

**Likheter og ulikheter i mekanismene ved immunisering  
mot de klinisk viktigste alloantigenene hos gravide:  
erythrocyttenes RhD- og trombocyttenes HPA-1a-antigen**



Prosjektoppgave

Stud.med. Anita Fransplass, kull H06

Profesjonsstudiet i Medisin,

Det Medisinske Fakultet, UIO

2011

Veiledere: Professor II Jens Kjeldsen-Kragh og Professor II Hans Erik Heier, Avd. for  
Immunologi og Transfusjonsmedisin, Oslo Universitetssykehus

# Innholdsfortegnelse

1. Innledning .....	1
1.1 Immunisering i svangerskapet.....	1
1.2 Transport av IgG over placenta .....	2
1.3 Føto-maternell blødning (FMB) - blødning fra foster til mor .....	3
1.4 HDN-Hemolytic Disease of the Newborn .....	3
1.5 NAIT- Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia .....	4
1.6 Problemstillinger som belyses i oppgaven .....	4
2. Metode:.....	5
2.1 innhenting av litteratur.....	5
3. Resultater .....	5
3.1 Erytrocytter, Rh-systemet.....	5
3.1.1. Rh-systemets antigener .....	5
3.1.2 Utvikling av anti-D i svangerskapet.....	6
3.1.3 Antigenenes betydning for immunresponsen mot RhD proteinet.....	7
3.1.4 Tettheten av antigener/fosterets fenotype.....	8
3.1.5 HLA klassenes betydning for immunresponsen: genetisk disposisjon .....	8
3.1.6 Induksjon av toleranse for RhD protein.....	9
3.1.7 Fosterets kjønn har betydning for immunresponsen .....	10
3.1.8 ABO systemets betydning for immunisering.....	10
3.2 Trombocytter, HPA (Human Platelet Antigen)-systemet .....	10
3.2.1 Trombocyttenes gener og antigener .....	10
3.2.2 Kilder til føtalt HPA-1a antigen tilgjengelig for det maternelle immunsystemet under graviditet .....	11

3.2.3 HLA-klassenes betydning for immunresponsen: genetisk disposisjon.....	12
3.2.4 Det peptidbindende motivet på HLA-DRB3*0101 molekylet.....	13
3.2.5 Korrelasjon mellom anti-HPA 1a-antistoff og alvorlighetsgraden av NAIT .....	14
3.2.6 Immuniseringstidspunkt .....	14
3.2.7 Fosterets kjønn .....	15
3.2.8 ABO-systemet .....	15
4. Diskusjon .....	15
4.1 Likheter i immuniseringsmekanismene.....	15
4.1.1 Tidspunkt for immunisering.....	15
4.1.2 Både RhD- og HPA-1a bruker HLA-molekyl som restiksjonselement .....	16
4.1.3 Fosterets kjønn av betydning for immunresponsen.....	16
4.2 Ulikheter i immuniseringsmekanismene.....	17
4.2.1 ABO systemets betydning for immunresponsen .....	17
4.2.2 Insidens av immunisering .....	17
5. Referanser.....	18

## Forkortelser

HDN	Hemolytic Disease of the Newborn
NAIT	Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia
HLA	Human Leukocyte Antigen
FMB	Føto-maternell blødning
HPA	Human Platelet Antigen
BCR	B-celle reseptor
TCR	T-celle reseptor
FAB-region	Antigen-bindende region på antistoff
FC-region	Effektor region på antistoff
APC	Antigen-presenterende celle
ST	Syncytiotrofoblast
IG	Immunglobulin
GP	Glykoprotein
CD	Cluster of differentiation
IFN	Interferon
TLR	Toll-like reseptor
AGE	Advanced Glycation Endproduct
SGE	Small for gestational age

---

## Abstract

---

The RhD antigen is clinically the most important human blood group antigen involved in hemolytic disease of the newborn (HDN). Immunization against the human platelet antigen (HPA)-1a is the most common cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT).

Recent studies suggest that the immunization pattern for NAIT is similar to that occurring in HDN. There is a significant correlation between immunization and the presence of HLA restricted T cells in both HPA and RhD. Immunization to RhD is associated with HLA-DQB1\*02:01, and in several studies, alloimmunization to platelet antigen HPA-1a is strongly associated with both HLA-DRB3\*01:01 and HLA-DQB1\*02:01. Severe HDN occur seldom in first born children, and recent studies have found that the incidence of immunization to HPA-1a in primigravidae is lower than previously assumed (-25 %). This may indicate that the primary immune response is established in association with, or after the delivery, most probably due to feto-maternal bleeding, similar to HDN.

Still there are differences. NAIT unlike HDN, more frequently occurs in primigravidae, and anti-HPA-1a is detected at an earlier stage than anti-RhD (week 20 vs week 30). The reason for this might be that the presence of GPIIIa on circulating syncytiotrophoblast (ST) cellular material from placenta, could be the source of HPA-1a alloantigen causing primary immunization of primigravidae early enough for anti-HPA-1a to cause fetal thrombocytopenia during a first pregnancy. The RhD protein is expressed only in human red blood cells, and can enter maternal circulation only by feto-maternal bleeding.

# 1. Innledning

## 1.1 Immunisering i svangerskapet

Cellene i blodet har ulike membranbundne antigen bestående av karbohydrater og/eller proteiner. Antigenene er polymorfe, dvs. det foreligger ulike alleler av genene som koder for dem i befolkningen. Fosteret arver halvparten av genuttrykket sitt fra mor og halvparten fra far. Dersom fosterets blodceller kommer over i kvinnenes sirkulasjon i løpet av et svangerskap, kan hun immuniseres mot antigen på fosterets blodceller som det har arvet fra far, og som kvinnen selv mangler. Dette kalles *alloimmunisering*; kvinnen immuniseres mot antigen fra et annet menneske.

Immunsystemets oppgave er å respondere på tilført antigen og eliminere det som antas å være kroppsfremmed substans, cellebundet eller i løsning. Både Human Platelet Antigen (HPA) på trombocytene og antigener i erytrocyttens Rh-system er proteiner. Det adaptive og medfødte immunforsvaret samarbeider ved initiering av immunresponsen mot proteiner, og består av bl.a. T-celler, B-celler og APC. APC er "profesjonelle" antigen-presenterende celler: dendritiske celler, B-celler, monocytter og makrofager, og er de eneste cellene som konstitutivt uttrykker HLA (Human Leukocyte Antigen)-klasse II molekyler.

Immunresponsen starter i sekundært lymfoid vev som lymfeknuter eller milt. APC tar uselektivt opp antigener via fagocytose og kløyver disse i sine lysosomer til korte peptider på 10-30 aminosyrer. Disse lastes på HLA klasse II molekyler, og HLA-peptid komplekset transporteres så til overflaten av cellen.

En CD4+ hjelpe T-celle som kan gjenkjenne dette komplekset med sin T-celle reseptor (TCR), binder HLA-peptid komplekset, og blir da "primet" ved at den får signal 1. Signal 2 skjer ved at T-cellens CD28 reseptor interagerer med koreseptor CD 80/86 på APC. En naiv T-celle trenger både signal 1 og 2, mens en hukommelses T-celle bare trenger signal 1 for å bli aktivert og proliferere. Fravær av signal 2 fører til at naive T-celler ikke aktiveres, og T-cellen kan forbli ute av stand til å reagere selv om den senere får signal 2. Denne mekanismen er viktig for å unngå immunreaksjon mot kroppsegne celler.

For at APC skal uttrykke et tilstrekkelig antall koreseptorer for å gi signal 2, må den aktiveres. Dette skjer ved at mønstergjenkjennings reseptorer på APC; "pattern recognition receptors" (PPR) gjenkjenner kjemiske strukturer som normalt ikke finnes i kroppen, men som frigis som følge av inflammasjon grunnet infeksjon eller vevsskade som ved hypoksi. Dette omfatter generelle molekylære strukturer eller mønstre som er felles for en rekke mikrober kalt "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs), og endogene "damage-associated molecular patterns" (DAMPs), dvs. intra- og ekstracellulære molekyler som frigis ved celledskade av organismens egne celler.

APC er utstyrt med forskjellige reseptortyper for gjenkjenning av disse komponentene. Toll-like reseptor (TLR) gjenkjenner bl.a. lipopolysakkarid (LPS), dobbeltstrenget RNA og

bakterielt DNA. Karbohydratreseptor gjenkjenner bl.a. mannose-polymerer på overflaten av mikrober, og avfallsreseptor, herunder "Advanced Glycation Endproducts" (AGE) reseptor, gjenkjenner både mikrobielle produkter og organismens egne komponenter. Advanced Glycation Endproducts er den kjemiske beskrivelsen av en modifikasjon som opptrer på alle ekstracellulære makromolekyler på kroppsegne celler, som oppstår ved naturlig aldring, en prosess som akselereres under infeksjon og noen kroniske sykdommer som diabetes.

Når APC gjenkjenner PAMPs eller DAMPs med sin PPR, oppreguleres transkripsjon av genene som koder for HLA klasse I og II molekyl, proinflammatoriske cytokiner som IL1 og TNF- $\alpha$ , chemokiner, og et tilstrekkelig antall CD80/86 reseptorer som fører til at APC kan binde CD28 reseptorer på naive T-celler og gi signal 2.

Etter aktiveringen, blir T-cellene nå i stand til å danne cytokiner som aktiverer og stimulerer proliferasjon av de B-cellene som kan gjenkjenne de samme antigenene på blodcellen med sine B-celle reseptorer (BCR). Etter aktivering av B cellen skjer to viktige ting med BCR; affinitetsmodning av FAB-regionen (antigen-bindende region), og isotypeskifte av FC-regionen (effektor regionen). Denne endres etter signal fra T-cellen via cytokiner, fra membranbunden IgM eller IgD, til antistoff som skilles ut av cellen, dvs. IgA, IgG eller IgE. Etter denne endringen kalles B-cellen nå plasma-celle.

Etter en immunrespons vil det bli dannet hukommelses T- og B-celler. Disse lever lenge, og etterfølgende eksponering av antigen flere år senere, vil kunne gi en rask respons i form av proliferasjon og ekspansjon av antigen-spesifikke kloner og antistoff-produksjon.

## **1.2 Transport av IgG over placenta**

Under svangerskap blir maternelle antistoff av typen IgG transportert over placenta til fosteret via Fc-reseptorer (FcRn) på syncytiotrofoblasten (ST). Dette er en aktiv, hastighetsbegrenset prosess, og kan bare skje fra mor til foster, ikke i motsatt retning. Det finnes fire subklasser av IgG (IgG1, 2, 3 og 4). Den relative konsentrasjonen av immunglobulin i fosterets serum sammenlignet med maternelt serum er 1.77 for IgG1 og 0,99 for IgG2. Dette sammenfaller med observasjoner av at FcRn reseptoren på ST binder IgG1 med en høyere affinitet enn IgG2, og at IgG1 nivået i fosterets serum begynner å stige på et tidligere tidspunkt enn IgG3 (1).

IgG spiller en viktig rolle for fosterets immunforsvar rett etter fødselen. Barnet får en skreddersydd sammensetning av antistoff fra mors (og siden barnets) nærmiljø inntil det selv begynner å produsere antistoff. Men dersom kvinnen har blitt immunisert mot antigen på fosterets uforlikelige blodceller, vil antistoffene kunne bidra til nedbrytning av disse cellene. Manifestasjon av sykdom hos fosteret avhenger av hvilke celler kvinnen blir immunisert mot. I denne litteraturstudien ser jeg på likheter og ulikheter i mekanismene ved alloimmunisering mot de klinisk viktigste antigenene hos gravide: erytrocyttenes RhD- og trombocyttenes HPA 1a-antigen.

### **1.3 Føto-maternell blødning (FMB) - blødning fra foster til mor**

For en RhD-negativ gravid med RhD-positivt foster, er det vist en nær sammenheng mellom påvisbart antall erytrocytter i hennes sirkulasjon ved fødselstidspunktet og muligheten for at hun vil immuniseres og utvikle anti-D. Studier omtalt i kapittel 3.2, tyder på at en immunisering mot trombocyttenes HPA-1a-antigen hyppigst igangsettes ved eller etter nedkomst, mest trolig som følge av en føto-maternell blødning (FMB).

I en undersøkelse av 200 kvinner fant Woodrow mfl. (2) føtale erytrocytter i kvinnens sirkulasjon hos 10 % (19/200) før nedkomst, og 30 % (59/200) rett etter fødsel. Dette resultatet ble bekreftet ved tre serier undersøkelser som hver inkluderte mellom 2000 og 5000 kvinner. Man regner med at det i opptil 50 % av svangerskapene skjer en FMB. Det er en sammenheng mellom insidens av FMB og kvantiteten av blødningen, i form av at insidensen øker med synkende volum av FMB (1).

Woodrow og Finn (3) fant i en studie av 259 RhD-negative gravide at 3,5 % hadde føtale erytrocytter i sin sirkulasjon før nedkomst, tidligst detekterbart i uke 30. Ved nedkomst hadde 19,8 % (137/692) hatt FMB, og disse kvinnene hadde en kvantitativt større FMB. De fant ingen forskjell i insidens av FMB mellom førstegang- og flergangsgravide. Med andre ord, faren for FMB øker med svangerskapets lengde, og størst i forbindelse med fødsel. FMB er også kvantitativt størst ved nedkomst. På bakgrunn av dette konkluderte de med at RhD-immunisering hyppigst skjer postnalt fordi større mengder føtalt blod når mors sirkulasjon ved nedkomst enn i svangerskapet.

Risiko for FMB øker ved komplikasjoner i forbindelse med svangerskap eller nedkomst. I første og andre trimester er dette knyttet til invasive obstetriske prosedyrer som amniocentese, abort og ektopisk graviditet. Ved nedkomst er det vist at keisersnitt og manuell uthentning av placenta øker både insidens og kvantitet av FMB sammenlignet med kvinner som har en ukomplisert/normal nedkomst (4). FMB >50 ml oppstår svært sjelden, dvs. i 1/1000 av nedkomstene. I over 50 % av disse er det ingen kjente risikofaktorer for FMB. Noen tilfeller er relatert til maternal abdominal/bekken traume, placentalt chorioangiom eller uterint choriocarcinom (1).

### **1.4 HDN-Hemolytic Disease of the Newborn**

Klinisk manifestasjon av Hemolytic Disease of the Newborn (HDN) spanner fra asymptomatisk mild anemi til føtal hydrops eller dødfødsel assosiert med alvorlig anemi. Før fødselen vil bilirubinet som frigis ved hemolyse av erytrocyttene passere placenta, og bli konjugert og utskilt av mor, men hos nyfødte vil leverens konjugeringskapasitet lett overskrides, og ukonjugert bilirubin kan avleires i basalgangliene og føre til varig hjerneskade eller død (kjerneicterus). HDN var en signifikant årsak til føtal sykdom og dødelighet inntil etablering av rutinescreening, profylaktisk anti-IgG injeksjoner, samt antenatal og perinatal behandling for disse alvorlig alloimmuniserte kvinnene og deres fostre (5).



## **1.5 NAIT- Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia**

Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (NAIT) er en tilstand der maternelle allo-antistoff binder seg til fosterets trombocytter i løpet av svangerskapet. Dette reduserer trombocyttenes overlevelse, fordi antistoffet induserer nedbrytningsmekanismer hos fosteret, og fosteret står da i fare for å få blødninger. Normale plateverdier hos nyfødte er  $150-450 \times 10^9/L$ , trombocytopeni foreligger ved plateverdier  $<150 \times 10^9/L$ , og alvorlig trombocytopeni ved platetall  $<50 \times 10^9/L$  (6).

NAIT er en sjelden men potensielt alvorlig tilstand som estimert rammer 1/ 1000 – 1/2000 nyfødte pr. år, som tilsvarer 30-60 barn i Norge hvert år (7). Immunisering mot HPA-1a er den vanligste årsaken til alvorlig NAIT hos kaukasoide (85 %), mens 6-15 % er forårsaket av antistoff mot HPA-5b. Andre HPA antigen står for noen få prosent (8).

NAIT kan utvikles in utero, men i de fleste tilfellene diagnostiseres sykdommen etter fødsel på grunnlag av klinisk manifestasjon eller et tilfeldig funn av lavt antall trombocytter (9). Det kliniske bildet av alvorlig NAIT er typisk generaliserte petekkier som utvikles minutter til timer etter fødsel, hematomer, blødning fra øvre GI traktus, øvre luftveier eller urinveier. Mest fryktet er hjerneblødning som kan føre til varige nevrologiske skader eller død. Hjerneblødning er blitt rapportert å opptre i 7-26 % av NAIT, med et fatalt følge i ca 1/3 av tilfellene (7).

Til forskjell fra HDN har man i dag hverken rutinescreening eller konsensus for optimal antenatal- eller preventiv behandling av NAIT. For å kunne utvikle rasjonell og effektiv behandling er det essensielt å kjenne til immuniseringsmekanismene og årsaken til at denne sykdommen opptrer.

## **1.6 Problemstillinger som belyses i oppgaven**

I denne litteraturstudien skal jeg belyse ulike trinn i immuniseringsmekanismen mot erytrocyttens RhD- og trombocyttenes HPA-1a-antigen hos gravide som utsettes for fosterets uforlikelige blodceller, sammenligne disse mekanismene og diskutere likheter og ulikheter.

Til tross for kjent eksponering for antigen, varierer immunresponsen mellom gravide. Jeg skal belyse i hvilken grad variasjonen er en følge av forhold som antigenenes immunogenitet, mengden antigen mottaker av uforlikelige blodceller eksponeres for, genetisk disposisjon hos mottaker eller om forhold ved fosteret spiller inn.

## 2. Metode:

### 2.1 innhenting av litteratur

Denne oppgave er gjennomført som en litteraturstudie. Søkene er gjort i Medline via PubMed, begrenset til artikler med engelsk eller norsk språk. Ingen begrensning er gjort med tanke på publikasjonstidspunkt, da mye av kunnskapen om RhD immunisering er fra 60 og 70 årene, før innføring av profylaktisk behandling av RhD-negative gravide.

#### *Hovedsøk 1:*

Søkeord: (hpa 1a OR 1a alloantigen human OR human platelet antigen) AND immunization AND pregnancy

Resultat: 73 treff, hvorav én oversiktsartikkel som omhandlet screening .

#### *Hovedsøk 2:*

Søkeord: (rho d antigen OR rhd) AND immunization AND pregnancy.

Resultat: 63 treff, hvorav 22 oversiktsartikler.

Artiklene ble valgt ut på abstract- eller tittel nivå, etter vurdering av relevans for problemstillingen. I tillegg har en viktig kilde vært artikler som har vært referert i artikler fra hovedsøket, samt artikler anbefalt av veilederene.

I innledningen som inneholder bakgrunnskunnskap for forståelse av immuniserings mekanismer hos gravide, har jeg brukt ulike bøker og artikler, se referanselisten. I resultatdelen har jeg så langt det har vært mulig forholdt meg til originalartikler i fulltekst.

## 3. Resultater

### 3.1 Erytrocytter, Rh-systemet

#### 3.1.1. Rh-systemets antigener

Rh-systemets antigener finnes bare på erytrocytter. De er produkter av to gener som ligger på kromosom 1. Disse genene er tett koblet og kalles *RHD* og *RHCE*, og koder for henholdsvis blodtypeantigenene D og CcEe. Individ med D-positive erytrocytter har både *RHD* og *RHCE* gener, mens de fleste med D-negative erytrocytter har bare *RHEC* genet, oftest grunnet en komplett delesjon av *RHD* genet. *C* er antitetisk til *c*, *E* til *e*, dvs. man arver enten *C* eller *c* og enten *E* eller *e* fra hver av sine foreldre. Fravær av D, markeres ofte med d (1,10).

RhD-proteinet er et ikke-glycosylert transmembrant protein på om lag 30 kDa. Det består av 417 aminosyrer med 12 transmembrane domener og 6 ekstracellulære looper(3).

Antigenene er til stede i erythrocyttens cellemembran som tetramerer eller trimolekylære komplekser, der to kopier av D proteinet assosierer med to kopier av CcEe proteinet. D-antigenet er det mest immunogene (etter ABO) antigenet på erythrocyttene (10).

17 % av norske gravide er RhD-negative, dvs. de mangler *RHD* genet som koder for D-proteinene. Dette gjør at RhD-negative som bærer et RhD-positivt foster står i fare for å bli immunisert. 83 % av fedrene er RhD-positive, hvorav 35 % er DD og 48 % er Dd. Alle barna til den homozygote faren, og halvparten av barna til den heterozygote faren vil da være RhD-positive. I omtrent 10 % av alle graviditeter vil derfor en RhD-negativ kvinne bære et RhD-positivt foster. Uten Rh profylakse er sjansen for immunisering av disse kvinnene 13,2 %. Dette betyr at uten profylaktisk behandling vil ca. 1 % av alle gravide immuniseres mot RhD og begynne å produsere anti-D pr. svangerskap (1,11).

### 3.1.2 Utvikling av anti-D i svangerskapet

I en undersøkelse av 2000 RhD-negative førstegangsgravide fant Tovey mfl. (12) antistoff hos ca 1 % (19/2000) av kvinnene, hvorav 0,4 % (7/2000) hadde detekterbare antistoff ved 34 uker og 0,6 % (11/2000) ved nedkomst. Ingen hadde detekterbare antistoff ved 28 uker. Dette tyder på at når anti-D utvikles under det første svangerskapet skjer dette hyppigst i løpet av de siste ukene. Dette samsvarer med tidspunkt for FMB, som også opptrer svangerskapets siste del.

Antall personer som immuniseres som følge av uforlikelige erythrocytter, er større ved transfusjon enn ved graviditet (10). Ser man på alvorlighetsgraden av HDN hos det først affiserte barnet (oftest svangerskapet etter en immunisering), blir disse barna oftere hardere rammet hos transfunderte mødre enn hos mødre som blir immunisert i løpet av et svangerskap. Det kan derfor tyde på at transfusjon er et mere immuniserende stimulus enn en liten FMB, trolig fordi kvinnene eksponeres for et større volum blodceller samt at disse erythrocyttene ofte er ABO-kompatible (1).

Ved en studie i 60 årene fikk RhD-negative kvinner injisert D-positive erythrocytter. Det må understrekes at av etiske hensyn ville denne typen undersøkelse ikke funnet sted i dag. De fant at kvinnene som dannet anti-D, også tenderte til å danne andre alloantistoff utenfor Rh systemet, mens kvinnene som ikke dannet anti-D, sjeldent dannet alloantistoff i det hele tatt. I en serie fant de at 73 kvinner dannet anti-D, 6 anti-Fy(a), 4 anti-Jk(a) og 4 dannet andre antistoff. De 48 som ikke dannet anti-D, dannet heller ingen andre målbare alloantistoff (1).

Ved en enkel transfusjon av relativt store mengder RhD-positive erythrocytter (200 ml el mer) til en RhD-negativ mottaker, vil ca. 85 % immuniseres, og 15 % vil ikke danne anti-D. Etter ytterligere transfusjoner av RhD-positive erythrocytter vil om lag halvparten av disse 15 % ikke danne anti-D, og betegnes da som ikke-responderende. Det er mulig at denne manglende evnen til å danne anti-D kunne skyldes genetisk nedarvede ulikheter i HLA-molekylet, da binding mellom peptid og HLA-klasse II molekyl avhenger av hvor godt peptidet passer i den

peptidbindende grop på HLA molekylet, og vil influere på hvor godt disse evner å stimulere T-cellene (10).

### 3.1.3 Antigenenes betydning for immunresponsen mot RhD proteinet

Ser man bort fra ABO systemet, er RhD-antigenet signifikant mer immunogent enn andre av erythrocyttens blodgruppe-antigener. En del av forklaringen på dette mener Urbaniak mfl. er måten antigenet blir sett av immunforsvaret, dvs. antigenets molekylære struktur, orientering i membranen samt den cellulære immunresponsen på proteiner (10).

#### *T-celle epitoper:*

T-celle reseptoren (TCR) er membranbundet og kan bare gjenkjenne lineære antigen presentert på HLA-klasse II molekyl på APC. I teorien skulle ethvert lineært peptid derivert fra D-antigenet og som inneholdt en D-spesifikk aminosyre, kunne stimulere T-celler. Men en analyse av disse T-celle-epitopene viste at kun et relativt lite antall av peptidene var i stand til å utløse immunrespons. For å identifisere de alloreaktive epitopene på RhD-proteinet, undersøkte man T-cellerresponsen til 22 alloantistoff-positive RhD-negative donorer og 8 alloantistoff-negative RhD-negative i en kontrollgruppe. T-celler fra kvinnene ble høstet og stimulert med 68 ulike peptider. Disse peptidene overlappet hverandre og spente over hele RhD- proteinet. Ett eller flere av disse peptidene gav en respons hos alle de 22 alloantistoff-positive donorene mot 2 av de 8 alloantistoff-negative i kontrollgruppen. 4 av disse 68 peptidene (RhD 52-66: peptid 6, RhD 97-111: peptid 13, RhD 117-131: peptid 17 og RhD 177-191: peptid 28) gav en respons hos over 50 % av de alloantistoff-positive. (Av disse igjen gav peptid 6 og 17 en respons hos 65 %). Med andre ord er det kun et relativt lite antall peptider som induserer en respons hos T-cellene. Videre er disse 4 sekvensene av RhD proteinet lokalisert både ekstra- og intracellulært samt transmembrant. Dette understøtter at peptidene må bli behandlet av APC før de kan stimulere T-celler (13).

#### *B-celle epitoper:*

Antistoff foreligger i to former, membranbundet til naive B-celler som B-celle reseptor (BCR) (IgD og IgM), eller som fritt løselig immunglobulin (Ig) i serum, secernert fra plasmaceller (IgG, IgA, IgM og IgE). Antistoff gjenkjenner og binder konformasjonsepitoper, dvs. er avhengig av tredimensjonal struktur av antigenet. Konformasjonsepitoper dannes av aminosyrer som sitter langt fra hverandre i den primære aminosyresekvensen som kommer tett sammen pga. folding av peptidet.

D proteinet skiller seg fra CcEe proteinene med 35 aminosyrer. 7 av disse D-spesifikke aminosyrene er lokalisert ekstracellulært (posisjon 103, 169, 226, 233, 238, 353 og 354), hovedsakelig i loop 3, 4 og 6, og følgelig er kun disse polymorfe setene tilgjengelig for binding av anti-D på intakte erythrocytter. Studier viser at B-cellene kan gjenkjenne en mosaikk på minst 37 ulike (overlappende) epitoper, dvs. en enkelt aminosyre substitusjon kan affisere mer enn en epitop (10). Ser man på C og c proteinene, skiller disse seg fra

hverandre med kun 4 aminosyrer, E og e med kun en, noe som kan tenkes å redusere den potensielle immunogeniteten.

### **3.1.4 Tettheten av antigener/fosterets fenotype**

Tettheten av RhD-antigen på erythrocyttens overflate varierer mellom ulike fenotyper.

Fenotypen D<sub>Ce</sub>/d<sub>ce</sub> har 9900-14600 RhD-antigen, D<sub>ce</sub>/d<sub>ce</sub>: 12 000-20 000, D<sub>cE</sub>/d<sub>ce</sub>: 14 000-16 000, D<sub>Ce</sub>/D<sub>Ce</sub>: 14 500-19 300, D<sub>Ce</sub>/D<sub>cE</sub>: 23 000-21 000 og D<sub>cE</sub>/D<sub>cE</sub> har 15 800-33 300 (1).

Tettheten av antigener på overflaten av erythrocyttene har trolig betydning for hvor kraftig immunresponsen blir. R<sub>2</sub> fenotypen (D<sub>cE</sub>) som er den fenotypen med høyest antall antigen på overflaten, er mer effektiv i å indusere dannelse av anti-D enn andre D-fenotyper når mottaker projiseres for små mengder erythrocytter. Men dette er bare en delvis forklaring, da Kell er mer immunogent enn Duffy eller Kidd, til tross for at denne har færre antigen på overflaten pr. erythrocytt (10).

Det er vist at nyfødte med fenotypen R<sub>2</sub>r (D<sub>cE</sub>/d<sub>ce</sub>), er mer effektive i å immunisere sine mødre mot RhD enn nyfødte med andre fenotyper (1). Dette samsvarer med studier der man har injisert RhD positive erythrocytter av ulike fenotyper og siden undersøkt hvem som dannet anti-D. Av dem som mottok 1 ml blod i månedlige intervaller i et år, dannet kun 30 % anti-D av dem som mottok D<sub>Ce</sub>/d<sub>ce</sub> mot 84 % av dem som mottok D<sub>cE</sub>/d<sub>ce</sub> erythrocytter. Det er videre vist at når D<sub>cE</sub>

D<sub>Ce</sub>/d<sub>ce</sub> transfunderes i relativt store volum, er det like effektive i å indusere en immunrespons som andre fenotyper (1). På bakgrunn av disse funnene kan man slutte at for RhD-systemet er immunogeniteten ved små volum av FMB assosiert med tettheten av RhD-antigen på erythrocyttens overflate, dvs. fosterets fenotype, mens denne forskjellen utjevnes når store volum overføres.

### **3.1.5 HLA klassenes betydning for immunresponsen: genetisk disposisjon**

HLA molekylene deles inn i to klasser: HLA klasse I og II. HLA klasse I molekylet finnes på alle kjerneholdige celler, mens HLA klasse II bare uttrykkes konstitutivt på antigenpresenterende celler. Innenfor hver klasse av HLA molekyler finnes det ulike serier. Innen HLA klasse II finnes HLA-DR-, DQ- og DP- seriene, og hver serie består av over 1500 varianter. Hvert individ har flere varianter av HLA molekylet fra hver serie, og da det finnes en lang rekke varianter HLA molekyler, har ubeslektede individer nesten alltid ulike HLA molekyler. HLA klasse II molekylene kodes av gener som sitter tett sammen på den korte armen av kromosom 6.

Bindingen av peptider til ulike HLA klasse II molekyler avhenger av hvor godt peptidene passer den peptidbindende gropa på molekylet. Den eksakte topografien til de ulike HLA molekylene varierer, og hvert enkelt molekyl har sine spekter med peptider de binder bedre enn andre. Ulike peptider har evne til å passe i mange ulike HLA typer. Dette betyr at evnen til å binde ulike peptider er bestemt genetisk (10,13).

Flere forskere har funnet en mulig sammenheng mellom alvorlig RhD-immunisering med høye titer av anti-D og bestemte HLA molekyler. Hilden mfl. (14) undersøkte serum fra 24 RhD-immuniserte kvinner i form av måling av antistoff titer, samt identifisering HLA-DR og DQ polymorfismer. Av de 13 med anti-RhD-titer over 512, hadde 11/13 dvs. 85 % HLA-DQB1\* 02:01. Av de resterende 11 kvinnene med et lavere antistoff titer (16-256), hadde 18 % HLA-DQB1\* 02:01, som var ekvivalent med kontrollgruppen. De konkluderte med at det var en statistisk signifikant sammenheng ( $p < 0,005$ ) mellom tilstedeværelsen av HLA-DQB1\* 02:01 og alvorlig RhD immunisering med høye titer av anti D antistoff og HDN. På bakgrunn av dette kan en tenke seg at HLA fenotyping av gravide kan være et nyttig bidrag i arbeidet med å identifisere foster i risiko for å utvikle alvorlig HDN for kvinner som får påvist anti-D tidlig i graviditeten.

### **3.1.6 Induksjon av toleranse for RhD protein**

Regulatoriske T-celler er viktige for kontroll av immunresponsen, og har sin virkning gjennom produksjon av cytokiner som IL-10 og TGF $\beta$ . Aluvihare mfl. (15) viste i sin studie av mus at det foreligger en alloantigen-uavhengig, lokal (uterus) og systemisk ekspansjon av maternale CD4+CD25+ regulatoriske T-celler under svangerskapet. I tillegg til deres suppresserende funksjon av en autoimmun respons, vil maternelle T-celler også kunne suppressere en aggressiv allogenisisk respons direkte mot fosteret.

Kontroll av en etablert immunrespons mot RhD er lite studert. Regulatoriske CD 25+ celler er blitt identifisert som hemmer av allogene reaksjoner via produksjon av IL 10 som synes å "slå av" en antistoff respons in vivo (10). Som forklart under punkt 1.1, er initiering av IgG produksjonen av B-celler avhengig av hjelp fra T-cellen, som først må gjenkjenner korte antigen-deriverte peptider presentert av APC, før de selv blir aktivert og kan stimulere B-celler. Det er nå klart at konteksten en slik gjenkjennelse finner sted i, bestemmer om en bestemt immunrespons blir aktivisert eller suppressert. Hall mfl. (16) utviklet en HLA-DR15-transgen humanisert muse-modell som viser en rekke likheter med human IgG respons på RhD-proteinet. Syntetiserte peptider av de fire potente T-celle epitopene (peptidene RhD (52-66), (97-111), (117-131) og (177-191)), ble gitt via nasal mucosa før musene etter to uker ble immunisert med RhD protein. De fant at ved nasal administrasjon av disse peptidene ble en toleranse for hele antigenet induert. Evnen til å kunne induere en slik toleranse kan tilskrives aktive mekanismer som immunregulering, hemming av T-celler og mulig stimuleringen av regulatoriske T-celler. Viten om disse cellenes evne til å induere en toleranse for RhD-peptidene kan i fremtiden gi oss muligheter til å kunne tilby peptid-immunoterapi som et alternativ til immunglobulin som pr i dag er profylaktisk behandling av HDN. Mucosal administrasjon av T-celle epitoper er tidligere forsøkt på modeller for å induere systemisk toleranse for antigen ved transplantasjon, astma og autoimmune sykdommer.

### **3.1.7 Fosterets kjønn har betydning for immunresponsen**

Allerede i 1957 ble det rapportert av Walker og Mollison at maternal immunisering affiserer guttefoster i større grad enn jenter. Studier viser at kvinner som bærer guttefoster har en høyere sannsynlighet for å bli immunisert mot RhD-proteinet enn kvinner som bærer jentefoster, og i ulike studier der gravide er blitt immunisert, har man funnet en odds ratio Gutter/Jenter; 1,44:1, kontrollgruppen 1,05:1(17). To andre studier har gitt ratioene 1,74:1(18) og 1.5:1 (19).

Ulm mfl. (20) foretok en retrospektiv studie av 104 RhD-negative mødre med RhD-positive foster, hvorav 51 var gutter og 53 jenter. Av fostrene til kvinnene med maternelt anti-D-titer >16, fant de at guttene i større grad ble affisert av maternell immunisering, og trengte mer intensiv behandling enn jentene. Odds ratio for utvikling av hydrops hos guttefostrene var 13.1 (95 % CI 2.69-63.6; p=0.001). Årsaken til dette er ukjent, men på bakgrunn av transplantasjonsstudier som viser at mannlige mottagere tolererer kvinnelig vev godt, men at kvinnelige mottakere av mannlig vev tendere å frastøte seg dette, postulerte de at guttefostre i større grad enn jentefostre blir forkastet av gravide (21).

### **3.1.8 ABO systemets betydning for immunisering**

Flere studier har pekt i retning av at ABO-inkompatibilitet beskytter mot RhD-immunisering. Dersom en RhD-negativ kvinne bærer et ABO-kompatibelt RhD-positivt foster, er risikoen for immunisering 16 %, sammenlignet med et ABO-inkompatibelt RhD positivt foster der risikoen for immunisering er kun 2 % (1). Det er blitt estimert at gruppe-A-inkompatibilitet mellom mor og foster gir 90 % beskyttelse, mens B-inkompatibilitet gir 55 % beskyttelse (1,22).

Når barnet er ABO-inkompatibelt er det funnet både kvantitativt færre erythrocytter i maternell sirkulasjon, og FMH hos færre kvinner enn når barnet er ABO-kompatibelt. Woodrow og Donohoe (23) undersøkte serum hos 2029 ABO-kompatible, og 417 ABO-inkompatible førstegangsfødende etter nedkomst. De detekterte erythrocytter hos 24,7 % av ABO-inkompatible kvinner, vs 56 % av ABO kompatible kvinner. Videre viste studiene at ved ABO-inkompatibelt var antallet erythrocytter i maternell sirkulasjon lavt sammenlignet med ABO-kompatibilitet. Eksempelvis hadde kun 1,9 % av de ABO-inkompatible mødrene 0,1 ml føtalt blod i sin sirkulasjon, mot hele 18.5 % av de ABO-kompatible. Årsaken til dette er trolig at kvinnen vil ha naturlig forekommende antistoff i serum rettet mot ABO-blodtypeantigener hun selv mangler. Da anti-A og anti-B hovedsaklig er av IgM-isotype aktiverer de kompliment via klassisk vei, og når anti-A eller anti-B binder seg til antigenene på fosterts uforlikelige erythrocytter, vil de forårsake lysering av cellen. Erythrocyttene elimineres da raskt fra maternell sirkulasjon, før en immunrespons mot RhD igangsettes.

## **3.2 Trombocytter, HPA (Human Platelet Antigen)-systemet**

### **3.2.1 Trombocyttenes gener og antigener**

Trombocyttspesifikke alloantigen kalles HPA (Human Platelet Antigen) når den molekylære strukturen er definert. De fleste tilfellene av NAIT er en følge av inkompatibilitet i HPA-1

systemet mellom den gravide og fosteret. HPA-1 genet har to alleler, HPA-1a og HPA-1b, som koder for antigen med samme navn, der HPA-1a er mest vanlig. HPA-1 polymorfismen er resultat av en substitusjon av et enkelt basepar i det kodende DNA i posisjon 33, som koder for leucine i HPA-1a og prolin i HPA-1b. Hos 98 % av kaukasoide er HPA-1a til stede, 27 % har HPA-1b, og 2.1 % er homozygot for HPA-1bb (9). Ved uforlikelighet vil i snitt ca 10 % av de som er homozygot for HPA-1bb, dvs. HPA-1a negativ, danne antistoff mot fosterets HPA-1a positive trombocytter pr. svangerskap (7).

HPA er lokalisert på ulike glykoprotein (GP) uttrykt i trombocyttenes cellemembran. Pr 2005 var 24 slike trombocyttspesifikke antigen definert, 12 av disse gruppert i seks bialleliske systemer: HPA 1, -2, -3, -4, -5 og -15. For de 12 andre antigenene er det kun funnet alloantistoff mot det proteinet som kodes av det ene allelet. For 22 av de 24 antigenene er den molekylære strukturen definert. I alle unntatt én er ulikheten mellom dem én enkelt aminosyre substitusjon, hovedsaklig forårsaket av én enkel nukleinsyre polymorfisme i genene som koder for det aktuelle GP (1).

Trombocytterne har også noen antigen til felles med andre celler. Dette er HLA klasse I, samt noen av erytrocyttenes antigen: ABO, Lewis, I, i og P (1).

### **3.2.2 Kilder til føtalt HPA-1a antigen tilgjengelig for det materielle immunsystemet under graviditet**

Placentas syncytiotrofoblaster (ST) danner barrieren mellom føtalt og maternelt vev. Disse ST er lokalisert på placentas chorionvilli, og er i direkte kontakt med maternelt blod fra de første ukene av svangerskapet til nedkomst. Kumpel mfl. (24) gjorde en studie hvor de inkuberte 6 placentaer med anti-GPIIIa både i første trimester og ved termin. De fant at mikrovilli på den apikale overflaten av ST ble dekket med disse monoklonale anti-GPIIIa, men ikke av en isotype antistoff kontroll. De konkluderte at GPIIIa var uttrykt på mikrovilli på den apikale overflaten av ST. Denne lokalisasjonen tyder på at GPIIIa kan bli tilgjengelig for det materielle immunforsvaret via andre mekanismer enn FMB, og kan på denne måten muligens forårsake antenatal alloimmunisering og antenatal utvikling av anti-HPA-1a og NAIT hos HPA-1a-negative gravide.

Cellefragmenter av ST blir i alle graviditeter kontinuerlig støtt ut i maternelt blod, og kan detekteres i maternell sirkulasjon (ca 3 gram pr dag ved termin). Disse cellefragmentene stammer hovedsaklig fra apoptotiske prosesser i ST. Restene i form av kluster av syncytiale nuclei (syncytial knots) eller cellefritt føtalt DNA i små fragmenter, støtes ut i i mikrovesiker til det intervilløse rom, for så å bli fjernet med det venøse materielle blodet. Apoptotisk utslipp av cellerester er under nøye homeostatisk kontroll, er nødvendig for fornyelse av overflaten av chorion-villi, og fremmer ikke inflammasjon. Det meste av dette materialet vil bli fjernet i lungene, den første kapillærsengen uterus' venøse blod møter. Nekrotisk celledød derimot, gir frigjøring av toksisk celleinnhold, og er proinflammatorisk (24). Nekrose av placentale celler skyldes forhold som hypoksi som kan oppstå ved patologiske tilstander i placenta som t.d. preeklampsi. Balansen mellom apoptose og nekrose kan på denne måten



bli forstyrret, og resultere i pro- inflammatorisk miljø, som igjen kan påvirke immunogenisiteten til antigenene på GPIIIa, jamfør punkt 1.1 avsnitt fem, seks og syv.

Noe av dette materialet vil sirkulere gjennom kvinnens milt, som er et viktig organ i immunresponsen, særlig ved inflammatoriske prosesser.

HPA-1 antigenet er også uttrykt på andre celler i kroppen, som endotel, vaskulære glatte muskelceller, og fibroblaster, men det er ikke funnet data som tyder på at disse cellene kan komme over fra foster til maternal sirkulasjon og initiere en immunrespons (1).

### **3.2.3 HLA-klassenes betydning for immunresponsen: genetisk disposisjon**

Abbè mfl. (25) analyserte HLA-DR, DQ og DP loci hos 36 immuniserte og 10 ikke-immuniserte HPA-1a negative gravide med HPA-1a positivt foster. 91 % av de immuniserte kvinnene hadde allel DRB3\*0101 og 94 % hadde allel DQB1\*02:01. Noen av de ikke-immuniserte kvinnene hadde også disse allelene. Forskerne konkluderte med at tilstedeværelsen av ett av disse to allelene økte sannsynligheten for å bli immunisert, hvorav odds ratio for allel DQB1\*0201 var 39.7 og 24.9 for allel DRB3\*0101. En slik sammenheng fant de ikke dersom kvinnen hadde dannet anti-HPA-5b.

Williamson mfl. (26) gjennomførte en kohort studie av 387 HPA-1a-negative gravide, og anti-HPA-1a ble funnet i 46 av disse 387 graviditetene; (12,0 %; 95 % CI 8,7 % -15,2 %). Alle kvinnene med unntak av én var HLA-DRB3\*0101 positiv, som gir en odds ratio på 140 (95 % CI 19-1035;  $P < 0.00001$ ), dvs. tilstedeværelsen av dette allelet øker risikoen for alloimmunisering hos HPA-1a negative kvinner med en faktor på 140. Den negative prediktive verdien var over 99 %, mens den positive prediktive verdien var kun 35 %.

I en stor norsk studie (the Norwegian prospective NAIT screening study) av til sammen 100 448 gravide kvinner, hvorav 2111 HPA 1a negative, og 210 (av 1990) immunisert mot HPA 1a, fant forskerne at de fleste kvinnene som ble immunisert var HLA DRB3\*0101 positive. 150 av de immuniserte kvinnene ble genotypet for tilstedeværelse av HLA DR3\*0101. Kun 12 av disse var HLA DR3\*0101 negative, og bare 2 av disse 12 kvinnene fødte trombocytopeniske barn med kun moderat redusert platetall på henholdsvis  $59 \times 10^9$  og  $94 \times 10^9$ /L. De konkluderte med at HLA DRB3\*0101 genotyping kan være et ytterligere verktøy for å identifisere foster med risiko for alvorlig NAIP (7).

I det samme materialet fant Killie m. fl. (27) anti-HPA-1a hos 170 (8,5 %) av de 1990 HPA-1a negative gravide. 90 % av disse 170 kvinnene uttrykte HLA DRB3\*0101. Kvantifisering av antistoffnivåene som ble gjort, viste at disse var signifikant lavere hos de 10 % HLA DRB3\*0101 negative kvinnene sammenlignet med de 90 % HPA DRB3\*0101 positive ( $p < 0,007$ ). Dette er forenelig med at antigen presentert av HLA DR3\*0101 positive APC er mer potente i å initiere en immunrespons enn antigen presentert av andre HLA klasse II molekyler. De fant ingen sammenheng mellom tidspunkt for immunisering (tidlig, sent eller post partum) og HLA DRB3\*0101.

Videre isolert Ahlen mfl. (8) HPA-1a-spesifikke CD4+ T celler med HLA-DRB3\*0101 som restriksjonselement fra én alloimmunisert kvinne. 5 av 6 T celle klonene prolifererte, og secernerte IFN  $\gamma$  (og noen av klonene lave mengder IL 4 og IL 5) ved stimulering med et syntetisert peptid som inneholdt HPA 1a epitopen, dvs. leucin i posisjon 33 på  $\beta$ 3 integrin/GPIIIa. Et kontrollpeptid inneholdt prolin i samme posisjon, og gav ingen respons fra T-cellene. Dette tjener som bevis på at HPA-1a spesifikke CD4+ T-celler med HLA-DRB3\*0101 som restriksjonselement, var til stede i denne HPA-1a-alloimmuniserte kvinnen.

HLA allelene er lokalisert nært hverandre, og nedarves under ett fra hver av foreldrene, dvs. som haplotyper. DRB3\*0101 allelet som sees hos de fleste HPA-1a immuniserte kvinner er assosiert med kun noen få andre DR-DQ haplotyper. Ahlen mfl. (28) genotypet 167 HPA 1a aimmuniserte kvinner fra den norske studien, og en kontrollgruppe på 782 tilfeldige donorer, for DRB3, DRB1, DQA1 og DQB1. De fant at 27 % av kontrollgruppen og 94 % av HPA-1-a immuniserte kvinner var bærere av DRB3\*0101, og at en haplotype; DR3-DQ2 var overrepresentert blant DRB3\*01:01 positive, immuniserte kvinnene ( $p < 0.003$ ). De fant også at 80 % av DQB1\*02 allelene blant immuniserte kvinner skyltes DR3-DQ2 haplotypen. Disse dataene peker i retning av at ytterligere ett, ikke ennå kartlagt genetisk element innen denne haplotypen, kan influere HPA-1a-immunisering.

Ahlen mfl. (8) diskuterer muligheten av at 2 ulike T celle populasjoner er involvert i immunresponsen, en populasjon som bruker HLA-DR3\*0101 som restirksjonselement, og en annen tenkt T celle populasjon som bruker HLA-DQB1\*0201.

Kort oppsummert er det rådende synet i dag at immunisering av gravide kvinner mot føtalt HPA-1a har sterkest sammenheng med HLA-DRB3\*0101 (7,8,26,27). Det er også funnet en assosiasjon til HLA-DQB1\*0201 (25,28). Data som er oppsummert her taler for at HLA DRB3\*0101 typing kan være et verktøy for å identifisere foster med risiko for alvorlig NAIT. Williamson (26) vurderte også muligheten for at HLA DRB3\*0101 genotyping kan benyttes for å ekskludere lav-risiko kvinner fra videre antistoff screening, som vil redusere unødvendig testing og påfølgende engstelse for foreldre.

### **3.2.4 Det peptidbindende motivet på HLA-DRB3\*0101 molekylet**

Ahlen mfl. (29) isolerte HPA-1a spesifikke T-celler fra HPA-1a immuniserte kvinner som hadde født et barn med alvorlig NAIT. Disse T-cellene hadde HLA DRB\*0101 som resiksjonselement (8). De fant videre at leucin i posisjon 33 på GPIIIa (HPA-1a-fenotypen), sørger for effektiv binding til det peptid presenterende HLA DRB3\*0101 molekylet på APC, mens epitopen som gjenkjennes av T-cellene er et "selv" epitop og identisk for både i HPA-1a og HPA-1b. Dette betyr at immunogenisiteten ligger i HPA-1a peptidets forankring til HLA molekylet, og ikke i T-cellens gjenkjenning av ulikheter mellom de to epitopene. At dette er et "selv-epotop" gir rom for en større variasjon i T-celle responsen enn dersom epitopen var begrenset til en enkel allogenisk aminosyre substitusjon.

### **3.2.5 Korrelasjon mellom anti-HPA 1a-antistoff og alvorlighetsgraden av NAIT**

Williams mfl. (26) fant i en tidligere omtalt prospektiv studie av 387 HPA-1a negative kvinner anti HPA-1a hos 46 (12 %). Alvorlig trombocytopeni var sterkt assosiert med anti-HPA-1a titer  $\geq 32$ , ( $P=0.004$ ) i tredje trimester, hvilket gav positiv prediktiv verdi for alvorlig trombocytopeni på 75 % og negativ prediktiv verdi på 88 %. De fant ingen slik sammenheng dersom kvinnen hadde forbigående - eller kun postnatale antistoff.

Som et ledd i den norske studien, undersøkte Killie mfl. (27) den naturlige utviklingen av mengden maternalt anti-HPA-1a longitudinelt gjennom svangerskapet hos 170 HPA-1a negative kvinner. Etter nedkomst ble plateantallet til de nyfødte undersøkt. De fant en sterk assosiasjon mellom antall trombocytter hos barnet og maternalt anti-HPA nivå i løpet av graviditeten og ved nedkomst ( $p<0.001$ ). De konkluderte med at maternalt anti-HPA-1a  $> 3.0$  IU/mL målt i graviditetsuke 22 og 34, hadde diagnostisk sensitivitet på 93 % og spesifisitet på 63 %, både hos førstegang- og flergangsgravide, og er derfor en god prediktor for å kunne beregne grad av trombocytopeni hos fosteret.

### **3.2.6 Immuniseringstidspunkt**

Killie mfl. (27) fant også at andelen HPA-1a-negative førstegangsggravide som utviklet anti-HPA-1a var 7,6 % (13 av 172). De fleste (9 av 13) hadde detekterbart anti-HPA-1a fra og med uke 22, og alle 13 hadde stigende antistoff nivå frem mot termin. 6/13 (46 %) fødte et barn med alvorlig trombocytopeni. Ytterligere 35 % gravide (60 av 172) serokonverterte etter nedkomst. Dette kan tyde på at en primær immunrespons ble igangsatt ved eller etter nedkomst, mest trolig som følge av FMH.

I samme undersøkelse var 147 flergangsgravide. 25 av 147 hadde økende anti-HPA-1a i løpet av svangerskapet, hvorav 12 (48 %) av barna hadde alvorlig trombocytopeni. Hos 24 av 147 var antistoff nivået lavt og svakt fluktuerende, for de resterende 33 kvinnene ikke detekterbart, og ingen av disse barna hadde alvorlig trombocytopeni. Gruppen av flergangsgravide med synkende anti-HPA-1a titer var klart størst (92/147). Av disse fødte 29 (32 %) barn med alvorlig trombocytopeni. Årsaken til denne nedgangen er fortsatt ukjent. Antistoff mot Rubella i den samme gruppen var stabilt. De fant heller ingen nedgang av anti-HPA-1a antistoff hos kvinner med et HPA-1a-negativt foster. Dette taler imot hypotesen om at denne nedgang av anti-HPA-1a nivå er en følge av normal hemodilusjon i svangerskap.

Kjeldsen-Kragh mfl (30) undersøkte senere 829 prøver fra 157 HPA-1a inkompatible svangerskap fra samme studie, og fant at det var lite sannsynlig at denne nedgangen av mengden antistoff kunne ha sammenheng med at kvinnen begynte å produsere antistoff mot den variable regionen av anti HPA-1a antistoffet, dvs. anti-idiotypiske antistoff.

I en prospektiv observasjons studie utført av Turner mfl. (9) av 26 506 gravide, fant de at 7,9 % (24/318) av kvinnene utviklet anti-HPA-1a for første gang (kun en disse var førstegangsggravide). Åtte kvinner fødte barn med NAIT, og 5 av disse hadde alvorlig trombocytopeni. Tre nyfødte hadde milde tegn på blødning, og ingen barn hadde

hjerneblødning eller døde in utero, og konkluderte at alvorlige blødninger og komplikasjoner opptrer sjeldnere ved første gangs immunisering enn tidligere antatt.

### **3.2.7 Fosterets kjønn**

Tiller mfl. (31) undersøkte nivået av anti-HPA-1a i 165 HPA-1a-inkompatible svangerskap som ble identifisert i den store norske studien. De fant at hos gutter var nivået anti-HPA 1a-antistoff signifikant assosiert med lav fødselsvekt og "small for gestational age" (SGA). Når kvinnen hadde høye anti-HPA-1a nivå (>15 IU/ml) under graviditeten, fant de at fødselsvekten hos guttene var 530 gram lavere, sammenlignet med andre HPA-1a-negative svangerskap, mulig som følge av at anti-HPA-1a påvirket placentas funksjon ved inhibering av angiogenese. Årsak til ulik affeksjon av kjønnene er ikke kjent.

### **3.2.8 AB0-systemet**

Ahlen mfl (32) undersøkte sammenhengen mellom AB0 systemet og alvorlig trombocytopeni. De fant at kvinner med blodgruppe 0 hadde en lavere risiko for å få et barn med alvorlig NAIT enn kvinner med blodgruppe A. 20 % av kvinnene med blodgruppe 0 fødte et barn med alvorlig NAIT, mot 47 % av kvinnene med blodgruppe A (RR:0,43; 95CI 0,25-0,75). Distribusjonen av AB0-fenotypene mellom HPA-1a immuniserte kvinner og den øvrige norske befolkningen lik, som tyder på at antistoff syntesen er uavhengig den gravides AB0-fenotype. De fant ingen indikasjon på at den lave forekomsten av immuniserte kvinner med blodgruppe 0 var relatert til AB0 inkompatibilitet mellom foster og den gravide.

## **4. Diskusjon**

### **4.1 Likheter i immuniseringsmekanismene**

#### **4.1.1 Tidspunkt for immunisering**

I materiale fra den store norske prospektive studien fant Killie mfl. (27) at av de 10 % HPA 1a negative gravide som immuniseres, blir 25 % immunisert i løpet av svangerskapet, mens hele 75 % immuniseres ved nedkomst. Dette er overraskende resultater, da tidligere studier har pekt i retning av at betydelig flere førstegangsgravide immuniseres i løpet av svangerskapet (18). Dette tyder på at en primær immunrespons hyppigst igangsettes ved eller etter nedkomst, mest trolig som følge av FMB, som samsvarer med immuniseringen mot RhD. Videre viser studier at NAIT oppstår sjeldnere enn tidligere antatt hos førstegangsgravide (9,27). Killie mfl. (27) tolker dette i retning av at immuniserings mønsteret for NAIT hos mange kvinner er likt HDN. For å forhindre immunisering og utvikling av HDN benytter man antistoff mediert immun suppresjon (AMIS) i forbindelse med RhD-inkompatible svangerskap. Det samme prinsippet kan tenkes brukt for å forhindre NAIT, ved å gi anti-HPA-1a til HPA-1a negative kvinner etter hendelser assosiert med FMB (27).

At dette kan fungere in vivo er vist av Tiller mfl (33) med en GPIIIa-negativ musemodell, som først ble transfundert med HPA-1a positive plater, og siden gitt anti-HPA-1a. De fant at anti-HPA-1a supprimerte immunresponsen signifikant, sammenlignet med kontrollgruppen ( $p < 0.05$ ). Foreløpige data indikerer at komplikasjoner av NAIT kan forhindres med den samme profylaktiske tilnærming, og flere forskere arbeider med å finne behandling mot immunisering mot HPA-1a som samsvarer med den som gis for RhD-negative kvinner som står i fare for å bli immunisert mot RhD.

Siden flere kvinner immuniseres mot HPA-1a enn mot RhD i løpet av svangerskapet, kan man kanskje ikke forvente seg så sterk effekt av profylakse som for HDN, men de data som er oppsummert her, taler sterkt for at potensialet i en tilsvarende profylakse mot NAIT er signifikant og bør prøves ut i praksis.

#### **4.1.2 Både RhD- og HPA-1a bruker HLA-molekyl som restriksjonselement**

Allerede i 1976 fremla Murray mfl. en studie som viste at det var sammenheng mellom bestemte HLA molekyler og alvorlig RhD-immunisering med høye titer av anti-D- Hilden mfl. (14) fant i sin studie at det var en statistisk signifikant sammenheng ( $p < 0,005$ ) mellom tilstedeværelsen av HLA-DQB1\* 02:01 og alvorlig RhD-immunisering med høye titer av anti-D og HDN.

Studier av HPA-1a systemets HLA restriksjon, har vist at det finnes en tilsvarende sammenheng mellom bestemte HLA molekyler og faren for immunisering mot HPA-1a. Det rådende synet i dag er at immunisering av gravide mot føtalt HPA-1a, har sterkest sammenheng med HLA DRB3\*0101 (7,26,27), og HLA DQB1\*0201 (8). Data oppsummert her taler for at HLA typing kan være et ytterligere verktøy for å identifisere foster med risiko for alvorlig NAIT (7,26,27), eventuelt benyttes for å ekskludere lav-risiko kvinner fra videre antistoff screening (26).

#### **4.1.3 Fosterets kjønn av betydning for immunresponsen**

Det er blitt vist at fosterets kjønn har betydning for immunresponsen mot både RhD og HPA-1a, men årsaken til dette er ikke kjent, hverken for RhD eller HPA-1a. Ved maternelt anti-D-titer  $> 16$ , ble guttefostrene i større grad affisert ved at det trengte mer intensiv behandling enn jentene (20). Det er også funnet at mødre til gutter har en høyere odds ratio for å bli immunisert mot RhD enn mødre til jenter: gutter/jenter; 1,44/1 (17), 1,74/1 og 1,5/1 (19).

For immunisering mot HPA 1a er det vist at nivået anti-HPA-1a er signifikant assosiert med lav fødselsvekt og risiko for SGA hos nyfødte gutter ( $p < 0.001$ ). Årsaken til dette kan være at anti-HPA-1a kan affisere placentas funksjon, bla ved å påvirke angiogenesen (31). Det kan også tenke seg at anti-HPA-1a binder HPA 1a på ST og affiserer blant annet dennes endokrine funksjon som produsent av en rekke hormoner under svangerskapet.

## **4.2 Ulikheter i immuniseringsmekanismene**

### **4.2.1 ABO systemets betydning for immunresponsen**

Flere studier har vist at ABO-inkompatibilitet beskytter mot RhD-immunisering (1,11). Det er funnet både kvantitativt færre og sjeldnere erythrocytter i den gravides sirkulasjon, trolig grunnet at kvinnens naturlig forekommende anti-A og anti-B er svært potente i å aktivere kompliment, og fører til lyse av erythrocyttene.

Ved undersøkelse av sammenheng mellom ABO-systemet og alvorlig trombocytopeni, fant man at kvinner med blodgruppe 0 hadde lavere risiko for å få et barn med alvorlig NAIT enn kvinner med blodgruppe A, men ingen indikasjon på at dette var relatert til ABO-inkompatibilitet mellom foster og den gravide (32). ABO-antigenene på trombocytene er svakt uttrykt, og det er mulig at maternelle anti-A og anti-B i liten grad vil bidra til nedbrytning av disse. Dette kan trolig være noe av forklaringen på at ABO-uforlikelighet ikke beskytter mot NAIT. En årsak til at kvinner med blodgruppe 0 har lavere risiko for å få et barn med alvorlig NAIT, kan være at genene som koder for ABO er lokalisert nært gener som koder for faktorer med immunregulatorisk effekt. Dersom disse nedarves som haplotyper, kan det forekomme en koplingsulikevekt der kvinner med blodgruppe 0 samtidig også arver gener med suppresserende effekt på immunresponsen.

Distribusjonen av ABO-fenotypene mellom HPA-1a immuniserte kvinner og den øvrige norske befolkningen var lik, som tyder på at antistoff syntesen er uavhengig den gravides ABO-fenotype (32).

### **4.2.2 Insidens av immunisering**

Selv om nye prospektive studier har vist at insidensen av immunisering mot HPA-1a under svangerskapet hos førstegangsgravide er mye lavere enn tidligere antatt, opptrer det relativt sett fortsatt hyppigere enn immunisering mot RhD. Det er også vist at utviklingen av anti-HPA-1a hos førstegangsgravide skjer på et tidligere tidspunkt, ca uke 20 (34), i forhold til anti-RhD som utvikles ca. ved uke 30. Forklaringen på dette kan ligge i at det finnes ytterligere kilder til immunisering mot HPA-1a enn RhD. Mikrovilli på SF uttrykker HPA-1a positive GPIIIa. Cellefragmenter fra disse kan bli tilgjengelig for det maternelle immunforsvaret under svangerskapet, initiere en immunisering av HPA-1a-negative gravide, og forårsake alloimmunisering tidlig nok til at antenatal utvikling av anti-HPA 1a kan føre til NAIT (24). Dette til forskjell fra erythrocyttene som er alene om å uttrykke RhD-proteinet, og er avhengig av en FMB for å kunne nå maternal sirkulasjon (1,3).

Årsaken til at forholdsvis få immuniseres gjennom denne mekanismen, kan tenkes være en følge av at dosen antigen fra cellefragmentene fra ST som undergår apoptose, er for liten til å initiere en immunrespons. Det er også sannsynlig at apoptotisk utslipp av cellerester fra placenta er under nøye homeostatisk kontroll og ikke fremmer ikke inflammasjon, men tas opp via fagocytose og elimineres fra sirkulasjonen.

Noe av dette materialet vil sirkulere gjennom mors milt, som er et viktig organ i immunresponsen, hovedsaklig ved inflammatoriske prosesser. Nekrotisk celledød gir frigjøring av toksisk celleinnhold (DAMPs) og er pro-inflammatorisk, som nekrose av placentale celler grunnet hypoksi ved preeklampsi (24).

Det kan tenkes at de av kvinnene som blir immunisert mot HPA-1a, er kvinner som har en samtidig pågående patologisk prosess i form av inflammasjon grunnet mikrober eller celledød av kroppsegne celler, og som via PPT stimulerer APC til å uttrykke CD86/CD80 i et større antall enn normalt, som derfor evner å binde CD28 på naive T-celler, gi signal 2 og initiere en immunrespons mot HPA-1a. Dette må belyses i videre studier.

## 5. Referanser

- 1) Mollison PL, Blood transfusion in clinical medicine 11<sup>th</sup> edition. Blackwell Scientific Publication London 2005; kapittel 3, 5, 12 og 13.
- 2) Woodrow JC, Clarke CA, Donohoe WTA, Finn R, McConell RB, Sheppard PM, Lehane D, Rsell SH, Kulke W, Durkin CM. Prevention of Rh-Haemolytic Disease: A Third Report. Brit. med. J. 1965;1:279-283.
- 3) Woodrow JC, Finn R. Transplacental haemorrhage. Br J Haematol. 1966;12:297-309.
- 4) Zipursky A, Pollock J, Chown B, Israelis LG. Transplacental fetal hemorrhage after placental injury during delivery or amnioncentesis. Lancet 1963; 493-494.
- 5) Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. Blood Rev. 2000;14:44-61.
- 6) Blanchette VS, Johnson J, Rand M. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000;13:365-390.
- 7) Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, Golebiowska E, Randen I, Hauge R, Aune B, Øyan P, Dahl LB, Pirhonen J, Lindeman R, Husby H, Haugen G, Grønn M, Skogen B, Husebekk A. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood. 2007;110:833-839.
- 8) Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Skogen B, Stuge TB. T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3\*0101-restricted CD4+ T cells. Blood. 2009;113:3838-3844.

- 9) Turner ML, Bessos H, Fagge T, Harkness M, Rentoul F, Seymour J, Wilson D, Gray I, Ahya R, Cairns J, Urbaniak S. Prospective epidemiological study of the outcome and cost-effectiveness of antenatal screening to detect neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a. *Transfusion*. 2005;45:1945-1956.
- 10) Urbaniak SJ. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfusion Clinique et biologique*. 2006;13: 19-22.
- 11) Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion*. 2003;43:1661-1666.
- 12) Tovey LAD, Stevenson BJ, Townley A, Taverner JM. The yorkshire antenatal anti-D immunoglobulin trial in primigravidae. *Lancet*. 1983;244-246.
- 13) Stott L-M, Barker RN, Urbaniak SJ. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood*. 2000;96:4011-4019.
- 14) Hilden JO, Gottvall T, Lindblom B. HLA Phenotypes and severe Rh(D) immunization. *Tissue Antigens*. 1995;46:313-315.
- 15) Alvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004;5:266-71.
- 16) Hall AM, Cairns LS, Altmann DM, Barker RN, Urbaniak SJ. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood*. 2005;105:2175-2179.
- 17) Renkonen KO, Seppala M. The sex of the immunizing Rh positive child. *Ann Med Biol Fen*. 1962;40:108-109.
- 18) Renkonen KO, Seppala M, Timonen S. Further factors influencing Rh-immunization:II. *J Med Genet*. 1968;5:123-8.
- 19) Woodrow JC. Rh immunization and its prevention. *Ser Haematol*. 1970;3:1-151
- 20) Ulm B, Svolba G, Ulm MR, Bernaschek G, Panzer S. Male fetuses are particularly affected by maternal alloimmunization to D antigen. *Transfusion*. 1999;39:169-173.
- 21) Murray S, Dewar PJ, Mcnay RA, Collin AK. A study of HL-A types in Rh haemolytic disease of the newborn. *Vox sang*. 1976;30:91-104.
- 22) David M, Smidt J, Chen FC, Stein U, Dudenhausen JW. Risk factors for fetal-to-maternal transfusion in Rh D-negative women. *J Perinat Med*. 2004;32:254-257.
- 23) Woodrow JC, Donohoe WTA. Rh-immunization by Pregnancy: Results of a Survey and Their Relevance to Prophylactic Therapy. *Brit. Med*. 1968;4:139-144.



- 24) Kumpel BM, Sibley K, Jackson DJ, White G, Soothill PW. Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa,  $\beta 3$  integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion*. 2008;48:2077-2086.
- 25) L Abbè D, Tremblay L, Filion M, BusQue L, Goldman M, Dècary F, Chartrand P. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB\*0101 and HLA-DQB1\*0201. *Hum. Immunol*. 1991;34:107-114.
- 26) Williamson LM, Hacett G, Rennie J, Palmer CR, Maciver C, Hadfield R, Hughes D, Jobson S, Ouwehand WH. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood*. 1998;92:2280-2287.
- 27) Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*. 2008;93:870-877.
- 28) Ahlen MT, Heide G, Husebekk A, Skogen B, Kjeldsen-Kragh J, Stuge TB. HLA-DRB3\*0101-associated HLA-DR-DQ haplotypes in HPA-1a alloimmunized women: DR3-association is stronger than expected by random distribution. In: *Specificity and HLA-restriction of CD4 T Cells Associated with Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia*. Doctoral dissertation, January 2011, University of Tromsø.
- 29) Ahlen MT, Husebekk A, Killie IL, Haney D, Betts MR, Skogen B, Stuge TB. T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: HPA-1a-specific T cell clones recognize a "self"-epitope that does not include the allogeneic Leu33 residue. In: *Specificity and HLA-restriction of CD4 T Cells Associated with Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia*. Doctoral dissertation, January 2011, University of Tromsø.
- 30) Kjeldsen-Kragh J, Kim M, Killie MK, Husebekk A, Freedman J, Semple JW. In HPA 1a immunized women the decrease in anti-HPA 1a antibody level during pregnancy is not associated with anti-idiotypic antibodies. *Haematologica*. 2009;94:441-443.
- 31) Tiller H, Killie MK, Husebekk A, Skogen B, Ni H, Kjeldsen-Kragh J, Oian P. Platelet antibodies and fetal growth: Maternal antibodies against fetal platelet antigen 1a are strongly associated with reduced birthweight in boys. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Sept 5 doi:10.1111/j. 1600-0412.2011.01269.x.(Epub ahead of print)
- 32) Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Olsson ML, Skogen B. The development of severe neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a antibodies is correlated to maternal *ABO* genotypes. (In press)

- 33) Tiller H, Chen P, Skogen B, Killie MK, Husebekk A, Matviyenko M, Kjeldsen-Kragh J, Ni H. Administration of Anti-Platelet Antibodies Prevents the Anti-Platelet Immune Response and Bleeding Complications of Neonatal Immune Thrombocytopenia in a Murine Model. *Blood* 2009; 114: Abstract 223.
- 34) Kaplan C, Morel-Kopp MC, Clemenceau S, Daffos F, Forestier F, Techernia G. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: current trends in diagnosis and therapy. *Transfusion Medicine*. 1992;2:265-271.

**Følgende artikler og bøker er brukt som bakgrunnskunnskap for forståelse av immuniseringsmekanismer og aktuell problemstilling:**

Heier HE, Berge LN, Hervik T, Kiserud T, Børset M, Eik-Nes S, Arsenovic M, Acharya G. Immunisering i svangerskapet. *Tidsskr Nor Legeforen*. 2009;129:2016-8.

Husebekk A, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. Is it time to implement HPA-1 screening in pregnancy? *Hematology*. 2009;16:497-502.

Mollison PL. *Blood transfusion in clinical medicine* 11<sup>th</sup> edition. Blackwell Scientific Publication. London; 2005; kapittel 3, 5, 12 og 13.

Abbas AK og Lichtman AH. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*, 2<sup>nd</sup> edition updated ed. Saunders Elsevier, 2006-2007.

Agger R, Andersen V, Leslie G og Aasted B. *Immunologi*, 4. Utgave. Biofolia, 2005.

Bogen B, Munthe LA. *Immunologi*. Universitetsforlaget. 2000.

Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*, 3 utgave 2006. Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS