

DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-83-89



# Полиморфизм аллелей $ABO^*O$ и его клиническое значение

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](mailto:largol@mail.ru)

**Введение.** Известны 62 аллеля  $ABO^*O$  системы ABO. Некоторые аллели  $ABO^*O$  могут сопровождаться присутствием остаточной А-гликозилтрансферазной активности у людей группы O, что может привести к ошибкам при определении группы крови. Это подтверждает важное клиническое значение полиморфизма аллелей  $ABO^*O$ . Знание полиморфизмов гена  $ABO^*O$  и их распространенности способствует предупреждению ошибок при определении группы крови системы ABO.

**Цель исследования** – изучить варианты аллелей гена  $ABO^*O$  у россиян.

**Материалы и методы.** Обследована кровь 14 000 человек. Группу крови определяли с применением Цоликловн анти-А, анти-Асл (анти-А слабый), анти-В, лектина (анти- $A_1$ ) и гелевых карт, а также перекрестным методом с использованием стандартных эритроцитов O, A, B. У 1 пациентки для выявления слабого варианта антигена А применили метод адсорбции-элюции с холодной элюцией, а для устранения блокирующих антигены плазменных факторов – метод тепловой элюции. Молекулярное определение аллелей  $ABO^*O$  проведено 130 лицам методами полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами и прямого секвенирования по Сэнгеру.

**Результаты.** Выявлено 13 аллельных вариантов гена  $ABO^*O$  (10 с типичной делецией с.261delG/N и 3 недеletionных аллеля с полиморфизмом с.802G>A). Делеционные аллели  $ABO^*O.01$  были обнаружены у 92,85 % обследованных, недеletionные аллели группы  $ABO^*O.02$  – у 7,15 %. Аллель  $ABO^*O.01.01$  был обнаружен с частотой 67,14 %, другие делеционные аллели – значительно реже:  $ABO^*O.01.02$  и  $ABO^*O.01.11$  – по 5,71 %,  $ABO^*O.01.26$  – 5,00 %,  $ABO^*O.01.12$  – 4,30 %,  $ABO^*O.01.13$  и  $ABO^*O.01.44$  – по 1,43 %,  $ABO^*O.01.05$ ,  $ABO^*O.01.46$ ,  $ABO^*O.01.68$  – по 0,71 %. Неделеционные аллели встречались со следующей частотой:  $ABO^*O.02.01$  – 4,30 %,  $ABO^*O.02.03$  – 2,14 %,  $ABO^*O.02.02$  – 0,71 %. У всех лиц с группой O с недеletionным аллелем установлена группа  $O_{\text{об}}$ , кроме 1 пациентки (с генотипом  $ABO^*O.01.02 O.02.02$ ), у которой была группа  $O_B$ .

**Заключение.** Впервые даны иммуногенетические характеристики россиян по генам  $ABO^*O$ . Эритроцитарная генотипика помогает разрешить неоднозначность результатов серологических методов исследования и позволяет понять механизмы формирования разных фенотипов. Для правильного определения естественных изогемагглютининов и слабых вариантов антигенов необходимо применение не менее 2 разных серологических методик.

**Ключевые слова:** полиморфизм аллелей  $ABO^*O$ , группоспецифические гликозилтрансферазы, остаточная активность гликозилтрансфераз, генетическое типирование

**Для цитирования:** Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С. и др. Полиморфизм аллелей  $ABO^*O$  и его клиническое значение. Онкогематология 2021;16(4):83–9. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-83-89.

## Polymorphism of $ABO^*O$ alleles and its clinical significance

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](mailto:largol@mail.ru)

**Background.** 62  $ABO^*O$  alleles of the ABO system are known. Some  $ABO^*O$  alleles may be accompanied by the presence of residual A-glycosyltransferase activity in people of group O, which may lead to errors in determining the blood group. This confirms the important clinical significance of the  $ABO^*O$  allele polymorphism. Knowledge of  $ABO^*O$  gene polymorphisms and their prevalence contributes to the prevention of errors in determining the blood group of the ABO system.

**Objective:** to study allele variants of the  $ABO^*O$  gene in Russians.

**Materials and methods.** The blood samples of 14,000 people were examined. The blood group was determined using anti-A, anti-Aweak, anti-B, lectin (anti- $A_1$ ) and gel cards, as well as by cross-sectional method using standard red blood

cells of O, A, and B groups. In one patient, the method of adsorption-elution with cold elution was used to identify a weak variant of antigen A, and the method of thermal elution was used to eliminate antigen- blocking plasma factors. Molecular determination of *ABO\*O* alleles was performed in 130 individuals by polymerase chain reaction with sequence-specific primers and Sanger direct sequencing.

**Results.** 13 allelic variants of the *ABO\*O* gene were identified (10 with a typical deletion of c.261delG/N and 3 nondeletional alleles with polymorphism c.802G>A). Deletion alleles of *ABO\*O.01* were found in 92.85 % of the examined patients, non-deletion alleles of *ABO\*O.02* group – in 7.15 % of cases. The *ABO\*O.01.01* allele was detected with a frequency of 67.14 %, other deletion alleles – much less frequently: *ABO\*O.01.02* and *ABO\*O.01.11* – 5.71 %, *ABO\*O.01.26* – 5.00 %, *ABO\*O.01.12* – 4.30 %, *ABO\*O.01.13* and *ABO\*O.01.44* – 1.43 %, *ABO\*O.01.05*, *ABO\*O.01.46*, *ABO\*O.01.68* – 0.71 % each. Non-deletional alleles were found with the following frequencies: *ABO\*O.02.01* – 4.3 %, *ABO\*O.02.03* allele – 2.14 %, *ABO\*O.02.02* – 0.71 %. All individuals with the O group with the nondeletional allele had the O<sub>ар</sub> group, except for one patient (with the *ABO\*O.01.02 O.02.02* genotype), who had the O<sub>б</sub> group.

**Conclusion.** For the first time, the immunogenetic characteristics of Russians are given according to *ABO\*O* genes. Erythrocyte genomics helps to resolve the ambiguity of serological methods results and allows understanding mechanisms of different phenotypes formation. For the correct definition of natural isohemagglutinins and weak antigens variants should be used at least two different serological methods.

**Key words:** *ABO\*O* allele polymorphism, group-specific glycosyltransferases, residual activity of glycosyltransferases, genetic typing

**For citation:** Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Pshenichnikova O.S. et al. Polymorphism of *ABO\*O* alleles and its clinical significance. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2021;16(4):83–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-83-89.

## Введение

Система АВО – важнейшая антигенная система эритроцитов, имеющая исключительно большое значение в трансфузиологической и трансплантационной практике. Антигены системы АВО являются карбогидратами. Гены системы АВО кодируют синтез группоспецифических гликозилтрансфераз, которые переносят карбогидраты на эритроциты. В настоящее время известны 62 аллеля *ABO\*O*, которые кодируют функционально неактивные варианты гликозилтрансфераз, вследствие чего лица с группой крови О не имеют на эритроцитах ни антигена А, ни антигена В, а присутствует только субстанция-предшественница Н. Однако некоторые аллели *ABO\*O* могут сопровождаться присутствием остаточной А-гликозилтрансферазной активности у лиц группы О, что может привести к ошибкам при определении группы крови и к посттрансфузионным реакциям и осложнениям. Этим обусловлено клиническое значение полиморфизма аллелей *ABO\*O*.

Иммунологические методы определения группы крови системы АВО имеют ограничения в применении. Наиболее надежное установление правильной группы крови обеспечивает генетическое типирование. Знание полиморфизмов гена *ABO\*O* и их распространенности способствует предупреждению ошибок при определении групповой принадлежности доноров и реципиентов. Данное исследование является продолжением работы по изучению полиморфизма аллелей системы АВО у россиян.

**Цель исследования** – изучить варианты аллелей гена *ABO\*O* у россиян.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили эритроциты и сыворотки 14 000 пациентов с заболеваниями систе-

мы крови, доноров компонентов 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.

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 А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, А<sub>3</sub>, Ах), 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 А<sub>1</sub> (не реагирует с эритроцитами, содержащими антиген А<sub>2</sub> или более слабые формы А антигена; в отдельных случаях дает неполную мелкозернистую агглютинацию с эритроцитами фенотипов А<sub>2</sub>, А<sub>3</sub>, Ах и т. д.) фирмы «Гематолог» (Россия), а также с помощью гелевых карт DiaClon ABO/D + Reverse Grouping фирмы BioRad (Швейцария).

Для проверки возможного присутствия слабых вариантов антигена А применяли метод адсорбции-элюции: инкубация эритроцитов с Цоликлоном анти-А с последующей холодной элюцией по методике AАВВ

[1]. Для удаления возможных блокирующих антигены плазменных факторов применяли тепловую элюцию с предварительной обработкой эритроцитов 6 % бычьим альбумином по методике ААВВ [1].

Перекрестное определение группы крови проводили в реакции солевой агглютинации на плоскости и в 96-луночных планшетах с применением стандартных эритроцитов групп крови О, А, В.

Геномную ДНК выделяли с помощью 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 (АВО-TYPE, АВО-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 бидистиллирован-

ной 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

Аллели АВО\*О были идентифицированы молекулярными методами у 130 человек, в том числе у гетерозигот в сочетании с разными вариантами антигена А (107 человек имели аллель АВО\*О) и антигена В (13 человек имели аллель АВО\*О), а также у 10 человек с группой крови О (20 аллелей). Таким образом, у обследованных лиц выявлено 140 аллелей АВО\*О. При этом всего было обнаружено 13 вариантов аллеля АВО\*О, из них 10 делеционных аллелей группы АВО\*О.01

Аллельные варианты гена АВО\*О по результатам прямого секвенирования (130 человек, 140 аллелей)

Frequency of allele polymorphisms АВО\*О according to direct sequencing results (n = 130, 140 alleles)

№	Аллель (новая номенклатура) Allele (new nomenclature)	Частота аллелей Allele frequency		Характерные замены Characteristic substitutions
		абсолютная absolute	относительная, %, relative, %	
1	<i>O.01.01</i>	94	67,14	c.261delG/N
2	<i>O.01.02</i>	8	5,71	c.106G>T, c.188G>A, c.189C>T, c.220C>T, c.261delG/N, c.297A>G, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, c.829G>A
3	<i>O.01.05</i>	1	0,71	c.261delG/N, c.297A>G
4	<i>O.01.11</i>	8	5,71	c.261delG/N, c.297A>G, c.542G>A, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, c.829G>A
5	<i>O.01.12</i>	6	4,30	c.261delG/N, c.297A>G, c.595C>T, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, c.829G>A
6	<i>O.01.13</i>	2	1,43	c.261delG/N, c.297A>G, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, c.829G>A
7	<i>O.01.26</i>	7	5,00	c.261delG/N, c.768C>A
8	<i>O.01.44</i>	2	1,43	c.261delG/N, c.297A>G, c.646T>A, c.771C>T, c.829G>A
9	<i>O.01.46</i>	1	0,71	c.261delG/N, c.646T>A, c.771C>T, c.829G>A
10	<i>O.01.68</i>	1	0,71	c.106G>T, c.188G>A, c.189C>T, c.261delG/N, c.297A>G, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, c.829G>A
11	<i>O.02.01</i>	6	4,30	c.53G>T, c.220C>T, c.297A>G, c.526C>G, c.802G>A
12	<i>O.02.02</i>	1	0,71	c.297A>G, c.526C>G, c.649C>T, c.689G>A, c.802G>A
13	<i>O.02.03</i>	3	2,14	c.689G>A, c.802G>A
	<i>Всего Total</i>	<i>140</i>	<i>100</i>	

и 3 недеletionных аллеля группы *ABO\*O.02*: *ABO\*O.02.01*, *ABO\*O.02.02* и *ABO\*O.02.03* (см. таблицу). Делеционных аллелей было 130 (92,85 %). Наиболее часто встречался аллель *ABO\*O.01.01* (94 (67,14 %) случая), значительно реже — другие делеционные аллели: *ABO\*O.01.02* и *ABO\*O.01.11* (по 8 (5,71 %) случаев), *ABO\*O.01.26* (7 (5,00 %) случаев), *ABO\*O.01.12* (6 (4,30 %) случаев), *ABO\*O.01.13* и *ABO\*O.01.44* (по 2 (1,43 %) случая), *ABO\*O.01.05*, *ABO\*O.01.46* и *ABO\*O.01.68* (по 1 (0,71 %) случаю). Было выявлено 10 недеletionных аллелей (7,15 %): *ABO\*O.02.01* (6 (4,30 %) случаев), *ABO\*O.02.03* (3 (2,14 %) случая), *ABO\*O.02.02* (1 (0,71 %) случай).

Интересный случай, связанный с затруднениями в определении группы крови, был обнаружен у больной Л.Е.В., которой проведена трансплантация почки. В лечебно-профилактическом учреждении, куда поступила пациентка, фенотипически была определена группа О, так как эритроциты не взаимодействовали с Цоликлонами анти-А и анти-В, а в гелевых колонках перекрестным методом был идентифицирован положительный результат со стандартными эритроцитами А и В, что трактовали как присутствие естественных изогемагглютининов анти-А и анти-В ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Однако у больной после переливания плазмы группы О была отмечена посттрансфузионная реакция с внутрисосудистым гемолизом. Кровь больной была доставлена в НИИЦ гематологии в лабораторию трансфузиологической иммуногематологии. Исследование в нашей лаборатории в гелевых картах DiaClon ABO/D + Reverse Grouping фирмы BioRad (Швейцария) показало отрицательный результат в колонках с реактивами анти-А и анти-В и положительный результат в колонках с нейтральным гелем при взаимодействии между сывороткой больной и стандартными эритроцитами А и В. Однако при использовании классического метода взаимодействия сыворотки больной со стандартными эритроцитами А, В и О наблюдали отсутствие агглютинации с эритроцитами группы О, крупнозернистую агглютинацию с эритроцитами группы В и среднезернистую агглютинацию на фоне небольшого количества несклеенных эритроцитов с эритроцитами группы А. При визуализации под микроскопом реакции сыворотки больной со стандартными эритроцитами группы А наблюдали формирование длинных «монетных столбиков», закручивающихся в ложные агглютинаты. При добавлении теплого физиологического раствора эти «монетные столбики» полностью распались на неизмененные эритроциты. В реакции солевой агглютинации в 96-луночных планшетах после инкубации при температуре 37 °С фиксировали отрицательный результат. Таким образом, было сделано заключение об отсутствии у больной естественного агглютинина анти-А ( $\alpha$ ). Титр естественных агглютининов анти-В ( $\beta$ ) составил 1:8; иммунные групповые антитела не были выявлены. Для проверки возможного присутствия слабого варианта антигена А была выполнена реакция адсорбции-элюции: проведены ин-

кубация эритроцитов больной с Цоликлоном анти-А и последующая холодная элюция. Элюат с эритроцитов не реагировал со стандартными эритроцитами группы А. Таким образом, фиксированные антитела анти-А на эритроцитах не были обнаружены, т.е. наличие слабого антигена А не подтверждено. Для устранения возможной блокировки антигенов высокоактивными антиэритроцитарными антителами применяли тепловую элюцию с предварительной обработкой эритроцитов 6 % бычьим альбумином. После снятия элюата эритроциты больной не реагировали с Цоликлонами анти-А, что свидетельствовало об отсутствии блокирующих агентов. Для окончательного уточнения группы крови провели генетическое исследование. Методами прямого секвенирования и полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами у больной Л.Е.В. был установлен генотип *ABO\*O.01.02 O.02.02*, т.е. подтверждено присутствие недеletionного аллеля *ABO\*O.02.02* и делеционного аллеля *ABO\*O.01.02*. Анализ результатов молекулярного и серологического методов исследования позволил сделать заключение о наличии у больной I группы крови с формулой  $O_{\beta}$ .

У других обследованных с группой крови О, в числе у всех лиц с недеletionными аллелями, установлена формула  $O_{\alpha\beta}$ .

Результаты исследования крови пациентки Л.Е.В. подтверждают, что для правильного определения группы крови системы АВО недостаточно применения одних лишь гелевых методов, которые не всегда могут заменить классические серологические тесты. Для подтверждения или исключения присутствия как естественных изогемагглютининов, так и слабых вариантов антигенов необходимо применение как минимум 2 разных методик.

### Обсуждение

Аллели *ABO\*O* имеют много форм, которые принято делить на 2 основные группы: делеционные и недеletionные. Формирование аллеля *ABO\*O.01.01* (аллель *ABO\*O<sup>I</sup>* по старой классификации) происходит вследствие делеции одного нуклеотида гуанина в позиции 261 (с.261delG), что приводит к сдвигу рамки считывания, формированию незрелого стоп-кодона и раннему обрыву трансляции. Эта делеция — единственное отличие *ABO\*O.01.01* от референсного аллеля *ABO\*A1.01*. Следствием такой мутации является синтез усеченного белка гликозилтрансферазы, который функционально не активен [2]. Второй аллель *ABO\*O.01.02* (аллель *ABO\*O<sup>IV</sup>* по старой классификации) имеет ту же самую делецию нуклеотида с.261delG с дополнительными заменами 9 нуклеотидов: в экзоне 3 — с.106G>T, в экзоне 4 — с.188G>T и с.189C>T, в экзоне 5 — с.220C>T, в экзоне 6 — с.297A>G, в экзоне 7 — с.646T>A, с.681G>A, с.771C>T и с.829G>A. Три из них являются смысловыми (миссенс) и вызывают замены аминокислот (p.Val36Phe, p.Arg63His и p.Pro74Ser), но мутация

с.261delG приводит к синтезу аналогичного усеченного и функционально неактивного белка гликозилтрансферазы. Есть данные, что аллели *ABO\*O.01.01* и *ABO\*O.01.02* кодируют ацетилгликозилтрансферазы, которые могут считаться малыми антигенами гистосовместимости [3]. Основой формирования других делеционных аллелей будет та же делеция нуклеотида в позиции 261 (с.261delG) в сочетании с другими мутациями (см. таблицу).

В нашем исследовании аллель *ABO\*O.01.01* был обнаружен с частотой 67,14 %, другие делеционные аллели – значительно реже: *ABO\*O.01.02* и *ABO\*O.01.11* – по 5,71 %, *ABO\*O.01.26* – 5,00 %, *ABO\*O.01.12* – 4,30 %, *ABO\*O.01.13* и *ABO\*O.01.44* – по 1,43 %, *ABO\*O.01.05*, *ABO\*O.01.46*, *ABO\*O.01.68* – по 0,71 %.

Все другие аллели гена *ABO\*O* называются делеционными *ABO\*O.01.01*-подобными или *ABO\*O.01.02*-подобными и недеletionными *ABO\*O.02*-подобными аллелями. Различия между *ABO\*O.01.01*-подобными и *ABO\*O.01.02*-подобными аллелями иногда условны, потому что некоторые из них представляют собой гибриды, формирующиеся из нуклеотидных последовательностей основных аллелей *ABO\*O.01.01* и *ABO\*O.01.02*.

Аллели *ABO\*O.01.01*-подобные (с мутацией с.261delG) и *ABO\*O.01.02*-подобные (с мутациями с.261delG и с.297A>G и несколькими иными заменами, характеризующими аллель *ABO\*O.01.02*, – с.646T>C, с.681G>A, с.771C>T, с.829G>A) делятся на 3 большие группы:

- 1) имеющие типичные для *ABO\*O.01.01* или *ABO\*O.01.02* нуклеотидные последовательности и новые дополнительные нуклеотидные замены, отсутствующие в общих аллелях *ABO\*O*;
- 2) имеющие типичные последовательности и дополнительно какие-нибудь замены нуклеотидов, характерные для общих аллелей *ABO*, так называемые гибридные аллели;
- 3) А. *ABO\*O.01.01*-подобные с заменой с.467C>T, свойственной аллелю *ABO\*A1.02*, и с 1–2 новыми мутациями;

Б. *ABO\*O.01.02*-подобные аллели, в основе которых присутствуют последовательности, характерные для *ABO\*O.01.44* (см. таблицу), с одной новой мутацией [4].

Выявленный аллель *ABO\*O.01.26* принято относить к *ABO\*O.01.01*-подобным. Этот аллель имеет делецию с.261delG и дополнительную замену с.768C>T, отсутствующую в общих аллелях *ABO\*O*.

Аллели *ABO\*O.01.05* и *ABO\*O.01.46* предпочитают относить к *ABO\*O.01.02*-подобным за характерные мутации с.297A>G и с.646T>A, с.771C>T и с.829G>A соответственно. Выявленные варианты *ABO\*O.01.13*, *ABO\*O.01.44*, *ABO\*O.01.11* и *ABO\*O.01.12* тоже принадлежат группе *ABO\*O.01.02*-подобных аллелей. Аллель *ABO\*O.01.68* несет дополнительные замены с.106G>T в экзоне 3, с.188G>A и с.189C>T в экзоне 4 и с.220C>T в экзоне 5. Аллель *ABO\*O.01.11* содержал дополнительную мутацию с.542G>A, *ABO\*O.01.12* – с.595C>T. Аллель

*ABO\*O.01.44* является гибридной структурой: он имеет тот же нуклеотид в позиции 681, что и *ABO\*A1.01*, т.е. с.681G, и остальные мутации, присущие аллелю *ABO\*O.01.02*.

Аллель *ABO\*O.02.01* (*ABO\*O<sup>2</sup>* или *ABO\*O03* по старой классификации) относится к недеletionным, так как у него отсутствует типичная делеция гуанина в позиции 261 (с.261delG). Формирование недеletionного аллеля *ABO\*O.02.01* происходит в результате несинонимичных замен, которые приводят к повреждению синтеза аминокислот, являющихся местами связывания сахаров. Этот аллель является **химерным** и формируется из последовательностей экзона 7 аллеля *ABO\*B* в позиции 526 и аллеля *ABO\*A* в позициях 703, 796 и 802 [5, 6]. По другой версии, данный аллель отличается от референсного *ABO\*A1.015* отдельными нуклеотидными заменами в кодирующих последовательностях – с.53G>T, с.220C>T, с.297A>G, с.526C>G и с.802G>A [7]. Четыре из этих замен нуклеотидов (с.53G>T, с.220C>T, с.526C>G и с.802G>A) являются миссенс-мутациями и приводят к заменам аминокислот (р.Arg18Leu, р.Pro74Ser, р.Arg176Gly и р.Gly268Arg соответственно). Замена с.220C>T характерна для аллеля *ABO\*O.01.02*, в то время как с.297A>G и с.526C>G типичны для аллеля *ABO\*B.01*. Таким образом, аллель *ABO\*O.02.01* представляет собой гибрид аллелей *ABO\*O.01.02* и *ABO\*B.01*. Отмечено, что новые мутации с.802G>A (присутствующая у аллеля *ABO\*AW.8*) и с.803G>C (присутствующая обычно у аллеля *ABO\*B.01*) приводят к замене аминокислоты глицин на аргинин в позиции 268 (р.Gly268Arg). Этот недеletionный аллель *ABO\*O.02.01* является нефункциональным. Вероятным объяснением этому феномену представляется инактивация в *ABO\*O.02.01* гликозилтрансферазы именно из-за нарушения структуры сайта для связывания сахаров вследствие присутствия аргинина в позиции 268 [4]. В лабораторных условиях показано, что у А-гликозилтрансферазы и В-гликозилтрансферазы с заменой р.Gly268Arg энзиматическая активность не определяется [8]. Когда аллель *ABO\*O.02.01* был впервые обнаружен, предполагалось, что он кодирует фенотип О, подобный тем, которые кодируются делеционными аллелями *ABO\*O* [9].

Однако некоторые последующие данные свидетельствуют, что это не так. Описанные мутации, характерные для данного аллеля, не повреждают рамку считывания, и синтез А-, В-гликозилтрансфераз все-таки происходит. Есть сообщения о кодируемых аллелем *ABO\*O.02.01* гликозилтрансферазах, обладающих остаточной активностью [10], т.е. недеletionные аллели *ABO\*O* иногда могут кодировать фрагмент А-гликозилтрансферазы со слабой активностью, которая проявляется синтезом малого количества антигена А на эритроцитах, определяемого только чувствительными серологическими методами, или идентифицируется по снижению активности естественных агглютининов анти-А (а) при перекрестном типировании [6, 11, 12].

Так, A. Seltsam и соавт. отмечают, что иногда недеletionные *ABO\*O.02.01*-подобные аллели могут продуцировать определяемые количества антигена А. Эти авторы рассматривают *ABO\*O.02.01*-подобные аллели как пограничные аллели между слабыми подгруппами А и группой крови О [11]. Предполагается, что нуклеотидный полиморфизм в регуляторных регионах вне кодирующей последовательности гена *ABO\*O* или эпигеномные факторы, такие как метилирование ДНК, могут играть роль в различном проявлении А-активности аллелей *ABO\*O.02.01* [13, 14].

Поскольку *ABO\*O.02.01* встречается с частотой примерно 5 % от всех аллелей *ABO\*O* у лиц европеоидной и негроидной рас, то этот аллель имеет намного большее значение в АВО-типировании, чем редкие субгрупповые аллели, способные продуцировать слабые А-фенотипы, частота которых оценивается менее чем в 0,02 % среди лиц с группой крови А [15]. По другим данным, частота *ABO\*O.02.01* составляет от 1 до 7 % в различных популяциях [9, 16]. Всего пока описано только 3 недеletionных аллеля *ABO\*O* [17, 18]. В наших исследованиях общая частота встречаемости 3 недеletionных аллелей составила 7,15 %: *ABO\*O.02.01* – 4,3 %, *ABO\*O.02.03* – 2,14 %, *ABO\*O.02.02* – 0,71 %.

F.F. Wagner и соавт. подчеркивают, что кодирование некоторыми недеletionными аллелями *ABO\*O* минимальных количеств антигена А приводит иногда к снижению активности естественных агглютининов анти-А ( $\alpha$ ) ниже уровня, определяемого серологическими методами, в плазме крови таких индивидумов. По мнению авторов, отсутствие ожидаемых агглютининов является наиболее частой причиной проблем при перекрестном определении группы крови системы АВО у доноров с группой крови О, имеющих недеletionные аллели [12].

Однако в исследованиях M.H. Yazer и соавт. у всех лиц, гетерозиготных по аллелю *ABO\*O.02.01*, на эритроцитах не было обнаружено антигена А, в плазме

крови не было найдено А-гликозилтрансферазной активности выше порогового уровня, титры агглютининов анти-А и анти-А<sub>1</sub> были снижены, но это не приводило к противоречиям при определении группы крови системы АВО. По данным этих авторов, при переливании эритроцитов от доноров с аллелем *ABO\*O.02.01* реципиентам группы О не было отмечено посттрансфузионных реакций и осложнений [19]. Однако, как отмечено выше, в противоположном случае, т.е. при переливании плазмы группы О пациентке Л.Е.В. с генотипом *ABO\*O.01.02 O.02.02* имела место посттрансфузионная гемолитическая реакция, что вместе с отсутствием у больной естественных изогемагглютининов анти-А ( $\alpha$ ), по нашему мнению, подтверждает проявление остаточной А-гликозилтрансферазной активности у данной пациентки с аллелем *ABO\*O.02*.

### Заключение

Современные молекулярные методы позволяют идентифицировать редкие аллели генов и даже иногда генотипы системы АВО без обследования членов семьи. Впервые даны иммуногенетические характеристики россиян по генам *ABO\*O*. Эритроцитарная геномика помогает разрешить неоднозначность результатов серологических методов исследования, позволяет понять истинные механизмы формирования того или иного фенотипа у людей и вносит полноценный вклад в обеспечение иммунологической безопасности трансфузий гемокомпонентов. Подтверждено, что в настоящее время классические серологические методы сохраняют свое значение, так как гелевые тесты не всегда обеспечивают правильный результат при прямом и перекрестном определении группы крови системы АВО. Для обнаружения или исключения присутствия как естественных изогемагглютининов, так и слабых вариантов антигенов необходимо применение как минимум 2 разных серологических методик, дополняющих друг друга.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Technical manual. Ed.: M.E. Brecher. 18<sup>th</sup> edn. Bethesda, AABB, 2017.
2. Yamamoto F., Clausen H., White T. et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345(6272):229–33. DOI: 10.1038/345229a0.
3. Eiz-Vesper B., Seltsam A., Blasczyk R. ABO glycosyltransferases as potential source of minor histocompatibility antigens in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion* 2005;45(6):960–8. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.04370.x.
4. Yip S.P. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 2002;66(Pt 1):1–27. DOI: 10.1017/S0003480001008995.
5. Seltsam A., Hallensleben M., Kollmann A., Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 2003;102(8):3035–42. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0955.
6. Hosseini-Maaf B., Irshaid N.M., Hellberg A. et al. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes. *Transfusion* 2005;45(1):70–81. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.04195.x.
7. Amado M., Bennett E.P., Carneiro F., Clausen H. Characterization of the histo-blood group O<sub>2</sub> gene and its protein product. *Vox Sang* 2000;79(4):219–26. DOI: 10.1159/000056734.
8. Yamamoto F., McNeil P.D. Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group A and B transferases. *J Biol Chem* 1996;271(18):10515–20. DOI: 10.1074/jbc.271.18.10515.
9. Grunnet N., Steffensen R., Bennett E.P., Clausen H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel O allele defined as O<sub>2</sub>. *Vox Sang* 1994;67(2):210–5. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1994.tb01662.x.

10. Lee H.J., Barry C.H., Borisova S.N. et al. Structural basis for the inactivity of human blood group O<sub>2</sub> glycosyltransferase. *J Biol Chem* 2005;280(1):525–9. DOI: 10.1074/jbc.M410245200.
11. Seltsam A., Das Gupta C., Wagner F.F., Blasczyk R. Nondeletional ABO\*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion* 2005;45(3):359–65. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.04228.x.
12. Wagner F.F., Blasczyk R., Seltsam A. Nondeletional ABO\*O alleles frequently cause blood donor typing problems. *Transfusion* 2005;45(8):1331–4. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00206.x.
13. Kominato Y., Hata Y., Takizawa H., Tsuchiya T. Expression of human histo-blood group ABO genes is dependent upon DNA methylation of the promoter region. *J Biol Chem* 2000;274(52):37240–50. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37240.
14. Yu L.C., Chang C.Y., Twu Y.C., Lin M. Human histo-blood group ABO glycosyltransferase genes: different enhancer structures with different transcriptional activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273(2):459–66. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2962.
15. Daniels G. Human blood groups. 2<sup>nd</sup> edn. Oxford: Blackwell Scientific, 2002.
16. Chester M.A., Olsson M.L. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15(3):177–200. DOI: 10.1053/tmrv.2001.24591.
17. Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M. et al. Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes. *Immunogenetics* 2001;53(3):190–9. DOI: 10.1007/s002510100315.
18. Olsson M.L., Chester M.A. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. *Vox Sang* 1996;71(2):113–7. DOI: 10.1046/j.1423-0410.1996.7120113.x.
19. Yazer M.H., Hult A.K., Hellberg A. et al. Investigation into A antigen expression on O<sub>2</sub> heterozygous group O-labeled red blood cell units. *Transfusion* 2008;48(8):1650–7. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01732.x.

#### 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. Стремоухова, 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.

**Статья поступила:** 05.07.2021. **Принята к публикации:** 27.09.2021.  
**Article submitted:** 05.07.2021. **Accepted for publication:** 27.09.2021.