

Случай выявления антигена weak D type 4.2 (категория DAR) системы Резус

Л.Л. Головкина, А.Г. Стремоухова, Т.Д. Пушкина, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Лариса Леонидовна Головкина largol@mail.ru

Серологические методы идентификации резус-принадлежности человека не могут выявить варианты антигена D. В статье описаны серологические характеристики антигена системы Резус weak D type 4.2 (категория DAR).

Ключевые слова: система Резус, варианты антигена D, weak D, D-парциальный, генотип, фенотип, типы weak D, weak D type 4.2, кластеры антигена weak D, категория DAR, генотипирование

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-70-72

Case of rhesus antigen weak D type 4.2. (DAR category) detection

L.L. Golovkina, A.G. Stremouchova, T.D. Pushkina, E.N. Parovichnikova

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Pr-d, Moscow, 125167, Russia

Serological methods of Rhesus antigens identification in humans cannot identify D-antigen variants. In this article the serological characteristics of Rhesus antigen D weak type 4.2. (Category DAR) are described.

Key words: rhesus, D-antigen variants, weak D, D partial, genotype, phenotype, weak D types, weak D type 4.2, weak D-antigen clusters, DAR category, genotyping

Введение

Антиген D (RhD) – один из основных антигенов эритроцитов человека, входит в систему Резус, насчитывающую в настоящее время 59 антигенов. Антигены системы Резус кодируются 2 генами: *RHD* и *RHCE*, расположенными на коротком плече хромосомы 1 (p34.3-p36.1), они определяют биосинтез полипептида, состоящего из 417 аминокислот. Гидрофобные белки пронизывают мембрану эритроцита в 12 местах, образуя 6 петель, состоящих из внеклеточной, внутримембранной и внутриклеточной частей и имеющих внутримембранные N- и C-концевые последовательности.

Классический антиген D состоит из 36 составных частей (эпитопов) [1]. Среди множества его вариантов принято выделять 3 основных: слабый антиген D – D weak (его количество на эритроците снижено), парциальный, у которого отсутствует какой-либо из эпитопов (лица с таким антигеном D могут вырабатывать антитела к отсутствующим у них эпитопам), и DEL [2]. Эритроциты с антигеном DEL обычно идентифицируют как RhD-отрицательные при использовании серологических методов.

Первым сообщил о существовании варианта антигена D, обозначенного как D^u, F. Stratton в 1946 г. [3]. Термином D^u обозначали антиген D на тех эритроцитах, которые не агглютинировались полными IgM анти-D-антителами, но показывали положительный результат с IgG-антителами в непрямом

антиглобулиновом тесте. Чистых анти-D^u-антител не выделено: все резус-отрицательные больные вырабатывали антитела со специфичностью анти-D после переливания D^u-положительных эритроцитов, что указывало исключительно на количественные различия между антигенами D и D^u. Поэтому в 1992 г. антиген D^u переименовали в антиген weak D [4]. В настоящее время описано более 80 вариантов этого антигена, появление которых обусловлено мутациями в гене *RHD*, приводящими к аминокислотным заменам, в основном в трансмембранной и внутриклеточной частях белковой молекулы антигена RhD [5]. Количество антигена D на 1 эритроците у лиц с weak D варьирует от 60 до 3800, в то время как у пациентов с «нормальным» D – 13 000–24 000 [6]. Позднее A.S. Wiener и L.J. Unger [7], P. Tippett и R. Sanger [8] выявили больных с нормальным или ослабленным антигенами D, способными вырабатывать анти-D-антитела. Исследователи пришли к заключению о существовании парциального варианта антигена D, имеющего качественные отличия от «нормального» D.

Филогенез гена *RHD* человека доказывает существование 4 главных кластеров, которые выделяют по аллелям, отличающимся от обычных аллелей гена *RHD* и включающим варианты антигена D с дополнительными аминокислотными заменами: DIV, DAU, слабый weak D type 4 и Евразийский [9–11]. Кластеры weak D type 4, DIV^a и DAU ассоциированы с гаплоти-

пом сDe и встречаются преимущественно у представителей негроидной расы, в то время как гаплотипы Cde и сDE ассоциированы с Евразийским кластером [12] и представлены у людей европеоидной расы.

DAR1 (DAR, weak D type 4.2) принадлежит к кластеру антигена weak D type 4. Варианты антигена RhD DAR и weak D type 4.2 были выявлены у людей с анти-D-антителами. Эти 2 варианта антигена имеют одни и те же 3 замены нуклеотидов в гене *RHD* и 3 аминокислотные замены (602C>G (T201R), 667T>G (F223V), 1025T>C (I342T)), но отличаются только по одной единичной синонимичной мутации гена (957G>A (V319V)), не влияющей на фенотип RhD [6, 13]. Следовательно, антигены weak D type 4 и DAR являются вариантами антигена D с идентичным фенотипом и почти идентичным генотипом, хотя 1-й относят к слабому варианту антигена D, а 2-й – к парциальному антигену D.

В повседневной практике иммуногематологов антиген weak D можно определить серологическими методами по отсутствию или формированию мелкой агглютинации исследуемых эритроцитов с анти-D-реагентами на плоскости и по положительному результату непрямой пробы Кумбса (непрямой антиглобулиновый тест), в которой агглютинация исследуемых эритроцитов формируется с временным отставанием по сравнению с положительным контролем. В реакции солевой агглютинации исследуемые эритроциты реагируют с анти-D-реагентом в более низком титре по сравнению с положительным контролем (стандартные D-положительные эритроциты). Но серологические методы не позволяют определить тип антигена weak D. Это можно сделать только с помощью молекулярных исследований. В научно-клинической лаборатории трансфузиологической иммуногематологии Гематологического научного центра (ГНЦ) начата такая работа в рамках научно-исследовательской тематики. Ранее мы уже описали случаи выявления антигена weak D type 15 [14] и редкого аллеля A^{el} системы ABO [15]. В данной статье мы приводим серологические характеристики антигена weak D type 4.2, входящего в категорию антигенов DAR.

В нашу лабораторию обратилась женщина К. для уточнения резус-принадлежности. По данным разных лабораторий г. Москвы у нее выявляли то положительный, то отрицательный резус-фактор.

Материалы и методы

Мы исследовали стандартные резус-положительные и резус-отрицательные эритроциты, эритроциты и ДНК из лейкоцитов периферической крови.

Групповую принадлежность выявляли по системам ABO и Резус в реакции агглютинации на плоскости цоликлонами соответствующей специфичности IgM-класса. Антиген D определяли в реакции солевой агглютинации в планшетах с полными моноклональными анти-D-антителами (ЭритрогестTM-Цоликлон

анти-D Супер) 2 серий, непрямой антиглобулиновый тест (непрямая проба Кумбса) с неполными моноклональными антителами анти-D 2 серий (ЭритрогестTM-Цоликлон анти-D) проводили в пробирках и в геле (фирма «Bio-Rad», США). Антиглобулиновую сыроворотку 3 серий применяли для выявления фиксирования неполных анти-D-антител после проведенной инкубации на исследуемых и контрольных эритроцитах. Все реактивы произведены фирмой ООО «Гематолог» (Москва).

Геномную ДНК выделяли с помощью реактивов фирмы «BAG» (Германия) по методике производителя. Концентрацию и чистоту ДНК определяли на спектрофотометре. Одна оптическая единица (OD) соответствовала концентрации ДНК 50 нг/мкл. Чистота ДНК, определяемая по отношению показателей при 260 и 280 нм (OD 260/280), составляла 1,6–1,8, концентрация конечной ДНК – 50–100 нг/мкл.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли с праймерами для выявления вариантов антигена D: weak D (Weak D-Type) и парциального D (Partial D-Type), также RH-Type производства фирмы «BAG» (Германия) по программе производителя. Детекцию полученных результатов осуществляли посредством электрофореза продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл) в Трис-боратном электродном (ТВЕ) буфере при напряженности электрического поля 10–15 В/см. В лунки геля вносили по 10 мкл амплификационной смеси. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете ($\lambda = 310$ нм) при помощи трансиллюминатора в виде полос ярко-оранжевого цвета. Наличие полос амплификации внутреннего положительного контроля свидетельствовало о корректности проведенной ПЦР.

Результаты

Определение групповой принадлежности по системам ABO и Резус на плоскости показало наличие группы крови В (III) с фенотипом системы Резус ссD^{weak}ee. С Цоликлоном анти-D супер на плоскости мелкие агглютинаты исследуемых эритроцитов появлялись после 2-й минуты. В реакции солевой агглютинации в круглодонных планшетах с тем же реактивом эритроциты склеивались в разведении антител 1:32. Контрольные резус-положительные эритроциты реагировали в разведении антител 1:2000. В гелевых колонках с полными анти-D-антителами результат оценивали на 2+. В непрямом антиглобулиновом тесте в пробирках при использовании цоликлона с анти-D-антителами IgG-класса исследуемых эритроцитов агглютинация появлялась на 2-й минуте, в то время как агглютинация с резус-положительными стандартными эритроцитами – на 10-й секунде. В непрямом антиглобулиновом тесте, выполненном в гелевых картах с тем же Цоликлоном анти-D, идентифицирован положительный результат на 4+ (табл.).

Результаты серологических реакций с полными и неполными анти-D-антителами (время появления агглютинации, разведение реагентов, сила реакции)

Эритроциты	Методы исследования				
	Полные анти-D-антитела			Неполные анти-D-антитела	
	Плоскость	Солевая агглютинация	Гелевый	Непрямая проба Кумбса в пробирках	Непрямая проба Кумбса в колонках с гелем
Пациентка К.	2-я минута	1:32	2+	2-я минута	4+
D+	10-я секунда	1:2000	4+	10-я секунда	4+
D-	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

Генотипирование с праймерами набора Weak D-Type позволило выявить ген *weak D type 4.2 (DAR)*, Partial D-Type – *DAR (weak D type 4.2)*, D-Type – *cc ee*. Таким образом, генотип системы Резус К. идентифицирован как *cc weak D type 4.2 (DAR) ee*.

Заключение

Современные молекулярные методы исследования позволяют идентифицировать редкие аллели ге-

нов *RHD*, продукты которых определяют серологическими методами как слабый вариант антигена D. Описанный антиген можно отнести и к слабому, и к парциальному вариантам антигена D, поэтому потенциальным реципиентам с данным вариантом антигена показано переливание эритроцитов от резус-отрицательных доноров. Доноров с подобным антигеном следует относить к резус-положительным лицам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scott M. Section 1A. Rh serology. Coordinators report. *Transfus Clin Biol* 2002;9:23–9.
2. Daniels G. Variants of RhD—current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013;161:461–70.
3. Stratton F. A new Rh allomorph. *Nature* 1946;158:25–6.
4. Agre P.C., Davies D.M., Issitt P.D. et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion* 1992;32:86–7.
5. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385–93.
6. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95:2699–708.
7. Wiener A.S., Unger L.J. Further observations on the blood factors RhA, RhB, RhC and RhD. *Transfusion* 1962;2:230–3.
8. Tippett P., Sanger R. Further observations of subdivisions of the Rh antigen D. *Arztl Lab* 1977;23:476–80.
9. Flegel W.A., Wagner F.F. Molecular genetics of RH. *Vox Sang* 2000;78:109–15.
10. Flegel W.A., von Zabern I., Doescher A. et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion* 2009;49:1059–69.
11. Wagner F.F., Ladewig B., Angert K.S. et al. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood* 2002;100:306–11.
12. Wagner T., Kormoczi G.F., Buchta C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520–6.
13. Hemker M.B., Ligthart P.C., Berger L. et al. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks. *Blood* 1999;94:4337–42.
14. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Случай выявления антигена системы Резус Dweak 15-го типа. *Гематология и трансфузиология* 2014;59(4):23–4. [Golovkina L.L., Stremouchova A.G., Pushkina T.D. et al. The case of Dweak 15-type Rhesus antigen detection. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2014;59(4):23–24 (In Russ.)].
15. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. Выявление редкого аллеля антигена A системы ABO Ael у женщины из Дагестана. *Интер-медикал* 2015;1(7):25–8. [Golovkina L.L., Stremouchova A.G., Pushkina T.D. Identification of the rare Ael antigen A allele in Dagestan woman. *Inter-medikal = Inter-Medical* 2015;1(7):25–8 (In Russ.)].