

Выявление распространенных и новых редких типов слабого антигена RhD у больных с заболеваниями системы крови и здоровых лиц

Л.Л. Головкина, Р.С. Каландаров, О.С. Пшеничникова, В.Л. Сурин, А.Г. Стремоухова,
Т.Д. Пушкина, Б.Б. Хасигова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Лариса Леонидовна Головкина largol@mail.ru

Введение. Фенотип системы Резус определен у 404 лиц с проблемами в идентификации групповой принадлежности. Генетическое типирование вариантов антигена RhD выполнено 73 индивидуумам.

Цель исследования — дать молекулярно-серологическую характеристику слабых вариантов антигена RhD системы Резус.

Материалы и методы. Использовали следующие методы: метод определения резус-фенотипа в прямой агглютинации на плоскости с применением Цоликлонов анти-D, анти-C, анти-c, анти-C^v, анти-E и анти-e; гелевый метод определения резус-фенотипа; методы генетического типирования антигена RhD; методы определения антигена RhD в непрямой пробе Кумбса в классическом варианте и в геле; метод определения антигена RhD в агглютинации в солевой среде.

Результаты. Серологическими методами выявлено 73 образца эритроцитов с ослабленным антигеном RhD. Молекулярными методами определены причины ослабления экспрессии антигена: идентифицировано 3 типа слабого антигена RhD, часто встречающихся у россиян (RHD*D weak type 1–3), и впервые выявлены еще 3 типа — RHD*D weak type 67, RHD(G255R) и RHD(JVS5-38del4). Дана серологическая характеристика разных типов слабого антигена RhD. Показано, что предположить присутствие вариантных антигенов можно по расхождению результатов в методах прямой агглютинации с Цоликлонами и в геле. Эритроциты со слабыми антигенами RhD можно распознать по ослаблению или отсутствию агглютинации с Цоликлоном анти-D и силе реакции в гелевом методе на 3+...4+.

Заключение. Конкретные типы слабого антигена RhD могут быть установлены только при генетическом исследовании. Серологически слабые варианты антигенов могут быть выявлены при использовании моноклональных антител как минимум 2 серий или, что предпочтительнее, применением 2 разных методик.

Ключевые слова: ген RHD, генетическое типирование, тип слабого антигена RhD, Цоликлон, непрямая проба Кумбса, реакция агглютинации в солевой среде, гелевый метод

Для цитирования: Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С. и др. Выявление распространенных и новых редких типов слабого антигена RhD у больных с заболеваниями системы крови и здоровых лиц. Онкогематология 2019;14(3):52–9.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-3-52-59

Identification of common and new rare types of weak RhD antigen in patients with blood diseases and healthy person

L.L. Golovkina, R.S. Kalandarov, O.S. Pshenichnikova, V.L. Surin, A.G. Stremoukhova, T.D. Pushkina, B.B. Khasigova
National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Rhesus phenotype has been determined in 404 persons which have problems with blood groups identification. Genetic typing of antigen RhD variants was performed in 73 individuals.

Objective of the work was to give molecular and serological characteristics of the antigen RhD weak types.

Materials and methods. Method of rhesus phenotype determination in direct agglutination test on plane by using of anti-D, anti-C, anti-c, anti-C^v, anti-E and anti-e monoclonal antibodies; gel method of rhesus phenotype determination; methods of genetic typing of RhD; methods of antigen RhD determination in the classic indirect antiglobulin test and in the gel indirect antiglobulin test; method of antigen RhD determination in the saline agglutination test.

Results. Serological methods identified 73 red blood samples with the weakened expression of RhD antigen. Molecular methods showed the reasons of weakness of antigen expression. Three RHD*D weak types which are common in Russians (RHD*D weak type 1–3) were identified and for the first time 3 types were found — RHD*D weak type 67, RHD(G255R) and RHD(JVS5-38del4). Serological characteristic of RhD weak types was given. It was shown that combined using of monoclonal antibodies in direct agglutination test and in gel is the most effective serological method of the antigen variants detection. Red blood cells with weak RhD antigens can be recognized by weakness or absence of agglutination with monoclonal antibodies on plane if agglutination in gel was 3+– 4+.

Conclusion. Concrete weak RhD variants can be determined only by genetic typing. Serologically weak antigen variants can be detected by using of at least two series of monoclonal antibodies or by using of two different methods (it is preferable).

Key words: *RHD gene, genetic typing, direct sequencing, weak type RhD antigen, indirect Coombs test, saline agglutination test, gel method*

For citation: *Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Pshenichnikova O.S. et al. Identification of common and new rare types of weak RhD antigen in patients with blood diseases and healthy person. Onkogematologiya = Oncohematology 2019;14(3):52–9.*

Введение

В системе Резус различают 2 гена *RHD* и *RHCE*, которые имеют высокую степень гомологии [1]. Ген *RHD* определяет синтез белковой молекулы антигена RhD и его различные (в зависимости от аллели *RHD*) варианты, количество которых уже трудно подсчитать из-за постоянного обновления базы данных вследствие открытия новых аллелей. Причинами формирования аллельных вариантов генов *RHCE* и *RHD* являются единичные или многочисленные мутации в кодирующих областях, сплайсинговые мутации или замещения частей гена *RHCE* на части гена *RHD* и, наоборот, с формированием гибридных генов *RHCE-D-CE* или *RHD-CE-D* [2].

Алгоритм определения присутствия антигенов системы Резус различен для антигена RhD и антигенов RhCcEe, что связано с различной иммуногенностью указанных белков. Выявление антигена RhD происходит в 2 этапа: сначала выполняют методики, основанные на прямой реакции агглютинации эритроцитов с иммуноглобулином (Ig) класса M (полными) анти-D-антителами, а при отрицательном результате выполняют более чувствительные серологические реакции с использованием анти-D-антител класса IgG (неполные антитела).

Классический антиген RhD имеет сложное строение: его структура состоит из 37 составных частей (эпитопов) [3]. В зависимости от количества антигенных детерминант и эпитопов различают 3 основных варианта антигена RhD: слабый – RhD weak (количество антигенных детерминант на эритроците снижено по сравнению с классическим антигеном), парциальный – RhD partial (отсутствие какого-либо эпитопа) и DEL [4, 5].

Первым сообщил о существовании слабых вариантов антигена RhD, обозначенных как Du, F. Stratton в 1946 г. [6]. Термином Du называли антиген RhD, который не выявляли реактивами на основе полных анти-D-антител, но обнаруживали в непрямом антиглобулиновом тесте. Чистых анти-Du-антител не выделено: D-отрицательные больные после переливания им эритроцитов с антигеном Du вырабатывали антитела со специфичностью анти-D, что доказывало существование только количественных различий между антигенами D и Du. Поэтому в 1992 г. антиген Du переименовали в антиген RhD weak (RhD слабый) [7].

В настоящее время описано более 161 типа этого антигена, которые обозначают как D weak type 1–161 или по нуклеотидным заменам в гене (<http://www.rhesusbase.info>) [8]. В большинстве случаев появление

новых фенотипов RhD weak обусловлено генетическими причинами: изменениями нуклеотидных последовательностей или в самом гене *RHD*, или в его ближайшем окружении. Мутационные процессы чаще происходят в виде замены единичных нуклеотидов и возникают в экзонах (смысловые мутации), что приводит к заменам единичных аминокислот во внутриклеточной или трансмембранной частях белка RhD [9, 10].

Все аминокислотные замены у аллелей RHD*D weak можно объединить в кластеры. Единичные замены аминокислот чаще затрагивают регион между аминокислотами 267 и 397, реже – в позициях 2–13, 149, 179–225 белковой молекулы. В позициях 2–13, 149, 179–225 часто могут происходить и множественные аминокислотные замены [9].

F.F. Wagner и соавт. представили доказательства взаимосвязи смысловых мутаций в гене *RHD* и уменьшения экспрессии антигена RhD вследствие снижения интеграции резусного белка в мембрану эритроцитов [9]. Они доказали большое значение аминокислотных последовательностей в позициях 295–385 для оптимальной интеграции белка RhD в мембрану. Количество встраиваемых в мембрану эритроцита молекул белка RhD зависит от локализации аминокислотных замен в нем: чем ближе к внутриклеточной части молекулы белка RhD происходят аминокислотные замены, тем больше антигенных детерминант формируется на самой мембране.

Способность анти-D-антител связываться с эритроцитами зависит от строения эпитопов и их количества на эритроцитах. Чем больше антигенных детерминант присутствует на эритроците, тем легче их выявлять серологическими методами. В норме в зависимости от гаплотипов эта величина составляет от 13 283 на эритроцитах с фенотипом CcD₂Ee до 24 509 на эритроцитах с фенотипом CcDEe [11]. Количество детерминант антигена RhD на одном эритроците у людей с D weak варьирует в широких пределах – от 60 до 3800 [12]. Большинство типов RhD weak, ассоциированных с аминокислотными заменами в трансмембранной части белка, расположенной близко к внешней мембране эритроцитов, имеют очень низкую плотность антигенных детерминант – менее 500 на эритроцит. Интерес представляют эритроциты D weak type 7, у которых замененная аминокислота находится глубоко в трансмембранной части 11-й петли белка RhD, т. е. близко к цитоплазме эритроцита: количество антигена RhD составляет 2400 на эритроцит. Плотность эпитопов (антигенных детерминант) RhD на эритроцитах колеблется среди эритроцитов одного

и того же типа D weak [11]. Кроме этого, выявлены связь типов D weak с определенным гаплотипом и постоянство этого феномена [12].

Изучение филогенеза гена *RHD* человека привело к пониманию того, что существует 4 главных кластера гена, отличающихся от обычных аллелей гена *RHD* по дополнительным аминокислотным заменам: DIV, DAU, D weak type 4 и евразийский [13–15]. Аллели гена *RHD* кластеров D weak type 4, DIVa и DAU представлены в гаплотипе с *RHCE*ce* (фенотип cDe) и встречаются преимущественно у представителей негроидной расы, в то время как гаплотипы *RHCE*Ce* и *RHCE*cE* (фенотипы Cde и cDE) ассоциированы с аллелями гена *RHD* евразийского кластера [16] и чаще встречаются у представителей белой расы.

Существуют расовые и популяционные различия в частоте встречаемости типов антигена RhD weak. Антигены RhD weak types 1–3 в 93 % случаев встречаются среди лиц белой расы [9]. Антиген RhD weak type 3 чаще встречается у жителей Загребского региона Хорватии [17], очень редкий RhD weak type 38 (Gly278Asp) – у португальцев [18], RhD weak type 42 – у жителей Квебека, потомков переселившихся в Канаду европейцев [19]. Первые сведения о частоте типов слабого антигена RhD у россиян приведены по результатам генотипирования 63 человек в работе Л.Л. Головкиной и соавт. в 2016 г. [20]. В настоящей работе описаны новые результаты исследования в данном направлении.

Цель исследования – описать молекулярно-серологические свойства разных типов слабого антигена RhD.

Материалы и методы

Материалом исследования были эритроциты периферической крови 404 лиц и ДНК 73 лиц с ослабленной экспрессией антигена RhD, выявленной при первичном определении в реакции агглютинации на плоскости (метод 1) моноклональными анти-D класса IgM двух серий (ЭРИТРОТЕСТ™-Цоликлон анти-D супер, Гематолог, Россия). С эритроцитами, экспрессия антигена RhD на которых была ослаблена, проводили реакцию солевой агглютинации с теми же полными моноклональными антителами анти-D (ЭРИТРОТЕСТ™-Цоликлон анти-D супер, Гематолог, Россия) двух серий в 96-луночных планшетах (метод 2) и в гелевых ID-картах Diaclon ABO/D+Reverse Grouping с анти-D IgM+IgG антителами (Bio-Rad, Швейцария) (метод 3). Далее выполняли непрямой антиглобулиновый тест с неполными моноклональными антителами анти-D двух серий (ЭРИТРОТЕСТ™-Цоликлон анти-D, Гематолог, Россия) в пробирках (классическая непрямая проба Кумбса – метод 4) и в гелевых ID-картах LISS/Coombs (с антиглобулиновым реактивом, состоящим из смеси кроличьих анти-IgG- и моноклональных анти-C3d-антител, Bio-Rad, Швейцария) (метод 5). Активным компонентом препарата ЭРИТРОТЕСТ™-Цоликлон анти-D была смесь 4

моноклональных антител класса IgG1, направленных к разным эпитопам (6.5, 6.3 и 6.2) антигена D. Антиглобулиновую сыворотку 3 серий (смесь кроличьей антисыворотки против IgG человека и моноклональных анти-C3d-антител, Гематолог, Россия) применяли для выявления фиксированных неполных анти-D-антител на исследуемых и контрольных эритроцитах после проведенной инкубации при постановке классической непрямой пробы Кумбса. Для контрольных исследований использовали стандартные D-положительные и D-отрицательные эритроциты. Во всех методах реакция агглютинации с контрольными D-отрицательными эритроцитами не формировалась. Агглютинация со стандартными D-положительными эритроцитами формировалась: в методах 1 и 4 – со 2–3-й секунды, в методе 2 – до разведения анти-D-моноклональных антител 1:2000–1:4000, в методах 3 и 5 – на 4+.

Геномную ДНК выделяли с помощью реактивов фирмы BAG (Германия) по методике производителя и по стандартной методике депротеинизации фенолом после лизиса протеиназой К. 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 выполняли с праймерами для выявления генотипов системы Резус (RH-TYPE) и 12 типов гена *RHD*Dweak* (Weak D-TYPE, BAG, Германия). Детекцию полученных результатов осуществляли посредством электрофореза продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл) в TBE-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) с помощью трансиллюминатора в виде полос ярко-оранжевого цвета. Наличие полос амплификации внутреннего положительного контроля свидетельствовало о корректности проведенной полимеразной цепной реакции.

Аллельные варианты гена *RHD* устанавливали также методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в фирме Синтол (Россия). Секвенирование проводили в ЦКП «Геном» (Москва) с помощью набора реактивов ABI PRISM®BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems, США).

Результаты

В 2017–2019 гг. (по июнь включительно) определение резус-фенотипа эритроцитов было выполнено у 404 человек, лиц с заболеваниями системы крови и здоровых лиц, у которых были проблемы

в идентификации эритроцитарного фенотипа системы Резус. Ослабление экспрессии антигена RhD выявлено у 73 лиц, которым было проведено генотипирование для идентификации типов антигена RhD weak после получения информированного согласия. Часто встречающиеся типы *RHD*D weak type 1–3* были определены у 70 лиц (табл. 1). Вариант *RHD*D weak type 1* во всех случаях ($n = 18$) сочетался с фенотипом CcDwee, вариант *RHD*D weak type 3* сочетался с тем же фенотипом в подавляющем большинстве случаев – у 42 из 44 лиц, еще у 1 человека определили фенотип CCDwee. Один образец эритроцитов с *RHD*D weak type 3* имел нехарактерный фенотип ccDwee. Вариант *RHD*D weak type 2* во всех случаях сочетался с относительно редким фенотипом ccDwEe. Серологические характеристики эритроцитов приведены в табл. 2.

Агглютинация эритроцитов RhD weak type 1 с Цоликлоном анти-D супер класса IgM на плоскости (метод 1) формировалась ко 2–3-й минуте и была мелкой. В реакции солевой агглютинации (метод 2) разведение анти-D IgM-антител колебалось от 1:2 до 1:32. В методе 3 получен положительный результат на 1+...3+. В непрямом антиглобулиновом методе в классической постановке (метод 4) агглютинация эритроцитов появлялась в интервалах на 1–3 мин позже агглютинации эритроцитов с нормальным антигеном RhD, а в гелевых картах (метод 5) сила реакции была на 1+...3+.

Агглютинация эритроцитов RhD weak type 2 с Цоликлоном анти-D класса IgM (метод 1) отсутствовала у всех 8 образцов эритроцитов. В реакции солевой агглютинации (метод 2) положительный результат получен в разведении анти-D IgM-антител от 1:8 до 1:64. В гелевых картах (метод 3) наблюдали реакцию на 1+...2+ в 2 из 8 образцов. Методы, основанные на непрямом антиглобулиновом тесте, были более чувствительны. В непрямой пробе Кумбса в классической постановке (метод 4) агглютинация эритроцитов

появлялась в интервалах на 2–3 мин позже агглютинации эритроцитов с нормальным антигеном RhD, а в гелевых картах (метод 5) сила реакции была на 4+ только у 4 из 8 образцов эритроцитов.

Эритроциты с RhD weak type 3 формировали на плоскости мелкую агглютинацию в основном к 1–3-й минутам (метод 1). В реакции солевой агглютинации разведение анти-D моноклонального реагента колебалось от 1:8 до 1:1024, в гелевых картах сила реакции составляла от 2+ до 4+. Методы с применением неполных анти-D-антител (методы 4 и 5) позволяли выявить присутствие антигена RhD weak во всех образцах эритроцитов, сила реакции в геле составляла от 3+ до 4+.

Были идентифицированы 3 новых аллельных варианта гена *RHD*: Dweak type 67, Dweak type G255R, Dweak type (IVS5-38del4) (см. табл. 1). Эритроциты с антигеном RhD weak type 67 не реагировали с Цоликлоном анти-D супер на плоскости, но взаимодействовали с анти-D в реакции солевой агглютинации в разведении 1:2 (разведение в контроле 1:4000), а также в классической непрямой пробе Кумбса (мелкая агглютинация ко 2-й минуте) и в гелевом методе в ID-картах LISS/Coombs (сила агглютинации 3+) и в картах ID Diaclon (сила агглютинации 1+) (см. табл. 2). Эритроциты, экспрессирующие RhD (G255R), не взаимодействовали с Цоликлоном анти-D супер на плоскости и не реагировали в гелевом методе в картах ID Diaclon, но реагировали с анти-D в реакции агглютинации в солевой среде в разведении 1:2 (разведение в контроле 1:2000), в классической непрямой пробе Кумбса (мелкая агглютинация ко 2-й минуте) и в гелевом методе в ID-картах LISS/Coombs (сила агглютинации 4+), однако показали отрицательный результат в гелевом методе в картах ID Diaclon. Эритроциты, содержащие тип RhD (IVS5-38del4), не реагировали с Цоликлоном анти-D на плоскости и с анти-D в реакции солевой агглютинации (разведение в контроле 1:4000), но показали

Таблица 1. Типы слабых вариантов антигена D

Table 1. Types of D weak antigen variants

Тип RHD*D weak Type of RHD*D weak	Полиморфизм Polymorphism	Фенотип Phenotype	Число обследованных пациентов Number of patients
D weak type 1	c.809T>G p.Val270Gly	CcD ^w ee	18
D weak type 2	1154G>C p.Gly385Ala	ccD ^w Ee	8
D weak type 3	c.8 C>G p.Ser3Cys	CcD ^w ee ccD ^w ee CCD ^w ee	42 1 1
D weak type 67	c.722C>T p.Thr241Ile	ccD ^w Ee	1
D weak type G255R	c.763G>A p.Gly255Arg	CcD ^w ee	1
D weak type JVS5-38del4	c.802-38 del tctc – нет данных c.802-38 del tctc – no data	CcD ^w ee	1

Таблица 2. Серологическая характеристика эритроцитов с разными типами weak D

Table 2. Serological characterization of red blood cells with different types of weak D

№	Тип weak D Type of weak D	Реакция прямой агглютинации с анти-D IgM Direct agglutination reaction with anti-D IgM			Реакция непрямо́й агглютинации с анти-D IgG Indirect agglutination reaction with anti-D IgG	
		Метод 1 (время появления агглютинации), мин Method 1 (time of agglutination occurrence), minute	Метод 2 (разведение антител) Method 2 (antibodies dilution)	Метод 3 (IgM + IgG) (сила агглютинации) Method 3 (IgM + IgG) (agglutination strength)	Метод 4 (время появления агглютинации), мин Method 4 (time of agglutination occurrence), minute	Метод 5 (сила агглютинации) Method 5 (agglutination strength)
1	D weak type 1	2–3	1:2–1:32	1+...3+	1–3	1+...3+
2	D weak type 2	Отрицательная Negative	1:8–1:64	1+...2+	2–3	4+
3	D weak type 3	1–3	1:8–1:1024	2+...4+	20 с – 2 мин	3+...4+
4	D weak type 67	Отрицательная Negative	1:2	1+	2	3+
5	D weak type RH G255R	Отрицательная Negative	1:2	Отрицательная Negative	2	4+
6	D weak type JVS5	Отрицательная Negative	Отрицательная Negative	Нет данных No data	4	4+

положительный результат в классическом варианте непрямо́й пробы Кумбса (мелкая агглютинация к 4-й минуте) и в гелевом методе в ID-картах LISS/Coombs (сила агглютинация 4+) (реакцию в гелевом методе в картах ID Diaclon не выполняли).

Обсуждение

Эритроциты с разными типами антигена RhD weak демонстрируют разнообразие серологических свойств, вплоть до отсутствия реакции агглютинации в методах с применением анти-D-реагентов [21], что доказывает необходимость совершенствования генетического типирования и его широкого внедрения в практическую трансфузиологию в целях профилактики аллоиммунизации реципиентов и развития у них посттрансфузионных осложнений.

Наше исследование продолжает работу по изучению причин ослабления экспрессии антигена RhD у россиян, что позволит при увеличении объема сведений дать иммуногенетическую характеристику российской популяции. По объединенным сведениям представленной и ранее опубликованных [20, 22] работ, можно констатировать выявление у обследованных 136 россиян 9 типов гена *RHD*D weak*. Чаще всего у обследованных лиц встречались типы *RHD*D weak type 3* (55,15 %) и *RHD*D weak type 1* (26,47 %), в том числе в 1 случае *RHD*D weak type 1.1* (0,735 %). Остальные 7 типов гена *RHD*D weak* имели следующие частоты: *RHD*D weak type 2* – 12,5 %, *RHD*D weak type 15* – 2,21 %, *RHD*D*

weak type 4.2 (DAR), *type 6*, *type 67*, *RHD (G255R)*, *RHD (IVS5-38del4)* – по 0,735 % каждый.

Первое упоминание делеции 4 нуклеотидов – с.802-38delctc – в интроне 5 гена *RHD*, повлекшей формирование фенотипа RhDel с количеством D-детерминант 26 на 1 эритроцит, было описано в публикации Т. Wagner и соавт. как *RHD (IVS5-38delctc)* [23] (по классификации ISBT *RHD*01N.58*). Для эритроцитов с фенотипом RhDel характерно малое количество антигенных детерминант без утраты каких-либо эпитопов, но иммуногенность для D-отрицательных реципиентов. При исследовании таких эритроцитов серологическими методами присутствие RhD-антигена может быть пропущено, что представляется опасным, поскольку такой донор будет отнесен к D-отрицательному контингенту. В исследованиях Р. L. Mollison и соавт. установлено, что для аллоиммунизации D-отрицательных реципиентов достаточно попадания в их организм всего 30 микролитров D-положительных эритроцитов [24] или суммарно от 10 до 30 тыс. D-детерминант, т.е. значительно меньше, чем на всех эритроцитах с фенотипом RhDel, описанном Т. Wagner и соавт. Фенотип RhDel относят к евразийскому кластеру. В работах I. von Zabern и W.A. Flegel были описаны доноры с делецией IVS5-38del4 в гене *RHD*, но без нарушения экспрессии антигена на эритроцитах, что указывало, по их мнению, на вариант полиморфизма коротких tandemных повторов [25]. В нашем случае антиген RhD

(IVS5-38del4) выявляли только в непрямой пробе Кумбса, что указывало на снижение его экспрессии. Возможно, следует исследовать присутствие парциальных антигенов RhDFR-1 и RhDFR-3, которые тесно связаны с делецией IVS5-38del4 [25].

Мутация *RHD(G255R)* была описана в базе GenBank под номером JQ405074 в 2012 г. с характерной заменой нуклеотидов с.G763A, которая приводила к замене глицина на аргинин в позиции 255 белковой молекулы. Позже эта мутация была описана Y. Fichou и соавт. [26]. Серологическую характеристику эритроцитов донора с этой мутацией описали A. Doescher и соавт. в RhesusBase [8] в том же году: присутствие антигена RhD можно было четко подтвердить в реакции агглютинации с неполными анти-D-антителами – сила реакции колебалась от 2+ до 3+ с моноклональными антителами от разных гибридом, с полными анти-D-антителами сила реакции составила 1+. В нашем наблюдении эритроциты донора не реагировали с Цоликлонами анти-D на плоскости (метод 1), но показали положительный результат с теми же реактивами в реакции солевой агглютинации (за счет увеличения времени инкубации) (метод 2) и в непрямой пробе Кумбса с анти-D IgG-антителами (методы 3 и 4): в классическом варианте исполнения методики время появления агглютинации отставало от положительного контроля на 2 мин, а в гелевом методе в картах LISS/Coombs силу реакции оценивали на 4+.

Формирование гена *RHD*D weak type 67* связано с заменой с.C722T (GenBank FM201787, 2008), что приводит к появлению аминокислоты изолейцина в позиции 241 белковой молекулы – p.T241I. Аллель относят к евразийскому кластеру D. Серологические свойства антигена не были описаны. В нашем исследовании (см. табл. 2) показано, что указанный антиген можно определить с помощью анти-D IgM-антител в реакции солевой агглютинации, но лучше он выявляется при непрямой пробе Кумбса с анти-D IgG-антителами с помощью гелевой методики: силу агглютинации оценивали на 4+. Таким образом, результаты наших исследований дополняют сведения по серологической характеристике редких аллельных вариантов слабого антигена RhD.

Выявление антигенов RhD weak как у доноров, так и у реципиентов имеет большое значение для профилактики анти-D-аллоиммунизации. При этом наиболее эффективным методом определения типа *RHD*D weak* является генотипирование. Генотипирование доноров важно для предупреждения аллоиммунизации резус-отрицательных лиц, которым могут быть перелиты эритроциты, содержащие антиген RhD weak. Такой подход позволяет предупредить образование анти-D-антител у 98–99 % пациентов [27]. Доноры, на эритроцитах которых присутствует антиген RhD weak, должны быть отнесены к резус-положительным, и их кровь не должна быть перелита резус-отрицательным пациентам. Для пациентов это имеет значение в контексте тактики переливания эритроцитосодержащих сред. Например, в американской трансфузиологической практике рекомендовано переливание реципиентам с RhD weak type 1–3 эритроцитов от D-положительных доноров для экономии резус-отрицательных эритроцитосодержащих сред. Беременным женщинам с теми же типами слабого антигена RhD не рекомендовано введение антирезусного иммуноглобулина. Американские специалисты по трансфузиологии разработали рекомендации, согласно которым постулируется обязательное проведение генотипирования для выявления гена *RHD*D weak* и идентификации его типов [28]. Важно идентифицировать присутствие парциальных вариантов антигена RhD у реципиентов, так как они будут вырабатывать антитела к отсутствующим у них эпитопам.

Заключение

Варианты антигенов RhD могут быть идентифицированы только при молекулярно-генетическом исследовании. Серологически слабые варианты антигенов могут быть выявлены при использовании моноклональных антител как минимум 2 серий или, что предпочтительнее, применением 2 разных методик. Наиболее надежным методом серологического определения слабых антигенов является гелевый метод. Присутствие аллельных вариантов антигенов RhD можно заподозрить по расхождению результатов разных серологических методов исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Scott M.L. The complexities of the Rh system. Vox Sang 2004;(suppl. 1):S58–62. DOI: 10.1111/j.1741-6892.2004.00431.x
2. Beckers E.A., Faas B.H., von der Borne A.E. et al. The R0Har Rh:33 phenotype results from substitution of exon 5 of the RHCE gene by corresponding exon of the RHD gene. Br J Haematol 1996;92(3):751–7. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.382918.x.
3. Scott M. Section 1A. Rh serology. Coordinator's report. Transfus Clin Biol 2002;9(1):23–9. DOI: 10.1016/S1246-7820(01)00211-7.
4. Daniels G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. Br J Haematol 2013;161(4):461–70. DOI: 10.1111/bjh.12275.

5. Kwon D.H., Sandler S.G., Flegel W.A. DEL phenotype. *Immunohematology* 2017;33(3):125–32.
6. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature* 1946;158:25–6. DOI: 10.1038/158025c0.
7. Agre P.C., Davies D.M., Issit P.D. et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion* 1992;32(1):86–7. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1992.32192116441.x.
8. Rhesus base website, <http://www.uniulm.de/fwagner/RH/RB>.
9. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93(1):385–93.
10. Avent N.D., Madgett T.E., Lee Z.E. et al. Molecular biology of Rh protein and relevance to molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2006;8(13):1–20. DOI: 10.1017/S1462399406010969.
11. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95(8):2699–708. DOI: 10.1016/S0887-7963(01)80057-2.
12. Wagner F.F., Flegel W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95(12):3662–8. DOI: 10.1016/S0887-7963(01)80058-4.
13. Flegel W.A., Wagner F.F. Molecular genetics of RH. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 2):109–15.
14. 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(6):1059–69. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02102.x.
15. Wagner F.F., Ladewig B., Angert K.S. et al. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood* 2002;100(1):306–11. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0320.
16. Wagner T., Kormoczi G.F., Buchta C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45(4):520–6. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2005.04256.x.
17. Dogic V., Bingleac-Popovic J., Babic I. et al. Distribution of weak D types in Croation population. *Transfus Med* 2011;21(4):278–9. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2011.01071.x.
18. Rodrigues M.J., Rodrigues F., Tilley L. et al. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion* 2006;46(suppl.):141A–2A (abstract). DOI: 10.1111/j.1537-995.2006.01023_1.x.
19. St-Louis M., Richard M., Cote M. et al. Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology* 2011;27(1):20–4.
20. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Молекулярно-серологические характеристики типов слабого антигена D системы Резус. *Терапевтический архив* 2016;88:78–83. DOI: 10.17116/terarkh201688778-83. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Molecular-serological characteristics of weak D antigen types of Rhesus system. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2016;88:78–83. (In Russ.)].
21. 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., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Case of exposure of Rhesus system antigen weak D type 15. *Hematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2014;59(4):23–4. (In Russ.)].
22. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Случай выявления антигена weak D type 4.2 (категория DAR) системы Резус. *Онкогематология* 2015;10(3):70–2. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-70-72. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Case of exposure of Rhesus system antigen weak D type 4.2 (category DAR). *Onkoghematologiya = Oncohematology* 2015;10(3):70–2. (In Russ.)].
23. Wagner T., Koermoezi G.F., Buchta G. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45(4):520–6. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2005.04256.x.
24. Mollison P.L., Engelfriet C.P., Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th edn. Oxford: Blackwell Science, 1997.
25. von Zabern I., Flegel W.A. IVS5-38del4 deletion in the RHD gene does not cause a DEL phenotype: relevance for RHD alleles including DFR-3. *Transfusion* 2007;47(8):1552–5. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01353.x.
26. Fichou Y., Le Marechal C., Jamet D. et al. Establishment of a medium-throughput approach for the genotyping of RHD variants and report of nine novel rare alleles. *Transfusion* 2013;53(8):1821–8. DOI: 10.1111/trf.12009.
27. Sandler S.G., Flegel W.A., Westhoff C.M. et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with serologic weak D phenotype. *Transfusion* 2015;55(3):680–9. DOI: 10.1111/trf.12941.
28. *Standards for blood banks and transfusion service*. 29th edn. Ed.: J. Levitt. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks, 2014.

Вклад авторов

Л.Л. Головкина: разработка дизайна исследования, интерпретация данных, написание текста статьи;
 Р.С. Каландаров: написание текста статьи;
 О.С. Пшеничникова: выполнение прямого секвенирования;
 В.Л. Сурин: интерпретация данных прямого секвенирования;
 А.Г. Стремоухова, Б.Б. Хасигова: выполнение серологического раздела работы.
 Т.Д. Пушкина: выполнение полимеразной цепной реакции с коммерческими праймерами.

Authors' contributions

L.L. Golovkina: research design, data interpretation, article writing;
 R.S. Kalandarov: article writing;
 O.S. Pshenichnikova: direct sequencing;
 V.L. Surin: interpretation of direct sequencing data;
 A.G. Stremoukhova, A.G. Khasigova: serological methods;
 T.D. Pushkina: polymerase chain reaction with commercial primers.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.Л. Головкина/L.L. Golovkina: <https://orcid.org/0000-0002-9423-2640>
 Р.С. Каландаров/R.S. Kalandarov: <https://orcid.org/0000-0002-7730-8367>
 О.С. Пшеничникова/O.S. Pshenichnikova: <http://orcid.org/0000-0001-5752-8146>
 В.Л. Сурин/V.L. Surin: <http://orcid.org/0000-0002-1890-4492>
 А.Г. Стремоухова/A.G. Stremoukhova: <http://orcid.org/0000-0002-1705-7535>
 Т.Д. Пушкина/T.D. Pushkina: <http://orcid.org/0000-0002-8801-5578>
 Б.Б. Хасигова/B.B. Khasigova: <http://orcid.org/0000-0002-3974-2189>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.