

DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-73-82



Молекулярно-серологические характеристики антигена А системы АВО

Л.Л. Головкина, Р.С. Каландаров, О.С. Пшеничникова, В.Л. Сурин, А.Г. Стремоухова, Т.Д. Пушкина, Г.В. Атрощенко, О.С. Калмыкова, 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. Одним из полиморфных антигенов в системе АВО является антиген А, включающий много аллельных вариантов с различной экспрессией. Иммунологические методы определения группы крови системы АВО имеют ограничения в применении, в том числе вследствие наличия у людей слабоэкспрессируемых антигенов. Для правильного определения групповой принадлежности по системе АВО все большее значение приобретает генетическое типирование. Известны 89 аллелей гена *ABO**A. Знание полиморфизмов гена *ABO**A и их распространенности способствует предупреждению ошибок при определении группы крови доноров и реципиентов.

Цель исследования – описать варианты аллелей гена *ABO**A у россиян и дать серологическую характеристику кодируемых ими антигенов.

Материалы и методы. Обследована кровь 14 000 человек. Группу крови определяли с применением Цоликлонов анти-А, анти-Асл (анти-А слабый), анти-В, лектина (анти-А₁) и гелевых карт. Молекулярное исследование полиморфизмов гена *ABO**A проведено 151 человеку. Применяли методы полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами и прямого секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Обнаружены 7 различных аллелей *ABO**A, включая аллели *ABO**A1.01 и *ABO**A1.02. У 118 лиц со слабым антигеном А самым частым был аллель *ABO**A2.01 (87,29 %). Обнаружены редкие аллели *ABO**A2.06 (5,93 %), *ABO**AW.06 (4,23 %), *ABO**A2.09 (0,85 %) и *ABO**Ax (1,70 %). Описаны серологические характеристики вариантов антигенов А в зависимости от генотипов, найдены варианты А₁, А₂, А₃ и очень слабый А. Экстраагглютинины α1 отсутствовали у всех лиц с ослабленным антигеном А.

Заключение. Мелкая или смешанная агглютинация с Цоликлонами или расслоение эритроцитов в геле позволяют предположить присутствие антигена А с ослабленной экспрессией. С помощью современных молекулярных методов можно идентифицировать редкие аллели генов и генотипы. Эритроцитарная геномика помогает разрешить неоднозначность результатов серологических методов исследования, позволяет понять истинные механизмы формирования того или иного фенотипа у лиц и вносит полноценный вклад в обеспечение иммунологической безопасности трансфузий гемокомпонентов.

Ключевые слова: полиморфизм гена *ABO**A, экспрессия антигена А, генетическое типирование

Для цитирования: Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С. и др. Молекулярно-серологические характеристики антигена А системы АВО. Онкогематология 2021;16(4):73–82. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-73-82.

Molecular serological characteristics of ABO system A antigen

L.L. Golovkina, R.S. Kalandarov, O.S. Pshenichnikova, V.L. Surin, A.G. Stremoukhova, T.D. Pushkina, G.V. Atroshchenko, O.S. Kalmykova, B.B. Khasigova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Larisa Leonidovna Golovkina largol@mail.ru

Background. One of the polymorphic antigens in the ABO system is antigen A, which includes many allelic variants with different expression. Immunological methods for determining the blood group of the ABO system have limitations in their use, including due to the presence of weakly expressed antigens in humans. For the correct determination of blood group according to the ABO system, genetic typing is becoming increasingly important. 89 alleles of the *ABO**A gene are known. Knowledge of *ABO**A gene polymorphisms and their prevalence contributes to the prevention of errors in determining the blood group of donors and recipients.

Objective: to describe variants of *ABO**A gene alleles in Russians and serological characteristics of the antigens encoded by them.

Materials and methods. The blood of 14,000 people was examined. The blood group was determined using anti-A, anti-Aweak, anti-B, lectin (anti-A₁) and gel cards. A molecular study of *ABO**A gene polymorphisms was conducted in 151 people. Polymerase chain reaction with sequence-specific primers and direct Sanger sequencing were used.

Results. 7 different *ABO**A alleles were detected, including the *ABO**A1.01 and *ABO**A1.02 alleles. In 118 individuals with a weak A antigen, the *ABO**A2.01 allele was the most frequent (87.29 %). Rare alleles *ABO**A2.06 (5.93 %), *ABO**AW.06 (4.23 %), *ABO**A2.09 (0.85 %) and *ABO**Ax (1.70 %) were found. Serological characteristics of A antigens variants depending on genotypes are described, variants A₁, A₂, A₃ and very weak A were detected. Extraagglutinins α1 were absent in all persons with weakened A antigen.

Conclusion. Small or mixed agglutination with Coliclones or red blood cell stratification in the gel suggest the presence of antigen A with weakened expression. Modern molecular methods make it possible to identify rare gene alleles and genotypes. Erythrocyte genomics helps to resolve the ambiguity of the serological results allows understanding the true mechanisms of particular phenotype formation and makes a contribution to ensuring the immunological safety of blood components transfusions.

Key words: *ABO**A gene polymorphism, A antigen expression, genetic typing

For citation: Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Pshenichnikova O.S. et al. Molecular serological characteristics of ABO system A antigen. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2021;16(4):73–82. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-73-82.

Введение

Система АВО — важнейшая для практической трансфузиологии антигенная система эритроцитов. Одним из полиморфных антигенов в системе АВО является антиген А, который имеет много аллельных вариантов, отличающихся как количеством антигенных А-детерминант на поверхности эритроцитов, так и строением самих эпитопов. В связи с этим экспрессия (выраженность) разных вариантов антигена А на поверхности эритроцитов различается в больших пределах. Современные серологические методы не всегда способны эффективно выявлять слабые варианты антигена А, что может приводить к ошибкам при определении группы крови системы АВО и в дальнейшем к посттрансфузионным реакциям и осложнениям. Многообразие аллельных вариантов антигена А обусловлено мутациями в гене *ABO**A. В настоящее время известны 89 аллелей гена *ABO**A. Для правильного определения групповой принадлежности по системе АВО все большее значение приобретают молекулярные методы установления аллелей гена *ABO**A. Знание полиморфизмов гена *ABO**A и их распространенности способствует предупреждению ошибок при определении группы крови доноров и реципиентов. Данное исследование является продолжением работы по изучению полиморфизма аллелей системы АВО у россиян.

Цель исследования — описать варианты аллелей гена *ABO**A у россиян и дать серологическую характеристику кодируемых ими антигенов.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эритроциты и сыворотки 14 000 пациентов с заболеваниями системы крови и здоровых лиц, обратившихся в лабораторию по поводу проблем в определении группы крови системы АВО в других лечебно-профилактических учреждениях и станциях переливания крови г. Москвы и других регионов России. Образцы ДНК из ядерных

клеток периферической крови выделяли после получения информированного согласия у лиц, для которых серологические методы не дали однозначных результатов.

Эритроциты исследовали методом гемагглютинации на плоскости с использованием Цоликлонов анти-А (активный компонент — смесь моноклональных антител класса иммуноглобулинов М (IgM), секретируемых 2 мышинными гибридами А-90/16 и А-86/3, — вариант R и/или смесь моноклональных антител класса IgM, секретируемых 2 мышинными гибридами А-90/16 и 9113D10, — вариант F), анти-Асл (анти-А слабый, активный компонент — моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышинной гибридомой А-86/3 и реагирующие с эритроцитами, содержащими антигены А₁, А₂, А₃, Ax), анти-В (активный компонент — моноклональные антитела класса IgM, секретируемые мышинной гибридомой В-85/2-В8, — вариант R или смесь моноклональных антител класса IgM, секретируемых мышинными гибридами В-85/2-В8 и В-85/1-D2, — вариант F), лектина *Dolichus biflorus* для идентификации антигена А₁ (не реагирует с эритроцитами, содержащими антиген А₂ или более слабые формы антигена А; в отдельных случаях дает неполную мелкозернистую агглютинацию с эритроцитами фенотипов А₂, А₃, Ax и т.д.) фирмы «Гематолог» (Россия), а также с помощью гелевых карт DiaClon ABO/D + Reverse Grouping фирмы BioRad (Швейцария).

Геномную ДНК выделяли с использованием реактивов фирмы VAG (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 выполняли с праймерами для выявления генотипов системы АВО (ABO-TYPE, ABO-variants TYPE) производства той же

фирмы по методике производителя. Детекцию полученных результатов осуществляли посредством электрофореза продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл) в ТВЕ буфере (из 10 × ТВЕ с добавлением бидистиллированной воды готовили рабочий раствор, который содержал 1 М Tris base, 0,83 М Boric acid, 10 mM EDTA, pH составляет 8,0) 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. Прямое секвенирование проводили по методу Сэнгера с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1.

Результаты

Всего было выполнено 14 000 определений по системе АВО серологическими методами. От общего числа обследованных лица с группами крови А и АВ составили 33,2 и 6,3 % соответственно. При этом было обнаружено ослабление экспрессии антигена А в 5,2 % случаев у лиц со II группой крови и в 2,3 % случаев у лиц с IV группой крови.

Исследование на молекулярном уровне было выполнено 118 индивидуумам с ослабленной экспрессией антигена А; кроме того, 33 человека с нормальной выраженностью антигена А были обследованы по поводу посттрансфузионного химеризма. Общие генотипы обследованных лиц с группами крови А и АВ без расшифровки аллелей распределились следующим

образом: *ABO*AI11* выявили у 6 человек, *ABO*AI12* – у 1, *ABO*AI10* – у 17, *ABO*AI1B1* – у 10, *ABO*AI2O* – у 83, *ABO*AI2B1* – у 27; и на эритроцитах 7 человек антиген А был очень слабо выражен в генотипах с расшифрованными аллелями *ABO*AW.06 O.01.01* ($n = 4$), *ABO*AW.06 B.01.01* ($n = 1$), *ABO*Ax O.01.01* ($n = 1$) и *ABO*Ax O.01.02* ($n = 1$).

При молекулярном исследовании генотипов 151 человека обнаружены 7 различных аллелей *ABO*A*. По результатам прямого секвенирования референсный аллель *ABO*AI.01* определили у 30 человек (в том числе у 4 в гомозиготном состоянии, т. е. выявлено 34 аллеля), аллель *ABO*AI.02* – у 6 человек (табл. 1). Самым частым в группе аллелей, ослабляющих экспрессию антигена А, оказался классический аллель *ABO*AI2.01* – в 103 (87,29 %) из 118 случаев. Остальные аллели встречались значительно реже: *ABO*AI2.06* – в 7 (5,93 %), *ABO*AW.06* – в 5 (4,23 %), *ABO*AI2.09* – в 1 (0,85 %). В 2 (1,70 %) случаях в полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами (ПЦР-ССП) был идентифицирован аллель *ABO*Ax*. Обозначение аллеля *ABO*Ax* относится к старой номенклатуре, в новую номенклатуру такой аллель не включен. Поскольку не было проведено прямое секвенирование, установить, какому варианту по новой номенклатуре соответствует данный аллель, не удалось.

У всех обследованных ($n = 151$) проверяли экспрессию аллельных вариантов антигена А в зависимости от генотипов. Аллель *ABO*AI.01* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии с аллелями *ABO*AI.02*, *ABO*AI2.01* и с разными аллелями гена *ABO*O* фенотипически проявлял себя как антиген A_1 . В гетерозиготном состоянии с большинством аллелей *ABO*B.01.01*

Таблица 1. Частота аллельных полиморфизмов гена *ABO*A* по результатам молекулярного исследования (151 человек, 158 аллелей)

Table 1. Frequency of *ABO*A* allele polymorphisms ($n = 151$, 158 alleles)

№	Аллель (новая номенклатура) Allele (new nomenclature)	Частота аллелей Allele frequency		Характерные мутации Characteristic mutations
		абсолютная absolute	относительная, % relative %	
1	<i>AI.01</i>	34	–	Референсная Reference
2	<i>AI.02</i>	6	–	c.467C>T
3	<i>A2.01</i>	103	87,29*	c.467C>T, c.1059delC/N
4	<i>A2.06</i>	7	5,93*	c.1059delC/N
5	<i>A2.09</i>	1	0,85*	c.467C>T, c.526C>G, c.1059delC/N
6	<i>AW.06</i>	5	4,23*	c.502C>G
7	<i>Ax</i>	2	1,70*	Нет данных No data
	<i>Всего</i> <i>Total</i>	158	100	

*От числа аллелей с ослабленной экспрессией антигена А (118 аллелей).

*From number of alleles with weakened antigen A expression (118 alleles).

(с 4 из 6) аллель *ABO*A1.01* фенотипически также проявлял себя как антиген A_1 (табл. 2) с типичной серологической характеристикой (табл. 3, избирательный пример Т.О.Ю.): эритроциты формировали полную

Таблица 2. Частота генотипов обследованных лиц с группами крови А и АВ
Table 2. Genotypes frequency of the examined persons with blood group A and AB

№	Генотипы (новое обозначение) Genotypes (new nomenclature)	Частота генотипа Genotype frequency		Экспрессия антигена А (фенотип) Antigen A expression (phenotype)
		абсолютная absolute	относительная, % relative, %	
1	<i>A1.01 A1.01</i>	4	2,65	A_1
2	<i>A1.01 A1.02</i>	2	1,32	A_1
3	<i>A1.01 A2.01</i>	1	0,67	A_1
4	<i>A1.01 O.01.01</i>	14	9,27	A_1
5	<i>A1.01 O.01.02</i>	3	1,98	A_1
6	<i>A1.01 B.01.01</i>	6	3,96	У 4 – A_1B , у 1 – A_3B , у 1 – АслВ In 4 – A_1B , in 1 – A_3B , in 1 – AweekB
7	<i>A1.02 B.01.01</i>	3	1,98	A_1B
8	<i>A1.02 B.01.08</i>	1	0,67	A_1B
9	<i>A2.01 B.01.01</i>	24	15,89	A_2B
10	<i>A2.01 B.01.02</i>	1	0,67	A_2B
11	<i>A2.01 O.01.01</i>	42	27,81	A_2
12	<i>A2.01 O.01.02</i>	4	2,65	A_2
13	<i>A2.01 O.01.05</i>	1	0,67	A_2
14	<i>A2.01 O.01.11</i>	7	4,62	A_2
15	<i>A2.01 O.01.12</i>	6	3,96	A_2
16	<i>A2.01 O.01.13</i>	2	1,32	A_2
17	<i>A2.01 O.01.26</i>	4	2,65	A_2
18	<i>A2.01 O.01.44</i>	2	1,32	A_2
19	<i>A2.01 O.01.46</i>	1	0,67	A_2
20	<i>A2.01 O.01.68</i>	1	0,67	A_2
21	<i>A2.01 O.02.01</i>	6	3,96	A_2
22	<i>A2.01 O.02.02</i>	1	0,67	A_2
23	<i>A2.06 O.01.01</i>	4	2,65	У 1 – A_1 , у 3 – A_3 In 1 – A_1 , in 3 – A_3
24	<i>A2.06 O.02.01</i>	1	0,67	A_2
25	<i>A2.06 B.01.01</i>	2	1,32	A_2B
26	<i>A2.09 O.01.01</i>	1	0,67	A_2
27	<i>AW.06 O.01.01</i>	4	2,65	Очень слабая Very weak
28	<i>AW.06 B.01.01</i>	1	0,67	Очень слабая Very weak
29	<i>Ax O.01.01</i>	1	0,67	Очень слабая Very weak
30	<i>Ax O.01.02</i>	1	0,67	Очень слабая Very weak
	<i>Всего Total</i>	<i>151</i>	<i>100</i>	

Таблица 3. Серологическая характеристика вариантов антигена A системы ABO

Table 3. Serological properties of antigen A in various genotypes

№	Ф.И.О. Name	Результаты реакции агглютинации и предполагаемый фенотип Agglutination test results and supposed phenotype						Генотип ABO* (старая классификация) ABO* genotype (old classification)
		с Цоликлонами и лектином with Coliclonones and lectin				в геле с анти-А in gel with anti-A	трактовка interpretation	
		анти-А anti-A	анти-А ₁ anti-A ₁	анти-А слабый anti-A weak	анти-В anti-B			
1	Т.О.Ю. T.O.Yu.	4+	4+	4+	4+	4+	A ₁ B	A1.01 B.01.01
2	М.Н.Ю. M.N.Yu.	4+	Отрицательный Negative	4+	4+	4+	A ₂ B	A2.01 B.01.01
3	Г.Л.О. G.L.O.	4+	Отрицательный Negative	4+	Отрицательный Negative	4+	A ₂	A2.01 O.01.01
4	Б.А.Ю. B.A.Yu.	4+	Отрицательный Negative	4+	Отрицательный Negative	4+	A ₂	A2.09 O.01.01
5	Ю.Э.К. Yu.E.K.	100 % АЭ мелкая к 3-й минуте 100 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	100 % АЭ мелкая к 3-й минуте 100 % EA fine by the 3 rd minute	4+	2+	АслВ AweekB	A1B1
6	П.В.Д. P.V.D.	50 % АЭ мелкая к 3-й минуте 50 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	50 % АЭ мелкая к 3-й минуте 50 % EA fine by the 3 rd minute	4+	Расслоение эритроцитов Erythrocyte stratification	A ₃ B	A1B1
7	С.Д.А. S.D.A.	4+	Мелкая АЭ EA fine	4+	4+	4+	A ₂ B	A2.06 B.01.01
8	Х.А.В. Kh.A.V.	4+	Отрицательный Negative	4+	4+	4+	A ₂ B	A2.06 B.01.01
9	Х.М.Р. Kh.M.R.	4+	4+	100 % АЭ 4+ 100 % EA 4+	Отрицательный Negative	4+	A ₁	A2.06 O.01.01
10	Кас.А.В. Kas.A.V.	2+	Отрицательный Negative	4+ 5 % несклеенных эритроцитов 4+ 5 % non-agglutinated erythrocytes	Отрицательный Negative	2+ расслоение в геле 2+ stratification in gel	A ₃	A2.06 O.01.01
11	Кур.А.В. Kur.A.V.	2+...3+ Мелкая к 4-й минуте 2+...3+ Fine by the 4 th minute	Отрицательный Negative	4+ 5 % несклеенных эритроцитов 4+ 5 % non-agglutinated erythrocytes	Отрицательный Negative	2+ Расслоение в геле, присутст- вие эритроцитов в толще геля 2+ Stratification in the gel, the presence of erythrocytes in the thickness of the gel	A ₃	A2.06 O.01.01
12	Зим. Zim.	4+	1+	3+	Отрицательный Negative	4+	A ₂	A2.06 O.02.01
13	К.В.А. K.V.A.	4+	Отрицательный Negative	4+	Отрицательный Negative	4+	A ₂	A2.01 O.02.01

№	Ф.И.О. Name	Результаты реакции агглютинации и предполагаемый фенотип Agglutination test results and supposed phenotype					Генотип ABO* (старая классификация) ABO* genotype (old classification)	
		с Цоликлонами и лектином with Coliclonas and lectin				в геле с анти-А in gel with anti-A		трактовка interpretation
		анти-А anti-A	анти-А ₁ anti-A ₁	анти-А слабый anti-A weak	анти-В anti-B			
14	А.М.В. A.M.V.	Пылевидная АЭ 40 % несклеенных эритроцитов Dusty EA 40 % non-agglutinated erythrocytes	Отрицательный Negative	Пылевидная АЭ 40 % несклеенных эритроцитов Dusty EA 40 % non-agglutinated erythrocytes	4+	2+	Асл Aweek	AW.06 B.01.01
15	А.А.Ш. A.A.Sh.	Пылевидная АЭ 40 % несклеенных эритроцитов Dusty EA 40 % non-agglutinated erythrocytes	Отрицательный Negative	Пылевидная АЭ 40 % несклеенных эритроцитов Dusty EA 40 % non-agglutinated erythrocytes	Отрицательный Negative	1+	Асл Aweek	AW.06 O.01.01
16	М.П.Я. M.P.Ya.	80 % АЭ мелкая к 3-й минуте 80 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	80 % АЭ мелкая к 3-й минуте 80 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	Расслоение эритроцитов Erythrocyte stratification	Асл Aweek	AW.06 O.01.01
17	В.В.В. V.V.V.	90 % АЭ мелкая к 3-й минуте 90 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	90 % АЭ мелкая к 3-й минуте 90 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	2+	Асл Aweek	Ax O.01.01
18	Г.М.Ш. G.M.Sh.	50 % АЭ мелкая к 3-й минуте 50 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	50 % АЭ мелкая к 3-й минуте 50 % EA fine by the 3 rd minute	Отрицательный Negative	Расслоение эритроцитов Erythrocyte stratification	Асл Aweek	Ax O.01.02

Примечание. АЭ – агглютинация эритроцитов.

Note. EA – erythrocyte agglutination.

крупнолепестковую агглютинацию на 4+ со всеми реактивами анти-А (анти-А, анти-А₁, анти-Асл, анти-А лектин) как с Цоликлонами и лектинами в методе на плоскости, так и в гелевой методике. Фенотипически как А₁ проявлял себя также аллель ABO*A1.02.

Однако с 2 из 6 образцов эритроцитов с генотипом ABO*A1.01 B.01.01 были получены своеобразные результаты. В одном случае эритроциты имели серологическую характеристику антигена А₃ (см. табл. 3, избирательный пример П.В.Д.), в другом случае – серологическую характеристику Асл (см. табл. 3, избирательный пример Ю.Э.К.). Эритроциты этих 2 человек реагировали в серологических реакциях следующим образом: эритроциты П.В.Д. не взаимодействовали с Цоликлоном анти-А₁, с реактивами анти-А и анти-Асл формировали 50 % мелкую агглютинацию к 3-й минуте, в гелевом методе отмечали расслоение эритроцитов; эритроциты Ю.Э.К. не взаимодействовали с Цоликлоном анти-А₁, формировали полную, но мелкую агглютинацию к 3-й минуте с реактивами анти-А и анти-Асл, в гелевом методе с анти-А агглютинацию оценивали на 2+. У Ю.Э.К. ген ABO*A1.01 был определен в методе ПЦР-ССП, при этом было отмечено,

что этот ген, возможно, относится к какому-то подварианту, который с данными праймерами не определялся. Поскольку прямое секвенирование не было проведено, более точно установить принадлежность гена ABO*A1.01 у Ю.Э.К. не удалось.

Большинство слабых вариантов антигена А отнеслись к А₂. Такую характеристику получили эритроциты 106 индивидуумов с генотипами, представленными в табл. 2, № 9–22. Подробно взаимодействие этих эритроцитов представлено в табл. 3, избирательные примеры М.Н.Ю. с генотипом ABO*A2.01 B.01.01, Г.Л.О. с генотипом ABO*A2.01 O.01.01 и Б.А.Ю. с генотипом ABO*A2.09 O.01.01: эритроциты формировали полную агглютинацию с реактивами анти-А и анти-Асл, не взаимодействовали с Цоликлоном анти-А₁, в гелевом методе с анти-А агглютинацию оценивали на 4+. Типичные для антигена А₂ серологические свойства имели также эритроциты у лиц с генотипами ABO*A2.06 B.01.01, ABO*A2.06 O.02.01, ABO*A2.01 O.02.01 (см. табл. 2, № 24–26, и в табл. 3, избирательные примеры С.Д.А., Х.А.В., Зим., К.В.А.).

У 5 человек был установлен редкий аллельный вариант ABO*AW.06 в сочетании с аллелями ABO*O.01.01

и $ABO^*B.01.01$. При этом первоначально у 3 из них методом ПЦР-ССП был определен аллель $ABO^*AW.06/A^{el}$, т. е. имела место двойная интерпретация, которую мы без проведения прямого секвенирования расшифровать не смогли. Один из этих случаев был описан ранее [1, 2]. Прямым секвенированием у всех этих лиц был выявлен $ABO^*AW.06$. Серологически экспрессия таких эритроцитов была очень слабой (см. табл. 3, избирательные примеры А.М.В. с генотипом $ABO^*AW.06 B.01.01$, А.А.Ш. и М.П.Я. с генотипом $ABO^*AW.06 O.01.01$). У А.М.В. и А.А.Ш. эритроциты не реагировали с Цоликлоном анти- A_1 и давали пылевидную агглютинацию с 40 % несклеенных эритроцитов в реакциях с Цоликлонами анти-А и анти-Асл (при этом в гелевом методе реакция с эритроцитами А.М.В. была немного сильнее – 2+, чем с эритроцитами А.А.Ш. – 1+). У М.П.Я. эритроциты также не реагировали с анти- A_1 , с анти-А и анти-Асл реагировали несколько сильнее (80 % агглютинированных эритроцитов, мелкая агглютинация к 3-й минуте), но реакция в гелевом методе была слабее (расслоение эритроцитов).

У 7 человек был обнаружен аллель $A2.06$. При этом донора Х.М.Р. с генотипом $ABO^*A2.06 O.01.01$ по результатам серологических исследований можно было отнести к группе A_1 (см. табл. 3). В то же время у 3 доноров (см. табл. 3, избирательные примеры Кас.А.В. и Кур.А.В.), также имевших генотип $ABO^*A2.06 O.01.01$, данный аллель серологически проявлял себя как A_3 : с реактивом анти-А эритроциты Кас.А.В. давали реакцию 2+, эритроциты Кур.А.В. – реакцию 2+...3+ (мелкую к 4-й минуте); с реактивом анти- A_1 эритроциты обоих доноров давали отрицательную реакцию, с анти-Асл – реакцию 4+ с 5 % несклеенных эритроцитов; в гелевом методе – реакцию 2+ и расслоение в геле (у Кур.А.В. наблюдалось также присутствие эритроцитов в толще геля). Еще у одного донора с генотипом $ABO^*A2.06 O.02.01$ и у 2 доноров с генотипом $ABO^*A2.06 B.01.01$ отмечали типичный фенотип A_2 .

У 2 человек в ПЦР-ССП были идентифицированы генотипы $ABO^*Ax O.01.01$ и $ABO^*Ax O.01.02$. В обоих этих случаях экспрессия антигена А была очень слабой (см. табл. 2, № 29 и 30; и табл. 3, избирательные примеры В.В. В. и Г.М.Ш.).

У всех обследованных с группой крови А были идентифицированы естественные изогемаггюлины β . Экстрааггюлины $\alpha 1$ отсутствовали у всех лиц с ослабленным вариантом антигена А.

Обсуждение

Многообразие аллельных вариантов антигена А обусловлено либо миссенс-мутациями в гене ABO^*A (точечными заменами нуклеотидов в кодирующей части гена ABO^*A , ведущими к замене аминокислоты в соответствующем белковом продукте) либо сплайсинговыми мутациями (затрагивающими сайты сплайсинга или создающими новые сайты сплайсинга в интронных областях гена, что сопровождается либо

делецией смежного с мутацией экзона, либо нарушением удаления соответствующего интрона при процессинге первичного РНК-транскрипта). Многие сплайсинговые мутации приводят к сдвигу рамки считывания или к формированию стоп-кодона, что приводит к синтезу функционально неактивной А-гликозилтрансферазы [3].

В настоящее время в новой классификации выделено 89 аллелей гена ABO^*A : 2 аллеля ABO^*A1 ($ABO^*A1.01ref.$ – референсный, $ABO^*A1.02$), 20 аллелей ABO^*A2 ($ABO^*A2.01–2.20$), 7 аллелей ABO^*A3 , 50 аллелей ABO^*AW , 2 аллеля ABO^*Am , 8 аллелей ABO^*A^{el} [4].

Синтез гликозилтрансфераз, формирующих нормально экспрессированный антиген A_1 в генотипах ABO^*A1O , ABO^*A1A1 и ABO^*A1B в сочетании с классическим аллелем ABO^*B , кодируется аллелями $ABO^*A1.01$, $ABO^*A1.02$ и ABO^*A112 (последний аллель обозначен по старой номенклатуре, в новую номенклатуру не включен). Авторы настоящей работы выявили присутствие $ABO^*A1.01$ и $ABO^*A1.02$ у больных с заболеванием системы крови (см. табл. 1). Аллель $ABO^*A1.02$ отличается от референсного $ABO^*A1.01$ мутацией с.467C>T. Следует отметить, что в одном случае был обнаружен аллель ABO^*A112 , который представляет собой гибрид аллелей $ABO^*A1.02$ и $ABO^*B.01.01$ с характерной нуклеотидной заменой с.297A>G, но этот аллель, как не включенный в новую номенклатуру, был оценен как аллель $ABO^*A1.02$ – у обследованного определен генотип $ABO^*A1.02 B.01.08$ (см. табл. 2). Представляют интерес полученные авторами данные, что аллель $ABO^*A1.01$ в гетерозиготном состоянии в сочетании с аллелем $ABO^*B.01.01$ в 1 случае кодировал антиген A_3 и в 1 случае – антиген Асл, хотя в большинстве случаев в таком сочетании он серологически проявлялся как типичный A_1 .

Наиболее часто из вариантов антигена А с ослабленной экспрессией встречается антиген A_2 . Формирование аллеля ABO^*A2 происходит вследствие единичной замены с.467C>T (p.Pro156Leu) и делеции нуклеотида 1061C в экзоне 7, что приводит к формированию открытой рамки считывания за счет удлинения ее на 64 нуклеотида. Синтезируемый таким геном фермент A_2 -гликозилтрансфераза приобретает дополнительно 21 аминокислоту в С-концевой последовательности, что приводит к изменению активности фермента α -1,3-галактозаминотрансферазы, которая присоединяет меньше антигенных детерминант на мембрану эритроцитов, чем A_1 -трансфераза [5, 6].

Относительная частота фенотипов A_2 и A_2B приблизительно одинакова у лиц европеоидной расы, но дисбаланс в сторону увеличения частоты фенотипа A_2B можно наблюдать у лиц негроидной и монголоидной рас. Такой дисбаланс у последних можно частично объяснить присутствием у них В-трансферазы с повышенной активностью, которая в 2–5 раз более активно превращает субстанцию Н в антиген В. Как результат конкуренции между A_1 -трансферазой и сильной В-трансферазой за общую акцепторную субстанцию Н,

эритроциты могут экспрессировать недостаточное количество А-детерминант, и по серологическим критериям такой фенотип определяют как A_2B . Наиболее часто сильная В-трансфераза встречается у представителей некоторых популяций негроидной расы [7].

Молекулярные основы формирования аллеля ABO^*A_3 разнообразны. Первая миссенс мутация с.871G>A, приводящая к замене аминокислоты в молекуле белка, была обнаружена F. Yamamoto и соавт. [8]. Позже M. L. Varjas-Castro и соавт. описали дополнительные характерные мутации: с.467C>T (p.Prol56Leu), с.646T>A (p.Phe216Ile), с.681G>A, с.771C>T, с.829G>A (p. Val277Met) и с.1060delC, которые сочетались друг с другом или встречались отдельно [9].

Среди вариантов слабого антигена А выделен антиген A^{el} [10, 11]. Возникновение антигена A^{el} обусловлено вставкой гуанина в экзоне 7 в позициях нуклеотидов 798–804, что приводит к сдвигу в рамке считывания. Описано формирование фенотипа A^{el} вследствие формирования гибридного аллеля $A^{IV}-O^{IV}$ с 2 миссенс-мутациями с.467C>T и с.829G>A [12]. Подгруппа A^{el} (elution) названа так по методу, с помощью которого удается обнаружить присутствие этого антигена: эритроциты, содержащие антиген A^{el} , не агглютинируются антителами анти-А, однако адсорбируют их на своей поверхности. Адсорбированные антитела анти-А можно элюировать с поверхности эритроцитов специальными методами. Количество детерминант антигена A^{el} на 1 эритроците составляет в среднем $0,07$ ($0,001–0,014$) $\times 10^5$, что значительно меньше, чем количество часто встречающегося в популяции антигена A_1 — $10,5$ ($7,95–14,56$) $\times 10^5$. Фенотип A^{el} встречается редко: 1 на 100 тыс. обследованных, преимущественно среди лиц монголоидной расы. Этот редкий аллель локуса ABO передается по наследству.

В наших исследованиях среди лиц с ослабленной экспрессией антигена А в 87,29 % случаев (103 из 118 аллелей) определен аллель $ABO^*A_2.01$ по мутациям с.467C>T и с.1059delC/N. Аллель $ABO^*A_2.06$ с 1 делецией с.1059delC/N встретился в 5,08 % случаев (6 аллелей). Аллели $ABO^*A_2.05$ и $ABO^*A_2.09$ встретились в 0,85 % случаев (по 1 аллелю). Аллель $ABO^*A_2.05$ идентифицировали по заменам с.467C>T, с.1009A>G. Аллель $ABO^*A_2.09$ представляет собой гибрид: замена с.467C>T и делеция с.1059delC/N характерны для $ABO^*A_2.01$, с.526C>G — для $ABO^*B.01.01$. Выявлено 5 (4,23 %) аллелей $ABO^*AW.06$, при этом в 3 случаях данный аллель установлен прямым секвенированием, хотя до этого методом ПЦР-ССП был определен генотип $ABO^*AW.06/A^{el}O1$ (см. табл. 3, избирательные примеры А.А.Ш., М.П.Я. и ранее обнаруженная у А.М.В.) [1, 2, 13]. У 2 человек найден аллель ABO^*Ax (генотипы $ABO^*Ax O.01.01$ и $ABO^*Ax O.01.02$ соответственно) [13]. Аллель ABO^*Ax является гибридным аллелем, возникающим в результате обмена участками ДНК между непарными хроматидами при мейозе. M. L. Olsson и соавт. рассматривают ABO^*Ax как гибридный аллель,

возникающий в результате кроссинговера между аллелями ABO^*A1 и $ABO^*O.01.02$ на участке между позициями 235 и 446 в интроне 6 гена ABO^*A [14]. По версии G. A. Denomme, к появлению ABO^*Ax может привести обмен участками между аллелями ABO^*B и $ABO^*O.01.02$, а также между 2 аллелями ABO^*O . В этих случаях синтезируется Ах-гликозилтрансфераза, обеспечивающая экспрессию антигена Ах [15]. Эритроциты лиц с аллелями $ABO^*AW.06$ и ABO^*Ax слабо реагировали с Цоликлоном анти-А и лектином анти-А, формируя мелкую или пылевидную агглютинацию к 3-й минуте наблюдения с фоном свободных клеток (10–60 % неагглютинированных эритроцитов), не взаимодействовали с Цоликлоном анти- A_1 , в гелевом методе агглютинацию оценивали на 1+...2+. Иногда в гелевом методе эритроциты расслаивались по всему гелю или делились на 3 фракции — меньшая часть эритроцитов находилась в толще геля (5–10 %), остальные эритроциты поровну распределялись на дне колонки и поверхности геля. У всех обследованных с группой крови А были идентифицированы естественные изогемаггюлины β . Экстрааггюлины $\alpha 1$ отсутствовали у всех лиц с ослабленной экспрессией антигена А.

В литературе известны случаи разной серологической активности антигена $ABO^*A_2.06$ в зависимости от присутствия разных аллелей антигена О. При семейном исследовании было отмечено, что аллель $ABO^*A_2.06$ проявлял себя как антиген A_2 при генотипе $ABO^*A_2.06 O114$, но как антиген A_3 при генотипе $ADO^*A_2.06 O.01.01$ [9]. В нашем исследовании эритроциты 2 индивидуумов с генотипами $ABO^*A_2.06 O.01.01$ и $ABO^*A_2.05 O.01.01$ фенотипически проявляли себя как A_3 , а с генотипами $ABO^*A_2.06 O.02.01$ и $ABO^*A_2.06 B.01.01$ — как A_2 . При этом у 1 пациента с генотипом $ABO^*A_2.06 O.01.01$ фенотипически определялся антиген A_1 , так что данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Заключение

Если специалист, выполняющий определение группы крови системы ABO, видит мелкую или смешанную агглютинацию с Цоликлонами, или расслоение эритроцитов в геле, или слабую реакцию в гелевых колонках с реактивом анти-А, то он может заподозрить присутствие на эритроцитах обследуемого лица варианта антигена А с ослабленной экспрессией. У таких лиц необходимо исследовать сыворотку на присутствие экстрааггюлины $\alpha 1$. Если такое иррегулярное антитело выявлено, необходимо определить температурный оптимум реагирования и принадлежность к классу иммуноглобулинов. Трансфузионно опасными принято считать антитела $\alpha 1$, взаимодействующие с эритроцитами при температуре $+37^\circ\text{C}$ и относящиеся к иммуноглобулинам класса G. Реципиентам с вариантами антигена А системы ABO необходимо переливать донорские эритроциты такого же фенотипа или группы крови О лицам с фенотипом A_2 или группы крови В или О лицам с фенотипом A_2B .

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что современные молекулярные методы позволяют идентифицировать редкие аллели генов и даже иногда генотипы системы АВО без обследования членов семьи. Впервые даны иммуногенетические характеристики россиян по гену *ABO*А*. Эритроцитар-

ная геномика помогает разрешить неоднозначность результатов серологических методов исследования, позволяет понять истинные механизмы формирования того или иного фенотипа у лиц и вносит полноценный вклад в обеспечение иммунологической безопасности трансфузий гемокомпонентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Головкина Л.Л., Стремouxова А.Г., Пушкина Т.Д. Выявление редкого аллеля антигена А системы АВО А^{el} у женщины из Дагестана. *Интер-Медикал* 2015;1(7):25–8. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. Identification of antigen A rare allele of the ABO A^{el} system in a woman from Dagestan. *Inter-Medikal = Inter-Medical* 2015;1(7):25–8. (In Russ.)].
2. Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. Molecular identification of rare O1A^{el} allele in russian woman from Dagestan. *Tissue Antigens* 2015;85(S5):367.
3. Chen D.P., Sun C.F., Ning H.C. et al. Genetic and mechanistic evaluation for the weak A phenotype in A^{el} blood type with IVS6+5G>A ABO gene mutation. *Vox Sanguinis* 2015;108(1):64–71. DOI: 10.1111/vox.12196.
4. <http://isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>.
5. Yamamoto F., McNeil P.D., Hakomori S. Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187(1):366–74. DOI: 10.1016/s0006-291x(05)81502-5.
6. Storry J.R., Olsson M.L. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol* 2004;126(6):759–71. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05065.x.
7. Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M. et al. Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group. *Vox Sang* 1998;74(4):242–7.
8. Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M. et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups A3 and B3 alleles. *Vox Sang* 1993;4:116–9. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1993.tb02528.x.
9. Barjas-Castro M.L., Carvalho M.H., Locatelli M.F. et al. Molecular heterogeneity of the A3 subgroup. *Clin Lab Haematol* 2000;22(2):73–8. DOI: 10.1046/j.1365-2257.2000.00289.x.
10. Solomon J.M., Sturgeon P. Quantitative studies of the phenotype A^{el}. *Vox Sang* 1964;9:476–86. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1964.tb03316.x.
11. Sturgeon P., Moore B.P.L., Weiner W. Notation for two weak A variants: Aend, A^{el}. *Vox Sang* 1964;9:214–5. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1964.tb03685.x.
12. Sun C.F., Chen D.P., Tseng C.P. et al. Identification of a novel A^{lv}-O^{lv} hybrid allele with G829A mutation in a chimeric individual of A^{el}B^{el} phenotype. *Transfusion* 2006;46:780–9. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00799.x.
13. Головкина Л.Л., Стремouxова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Молекулярно-генетические методы для определения групп крови эритроцитарных систем. *Справочник заведующего КДЛ* 2018;(9):46–56. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Molecular genetic methods for determining the blood groups of erythrocyte systems. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Handbook of the CDL head* 2018;(9):46–56. (In Russ.)].
14. Olsson M.L., Michalewska B., Hellberg A. et al. A clue to the basis of allelic enhancement: occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents. *Transfus Med* 2005;15(5):435–42. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00603.x.
15. Denomme G.A. Molecular basis of blood group expression. *Transfus Apher Sci* 2011;44(1):53–63. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.010.

Вклад авторов

Л.Л. Головкина: разработка дизайна исследования, интерпретация данных, написание статьи;
 Р.С. Каландаров: участие в подготовке статьи для редакции;
 О.С. Пшеничникова: поиск необходимых праймеров, проведение амплификации, подготовка к секвенированию;
 В.Л. Сурин: расшифровка результатов прямого секвенирования;
 А.Г. Стремouxова, Б.Б. Хасигова: выполнение серологического раздела работы;
 Т.Д. Пушкина: выполнение полимеразной цепной реакции с коммерческими праймерами;
 Г.В. Атрошенко: подготовка к секвенированию, очистка ДНК;
 О.С. Калмыкова: подбор доноров и их предварительное обследование.

Authors' contributions

L.L. Golovkina: study design, data interpretation, article writing;
 R.S. Kalandarov: article writing and edition;
 O.S. Pshenichnikova: search for the necessary primers, amplification, preparation for sequencing;
 V.L. Surin: interpretation of direct sequencing results;
 A.G. Stremoukhova, B.B. Khasigova: serological methods;
 T.D. Pushkina: polymerase chain reaction with commercial primers;
 G.V. Atroshchenko: preparation for sequencing, DNA purification;
 O.S. Kalmykova: selection of donors and their preliminary examination.

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: <https://orcid.org/0000-0001-5752-8146>
 В.Л. Сурин / V.L. Surin: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

А.Г. Стремоухова / A.G. Stremoukhova: <https://orcid.org/0000-0002-1705-7535>

Т.Д. Пушкина / T.D. Pushkina: <https://orcid.org/0000-0002-8801-5578>

Г.В. Атрошенко / G.V. Atroshchenko: <https://orcid.org/0000-0001-6635-8791>

О.С. Калмыкова / O.S. Kalmykova: <https://orcid.org/0000-0002-6897-5977>

Б.Б. Хасигова / B.B. Khasigova: <https://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.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia.

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