. vyšetrenia vrátane monitorovania prietokov v ACM za účelom vylúčenia anémie plodu. V 35. t. g. po príprave ferropreparátmi a vitamínoterapii absolvovala autotransfúzny odber 1 erytrocytovej TU. Pre hraničné hodnoty prietokov v ACM plodu gynekológ odporučil hospitalizáciu pacientky od 36. t. g. V tomto týždni gynekológovia pre abnormálny CTG záznam indikovali ukončenie gravidity S.C.. K pôrodu sme mali k dispozícii len 1 x ery TU. Ako si môžete všimnúť na obr. 2 na konci gravidity sila reaktivity s dg ery s fenotypom E+ č.3. a č.5. bola silnejšia a po adsorbcií na fenotypovo zhodné erytrocyty darcu krvi Lan+ sme dokázali nález anti-E protilátky (obr.2 a obr.3). Podľa dostupných informácií z medzinárodného registra vzácnych darcov krvi sprostredkovaných NRL v Prahe boli najbližšie dostupní vhodní darcovia z USA a z Austrálie...

Pôrod bol komplikovaný pneumothoraxom u novorodenca. Novorodenec mal krvnú skupinu B RhD POZ Lan+, PAT vyšetrený z pupočníkovej krvi bol slabso pozitívny, Hb 110 g/l. Novorodencovi bol podaný IVG

a nevyžadoval výmennú transfúziu ani následnú transfúziu terapiu, nezaznamenal sa významnejší vzostup bilirubínu.

V októbri 2016 u nás pacientka absolvovala imuno hematologické vyšetrenie v 1. trimestri tretej gravidity s úvodným titrom anti-Lan 1:256 a anti-E 1:2. Od začiatku gravidity bola znova dispenzarizovaná na ambulancii pre rizikovú graviditu. V 35. t. g. sa realizoval 1 autotransfúzy odber krvi. Gynekologické vyšetrenia neavizovali morfologické známky HChN, prietoky ACM zodpovedali týždňu vývoja plodu. V čase pôrodu v termíne v 4/17 bol titer anti-Lan SA/NAT/LISS vo výške 1:1024, titer anti-E pre sledovanie na gynekologickej ambulancii sme v tom čase ďalej nevyšetrovali. Dieťa sa narodilo so známkami hemolytickej choroby novorodenca. PAT bol pozitívny a hladina hemoglobínu z pupočníkovej krvi dosahovala hodnotu 74 g/l. Dieťa malo krvnú skupinu O RhD POZ E+Lan+. Prekvapením bol výsledok vyšetrenia eluátu, v ktorom sa potvrdila len anti-E protilátka zodpovedajúca najpravdepodobnejšie za prebiehajúcu HChN.



Obr.2. Reaktivita anti-Lan + E pri vyšetrení SA-LISS/NAT + enzým s ID-DiaPanelom 1-11, 1-11P (dg ery č.3. a č.5. s fenotypom E+)

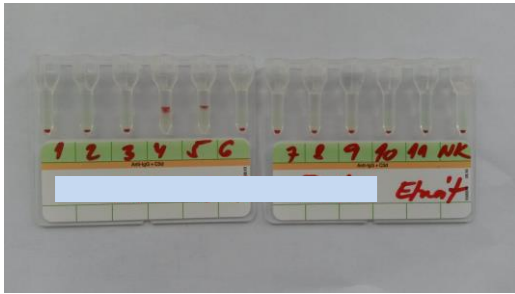


Obr.3. Vyšetrenie podtriedy IgG (vľavo) a titra podtriedy IgG1 anti-Lan

Novorodencovi sa anemický syndróm korigoval podaním 1 erytrocytovej ožiarenej TU pripravenej z autotransfúzneho odberu matky dieťaťa za súčasného podania IVG v dávke 1 g/kg a nasledovala fototerapia (obr.4 a obr.5). Hladina hemoglobínu stúpla po hemoterapii na 110 g/l a následne sa už ďalšie TU nepodávali.

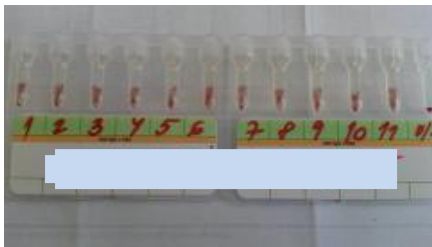


Obr.4. Pozitivita PAT u novorodenca



Obr.5. Reaktivita eluátu s diagnostickým panelom ery- ery č.4. a 5. s fenotypom E+

Kazuistika 2: 25-ročná pacientka k nám bola odoslaná na konzultačné vyšetrenie v 17 t. g. pre panreaktívny skrining protilátok realizovaný v rámci povinných vyšetrení u tehotných. Pacientka rodila 1 x v r. 2015 s väčšími krvnými stratami, s Hb 83 g/l v KO po pôrode. Nikdy nedostávala transfúzie krvi. Anamnesticky bola bez závažnejšieho predchorobia. Laboratórne mala v čase nášho prvovýšetrenia parametre KO v rámci fyziologickej normy. Protilátka vykazovala podobné laboratórne charakteristiky ako boli uvedené pri 1. kazuistike, preto sme vyšetrili erytrocyty tejto pacientky s eluátom pripraveným zo séra pacientky z 1. kazuistiky a sérum pacientky s erytrocytami pacientky z 1.kazuistiky. Obidve reakcie boli negatívne, preto sme predpokladali anti-Lan protilátku. Keďže sme mali k dispozícii len 1 x Lan- erytrocyty, odoslali sme vzorky na vyšetrenie špecificity do NRL UHKT v Prahe, kde bol nález anti-Lan potvrdený(obr.6 a obr.7). Titer aloprotilátky v priebehu celej gravidity dosahoval pri vyšetrení stĺpcovou aglutináciou nízku hodnotu 1:8 v LISS/NAT/SA. Počas hospitalizácie na Gynekol. klinike v UNM sa vykonali 2 x autotransfúzne odbery krvi k zabezpečeniu eventuálnej transfúznej liečby po pôrode v 37. a 38 t. g. Spomínaná prvá pacientka nám prisľúbila v prípade nevyhnutnosti darovanie krvi. Pôrod prebehol bez komplikácií, v termíne, bez nutnosti hemoterapie, dieťa bolo bez klinického a laboratórneho nálezu HChP/N.



Obr.6. Reaktivita anti-Lan pri vyšetrení stĺpcovou aglutináciou v LISS/NAT



Obr.7. Reaktivita anti-Lan pri vyšetrení stĺpcovou aglutináciou v enzýme

Záver: v prípade anti-Lan a vlastne väčšiny anti-HFA aloprotilátok vyšetrených u tehotných pacientiek je často problematické predikovať ich reálny klinický význam pre matku i plod a nie je známa reálna hranica kritického titra. Pri sledovaní pacientov s anti-HFA známej špecificity má vo všeobecnosti svoj význam vyšetrenie triedy a podtried IgG protilátky, kde pri IgG, ktorá nie je podtriedy IgG1 a IgG3 nepredpokladáme hemolytický potenciál. V kazuistike 1, keď došlo k vzostupu titra anti-Lan a nastal switch podtried z nonIgG1 a nonIgG3(vtedy sa predpokladala maximálne zmes IgG2 a IgG4) na IgG1 sa nám osvedčilo sledovanie selektívneho titra anti-IgG1.V každom prípade je potrebné adekvátne zabezpečenie hemoterapie k pôrodu a príprave k eventuálnej výmennej transfúzii a top-up transfúznej liečby u novorodenca. Tieto pacientky by mali byť dispenzarizované na hematologickej ambulancii za účelom promptnej korekcie zmien v krvnom obraze a sledovaní imunohematologického nálezu a v prípade klinicky významných protilátok hlavne na gynekologickej ambulancii s možnosťou sledovania pacientky s podozrením na vývoj HChP/N.

Problematika klinicky významných protilátok u tehotných žien je multidisciplinárna a vyžaduje spoluprácu gynekológa, hematológa a neonatológa. Pri anti-HFA protilátkach sa dostávame pre nedostupnosť vhodných známych darcov krvi často do neriešiteľných situácií, z ktorých sú východiskom v našich podmienkach

autotransfúzne odbery krvi, hľadanie vhodných darcov spomedzi príbuzných pacientov s anti-HFA a kryokonzervácia týchto erytrocytových transfúzných jednotiek. Bohužiaľ na Slovensku nemáme prístup k medzinárodným registrom darcov vzácnej krvi a momentálne je de facto nedostupná možnosť kryokonzervácie krvi....

Použitá literatúra:

1. Angelina, A, Sapatnekar S, Bakdash S. AABB Annual meeting San Diego 2017;CP194: Delayed Hemolytic Transfusion Reaction Due to Anti-Lan Antibody: A Case Report.
2. Arnaud L: Identification of two new blood group systems, Langereis (LAN) and Junior (JR). *Vox Sanguinis ISBT Science Series* 2012; 7:256 – 259
3. Arndt PA, Garratty G: A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion* 2004; 44:1273-81
4. Borst P, Elferink RO: Mammalian ABC transporters In health and disease. *Ann. Rev Biochem.*2002, 71:537-592
5. Brooks S, Squires JE: Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-Lan. *Transfusion* 2014; 54:1317-1320 (ťažká HChN)
6. Daniels G: Human blood groups. 3 rd ed.Oxford: Blackwell Science ltd 2013.
7. Helias et al. : ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies a new blood group system Langeresis. *Nature Genetics* 2012; 44:170-173
8. Heuft HG, Genth R, Wittmann G, Salama A: Alloantibodies Directed against High-Frequency Red Blood Cell Antigens *Infusion Therapy and Transfusion Medicine* 1999; 26:234–239
9. Krishnamurthy P, Schuetz JD: The role of ABCG2 and ABCB6 in porphyrin metabolism and cell survival. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12:647-55
10. McBean RS, Wilson B, Liew Y, Hyland CA, Flower RL. Quantitation of Lan antigen in Lan+, Lan+^w and Lan- phenotypes. *Blood Transfus.* 2015; 13:662 – 665.
11. Page PL: Hemolytic disease of the newborn due to anti-Lan. *Transfusion* 1983; 23:256–257
12. Peyrard P: The Lan blood group system: a review. *Immunohematology* 2013; 29: 131 -134.
13. Reid ME, Lomas-Francis Ch: The Blood Group Antigen FactsBook, 3rd Edition (Factsbook), Boston (MA): Elsevier; 2012.
14. Reid ME, Hue-Roye K, Huang A, et al. Alleles of the LAN blood group system: molecular and serologic investigations. *Transfusion* 2014;54:398–404.
15. Saison C, Helias V, Peyrand T: The ABC6 mutation p.Arg192Trp is a recessive mutation causing the Lan- blood type. *Vox Sang* 2013; 104:156-65.
16. Smith DS, Stratton F, Johnson T, Brwn T, Howell P,Riches R:Haemolytic disese of the newborn caused by anti-Lan antibody. *British Medical Journal* 1969; 3:90-92
17. Storry JR, Qyen R: Variation in Lan expression. *Transfusion* 1999; 39:109-10
18. Tanaka M, Yamamuro Y, Takahashi J, Ogasawara K, Osabe T, Tsuneyama H, Enomoto T, Watanabe S, Uchikawa M, Tadokoro K, Tani Y. Novel alleles of Lan- in Japanese population. *Transfusion* 2014; 54:1438 – 1439.
19. Yoshiharu K: Rare Instance of Anti-Lan Antibody in a Man Lacking Lan Antigen. *Japanese Journal of Transfusion Medicine* 1999; 45:632-635
20. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB6>
21. <http://hospital.blood.co.uk/media/29271/spn2144-the-clinical-significance-of-blood-group-alloantibodies-and-the-supply-of-blood-for-transfusion.pdf>