

Посвящается памяти Татьяны Михайловны Пискуновой

Полиморфизм генов *RHD* и *RHCE*: обзор зарубежной литературы и собственных публикаций

Л.Л. Головкина, Р.С. Каландаров

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

Контакты: Лариса Леонидовна Головкина largol@mail.ru

В статье представлен обзор литературы, посвященной полиморфизмам генов *RHD* и *RHCE*, кодирующим различные варианты антигенов *RhD* и *RhC*. Впервые приведены данные о полиморфизмах этих генов — типах слабого и парциального антигенов *RhD* и вариантах антигена *RhC*, встречающихся у россиян, в основном у пациентов с заболеванием системы крови. Суммированы молекулярно-серологические характеристики редких антигенов системы Резус. Описаны особенности методических подходов определения резус-фенотипа эритроцитов серологическими методами, направленных на избежание ошибок при интерпретации результатов исследования.

Ключевые слова: система Резус, типы антигена *RhD*, типы антигена *RhC*, резус-фенотип, проблема определения резус-принадлежности, сложно определяемая группа крови, серологический метод, генотипирование

Для цитирования: Головкина Л.Л., Каландаров Р.С. Полиморфизм генов *RHD* и *RHCE*: обзор зарубежной литературы и собственных публикаций. *Онкогематология* 2020;15(4):38–51.

DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-4-38-51



RHD and *RHCE* genes polymorphism: literature review

L.L. Golovkina, R.S. Kalandarov

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

The article provides a literature review about *RHD* and *RHCE* polymorphisms which encode different *RhD* and *RhC* antigen variants. The data about genes *RHD* and *RHCE* polymorphisms, *RhD* weak types, *RhD* partial types and *RhC* variants in Russians is presented for the first time. The molecular and serological characteristics of rare *RhD* and *RhC* antigens are summarized. The role of serological and molecular methods in Rhesus system antigens identifying is shown.

Key words: Rhesus system, antigen *RhD* types, antigen *RhC* types, *Rh*-phenotypes, problem of determining *Rh*-affiliation, difficult to determine blood group, serological method, genotyping

For citation: Golovkina L.L., Kalandarov R.S. *RHD* and *RHCE* genes polymorphism: literature review. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2020;15(4):38–51. (In Russ.).

Введение

Система Резус — 2-я по значимости для практической трансфузиологии и при этом самая полиморфная антигенная система эритроцитов. Она включает 59 антигенов и более 260 аллелей. В связи с этим для обеспечения безопасности гемотрансфузий, т.е. для правильного подбора донорской крови в целях профилактики аллоиммунизации реципиентов антигенами системы Резус эритроцитов доноров, необходимо знание существующих вариантов антигенов системы Резус (в частности, антигенов *RhD* и *RhC*) и, соответственно, полиморфизмов кодирующих их генов *RHD* и *RHCE*. Очевидна также необходимость изучения эффективности серологических и молекулярных методов

определения различных вариантов антигенов системы Резус для правильного определения резус-фенотипов доноров и больных.

Биосинтез антигенов системы Резус кодируется 2 генами — *RHD* и *RHCE*, расположенными на коротком плече хромосомы 1 (1p36.11) и имеющими по 10 экзонов [1]. Эти гены имеют высокую степень гомологии — 93,8 %, касающуюся всех интронов и кодирующих экзонов [2, 3]. Гены расположены близко друг к другу, но в обратной ориентации — $\{RHCE(5' \rightarrow 3') - (3' < 5')RHD\}$; ген *RHD* фланкирован 2 резусными боксами — повторяющимися последовательностями в 9000 пар оснований и с гомологией 98,6 % [4]. Между данными генами возможен обмен гомологичными участками — генная

конверсия, кроссинговер, способствующий формированию гибридных генов.

Ген *RHD* кодирует синтез антигена D (RhD), ген *RHCE* — синтез антигенов C/c (RhCc) и E/e (RhEe). Продукты генов *RHD* и *RHCE* являются полипептидами с молекулярной массой 30–32 кДа [5], состоящими из 417 аминокислот. Гидрофобные белки пронизывают мембрану эритроцита в 12 местах, образуя 6 петель, состоящих из внеклеточной, внутримембранной и внутриклеточной частей [6] и имеющих внутриклеточные N- и C-концевые последовательности.

Ген *RHD* определяет синтез белковой молекулы антигена RhD и его различные (в зависимости от аллеля *RHD*) варианты. 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* [7].

В настоящей работе представлены современные данные литературы о полиморфизмах генов *RHD* и *RHCE*, в том числе суммированы результаты 6-летних работ лаборатории трансфузиологической иммуногематологии по изучению полиморфизмов данных генов у пациентов с заболеваниями системы крови.

Ген *RHD* и его полиморфизмы

В настоящее время выявлено более 260 аллельных вариантов гена *RHD*, возникающих за счет мутаций, которые приводят к качественным и/или количественным изменениям в серологически определяемой экспрессии антигена RhD [8].

Лиц, на эритроцитах которых присутствует антиген RhD, относят к резус-положительным, а тех, кто не имеет данного антигена, — к резус-отрицательным. Выявление антигена RhD происходит в 2 этапа: сначала применяют методики, основанные на прямой реакции агглютинации эритроцитов с иммуноглобулином класса M (IgM) (полными) анти-D-антителами, а при отрицательном результате проводят 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) [9]. В зависимости от количества антигенных детерминант и эпитопов принято выделять, кроме классического, еще 3 основных варианта антигена RhD: слабый антиген RhD — RhD weak (количество антигенных детерминант на эритроците снижено по сравнению с классическим антигеном, возможна выработка анти-D-антител) [10], парциальный антиген RhD — RhD partial, у которого отсутствует какой-либо из эпитопов (лица с таким антигеном D могут вырабатывать антитела к отсутствующим у них эпитопам) [11], и антиген RhDEL [8, 12]. Эритроциты с антигеном RhDEL при использовании серологических методов обычно идентифицируют как RhD-отрицательные; его выявляют,

как правило, с помощью методов адсорбции-элюции [13]. У носителей этого антигена возможен синтез анти-D-антител.

Слабые антигены RhD. В настоящее время описано более 161 типа антигена RhD weak (161 types RhD weak), которые обозначают как RhD weak type 1...161 или по нуклеотидным заменам в гене (<http://www.rhesusbase.info>) [14]. Появление новых фенотипов RhD weak обусловлено 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 единичным или множественным заменам аминокислот во внутриклеточной или трансмембранной части белка RhD [15, 16].

F.F. Wagner и соавт. представили доказательства взаимосвязи между смысловыми мутациями в гене *RHD* и снижением экспрессии антигена RhD вследствие нарушения интеграции резусного белка в мембрану эритроцитов [15]. 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 и тем легче выявлять их серологическими методами.

Количество антигенных детерминант зависит от гаплотипа и варьирует от 13 283 на эритроцитах с фенотипом CcDee до 24 509 на эритроцитах с фенотипом CcDEe, при этом плотность эпитопов RhD на эритроцитах колеблется среди эритроцитов одного и того же типа RhD weak [17]. Количество детерминант антигена RhD на одном эритроците у людей с RhD weak варьирует в широких пределах — от 60 до 3800; установлены связь типов RhD weak с определенным гаплотипом и постоянство этого феномена [4].

Изучение филогенеза гена *RHD* человека привело к пониманию того, что существует 4 главных кластера гена, которые выделяют по аллелям, отличающимся от обычных аллелей гена *RHD* и включающим варианты антигена RhD с дополнительными аминокислотными заменами: DIV, DAU, D weak type 4 и евразийский [18]. Установлена молекулярная основа различных аллелей, обуславливающих разные варианты слабого антигена RhD. Так, для *RHD weak type 2* характерны нуклеотидные замены с.G1154C; для *RHD weak type 15* — с.G845A [15]; для *RHD weak type 20* — с.T1250C [19]. У этих лиц фенотип системы Резус был определен как ccdee, Ccdee, CCdee и ccdEe.

Антиген DAR1 (RhDAR, RhD weak type 4.2) принадлежит к кластеру антигена RhD weak type 4. Варианты антигена RhDAR и RhD weak type 4.2 были выявлены у лиц с анти-D-антителами. Эти 2 варианта антигена имеют одни и те же 3 замены нуклеотидов в гене *RHD* и 3 аминокислотные замены (с.C602G(p.T201R), с.T667G(p.F223V), с.T1025C(p.I342T)), но отличаются только по одной единичной синонимичной мутации

гена (с.G957A), кодирующей синтез р.V319V и не влияющей на экспрессию RhD [17, 20]. Следовательно, антигены RhD weak type 4 и RhDAR являются вариантами антигена RhD с идентичным фенотипом и почти идентичным генотипом, хотя первый относят к слабому варианту антигена RhD, а второй – к парциальному антигену RhD.

Мутация *RHD(G255R)* была описана в базе GenBank под номером JQ405074 в 2012 г. и Y. Fichou и соавт. в 2013 г. [21] с характерной заменой нуклеотидов с.G763A, которая приводила к замене глицина на аргинин в кодоне 255. Серологическую характеристику эритроцитов донора с этой мутацией описали A. Doescher и соавт. в RhesusBase [14] 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+.

Формирование гена *RHD*D weak type 67* связано с заменой с.C722T (GenBank FM201787, 2008), что приводит к появлению аминокислоты изолейцина в кодоне 241 – р.T241I. Аллель относят к евразийскому D-кластеру. Серологические свойства антигена RhD weak type 67 в базе данных, однако, не были описаны.

Существуют расовые и популяционные различия в частоте встречаемости типов антигена RhD weak. Антигены RhD weak типов 1, 2, 3 в 93 % случаев встречаются среди лиц европеоидной расы [15]. Антиген RhD weak type 3 чаще встречается у жителей Загребского региона Хорватии [22], очень редкий RhD weak type 38 (Gly278Asp) – у португальцев [23], RhD weak type 42 – у жителей Квебека, потомков переселившихся в Канаду европейцев [24].

К евразийскому D-кластеру относят также парциальные антигены RhD_{DNB} и RhD_{DVII}. Оба этих парциальных антигена ассоциированы с гаплотипом CDe и появляются вследствие единичных точечных мутаций. Антиген RhD_{DNB} впервые был подробно описан в 2002 г. [25]. Кодирующий его ген по терминологии ISBT обозначается как *RHD*25* или *RHD*DNB*. Этот ген появляется в результате нуклеотидной замены с.1063G>A и характеризуется отсутствием эпитопов 6, 31 (в антигене по сравнению с обычным резусным протеином происходит замена глутамина на серин в позиции 355 – р.Gly355Ser). Антиген RhD_{DVII} был обнаружен в 1995 г. [26]; наименования кодирующего гена по ISBT – *RHD*07.01* или *RHD*DVII. 1*. Данный антиген образуется вследствие появления аллеля гена с нуклеотидной заменой с.329T>C и отличается от обычного антигена RhD отсутствием эпитопа 8 (происходит замена лейцина на пролин в позиции 110 – р.Leu110Pro) [27].

Вариантом антигена RhD, не распознаваемым моноклональными анти-D-реактивами, но идентифицируемым методами адсорбции-элюции, является RhDEL (RhDel), часто встречающийся у представителей

монголоидной расы [8, 28]. Молекулярная основа данного варианта гена *RHD* – делеция 1013 пар оснований между интронами 8 и 9, выпадение почти всего экзона 9 и присутствие аллеля 1227A [29]. Этот антиген иногда нельзя выявить даже методами адсорбции-элюции [13], хотя его азиатский тип имеет все эпитопы RhD-белка [30]. Антиген RhDEL имеет клиническое значение, так как вызывает аллоиммунизацию у RhD-отрицательных реципиентов [31].

T. Wagner и соавт. принадлежит первое упоминание делеции 4 нуклеотидов – с.802-38delctc – в интроне 5 гена *RHD*, повлекшей формирование фенотипа RhDEL с количеством RhD-детерминант 26 на 1 эритроцит, что было описано как *RHD(IVS5-38delctc)* [32] (по классификации ISBT RHD*01N.58). Для эритроцитов с фенотипом RhDEL характерно малое количество антигенных детерминант без утраты каких-либо эпитопов, но это малое количество является иммуногенным для RhD-отрицательных реципиентов. Фенотип RhDEL относят к евразийскому кластеру.

В России изучение вариантов антигена RhD было начато в прошлом столетии Т.М. Пискуновой. Именно она в 1970-х годах первой провела работу по изучению серологических свойств эритроцитов с ослабленной экспрессией антигена RhD [33, 34] и отметила их разную агглютинабельность. Продолжением исследований Т.М. Пискуновой являются работы Л.Л. Головкиной и соавт., в которых впервые в России были опубликованы сведения о частоте вариантов слабого антигена RhD у россиян по результатам генотипирования 63 человек в 2016 г. [35].

Исследования Л.Л. Головкиной и соавт. по изучению причин ослабления экспрессии антигена RhD у россиян позволят дать иммуногенетическую характеристику российской популяции. По данным представленных к настоящему времени работ [35–39] можно констатировать выявление у обследованных 206 россиян 9 типов гена *RHD*D weak* (табл. 1). Чаще всего у обследованных лиц выявляли типы *RHD*D weak type 3* (57,76 %) и *RHD*D weak type 1* (26,20 %), в том числе в 1 случае *RHD*D weak type 1.1* (0,49 %). Остальные 7 типов гена *RHD*D weak* имели следующие частоты: *RHD*D weak type 2* – 12,14 %, *RHD*D weak type 15* – 1,45 %, *RHD*D weak type 4.2 (DAR)*, *RHD*D type 6*, *RHD*D type 67*, *RHD(G255R)*, *RHD(IVS5-38del4)* – по 0,49 % каждый. Авторами также были изучены серологические свойства соответствующих слабых вариантов антигена RhD (табл. 2). Полученные данные дополнили сведения по серологической характеристике редких аллельных вариантов слабого антигена RhD. Было показано, что эритроциты с разными типами антигена RhD weak демонстрировали разнообразие серологических свойств, вплоть до отсутствия реакции агглютинации с анти-D-реактивами [36], а разные серологические методы показывали различную эффективность идентификации слабых вариантов RhD (табл. 3). Наиболее эффективен для определения антигенов RhD weak

непрямой антиглобулиновый тест в гелевых колонках, но и он не всегда позволял идентифицировать некоторые типы слабого RhD, в частности варианты RhD weak type 15. В связи с этим для повышения чувствительности серологических тестов был предложен новый методический подход выявления таких типов RhD weak, основанный на применении отдельных неполных моноклональных анти-D-антител, а не их смеси [36]. В исследованиях авторов при определении RhD weak type 15 наряду с реактивом ЭритроТест™-Цоликлон анти-D (активным компонентом которого является смесь 4 моноклональных антител, направленных против разных эпитопов антигена D – 6.5, 6.3, 6.2) применяли отдельные, наиболее активные в плане выявления антигена RhD моноклональные антитела G7 и G47, относящиеся к классу иммуноглобулинов IgG1 и направленные, соответственно, против эпитопов 6.3 и 6.2.

Следует отметить, что определенное несовершенство серологических методов также доказывает необходимость применения генетического типирования и его широкого внедрения в практическую трансфузиологию в целях профилактики аллоиммунизации реципиентов и развития у них посттрансфузионных осложнений.

Парциальные варианты антигена RhD были обнаружены у 2 пациенток с заболеванием системы крови (табл. 4). Молекулярное исследование обнаружило у одной из них ген *RHDNB*, у другой – ген *RHDVII* (у этой больной в сыворотке крови были выявлены аллоиммунные анти-D-антитела). Интересно отметить, что у пациентки с антигеном RhDVII был редкий резус-фенотип – CCD^wEe. Серологически в обоих случаях парциальные антигены RhD проявляли себя как слабые варианты антигена RhD (табл. 5). Заподозрить присутствие парциальных антигенов RhD можно было только по расхождению результатов 2 серологических методов исследования: слабой реакции агглютинации с Цоликлонами и сильной реакции агглютинации в гелевом методе. Следовательно, применение только гелевой технологии может привести к отсутствию идентификации парциальных антигенов на эритроцитах, что повлечет за собой неправильные рекомендации по выбору доноров эритроцитосодержащих компонентов больным с частичной утратой эпитопов антигена RhD и их аллоиммунизацию вследствие трансфузии донорских эритроцитов с полным набором эпитопов антигена RhD.

Таким образом, присутствие парциальных антигенов RhD можно заподозрить по расхождению результатов

Таблица 1. Типы слабых вариантов антигена D (n = 206)

Table 1. Types of D antigen weak types (n = 206)

| Вариант антигена RhD RhD antigen types | Тип гена <i>RHD*^wD weak</i> <i>RHD*^wD weak gene type</i> | Полиморфизм Polymorphism | Фенотип Phenotype | Число обследованных лиц Number of persons examined |
|---|---|---|---|---|
| RhD weak type 1 | <i>D weak type 1</i> | c.T809G p.Val270Gly | CcD ^w ee | 54 |
| RhD weak type 2 | <i>D weak type 2</i> | c.G1154C p.Gly385Ala | ccD ^w Ee | 25 |
| RhD weak type 3 | <i>D weak type 3</i> | c.C8G p.Ser3Cys | CcD ^w ee ccD ^w ee CCD ^w ee | 112 3 4 |
| RhD weak type 4.2 (DAR) | <i>D weak type 4.2 (DAR)</i> | c.C602G p.T201R c.T667G p.F223V c.T1025G p.I342T | ccD ^w ee | 1 |
| RhD weak type 6 | <i>D weak type 6</i> | c.G29A p.Arg10Gln | CcD ^w ee | 1 |
| RhD weak type 15 | <i>D weak type 15</i> | c.G845A p.Gly282Asp | CCD ^w ee Ccdee ccdEe | 1 1 1 |
| RhD weak type 67 | <i>D weak type 67</i> | c.C722T p.Thr241Ile | ccD ^w Ee | 1 |
| RhD weak type G255R | <i>D weak type G255R</i> | c.G763A p.Gly255Arg | CcD ^w ee | 1 |
| RhD weak type IVS5-38del4 | <i>D weak type IVS5-38del4</i> | c.802-38delctc (нет данных) c.802-38delctc (no data) | CcD ^w ee | 1 |

Таблица 2. Серологическая характеристика эритроцитов с разными типами антигена RhD weak

Table 2. Serological characteristics of erythrocytes with RhD weak different types

| № | Тип RhD weak (количество антигенных детерминант) RhD weak type (number of antigenic determinants) | Реакция прямой агглютинации с анти-D IgM Direct agglutination reaction with anti-D IgM | | | Реакция непрямой агглютинации с анти-D IgG Indirect agglutination reaction with anti-D IgG | |
|---|--|---|--|--|---|--|
| | | Метод 1 (время появления агглютинации) Method 1 (time of agglutination occurrence) | Метод 2 (разведение антител) Method 2 (antibody dilution) | Метод 3 (IgM + IgG) (сила агглютинации) Method 3 (IgM + IgG) (agglutination strength) | Метод 4 (время появления агглютинации) Method 4 (time of agglutination occurrence) | Метод 5 (сила агглютинации) Method 5 (agglutination strength) |
| 1 | RhD weak type 1 (533–1285) | 2'–3' | 1:2–1:32 | 1+...3+ | 1'–3' | 1+...3+ |
| 2 | RhD weak type 2 (448–950) | Отрицательная Negative | 1:8–1:64 | 1+...2+ | 2'–3' | 4+ |
| 3 | RhD weak type 3 (1333–2650) | 1'–3' | 1:8–1:1024 | 2+...4+ | 20''–2' | 3+...4+ |
| 4 | RhD weak type 4.2 (DAR) (1617–2288) | 2' | 1:32 | 2+ | 2' | 4+ |
| 5 | RhD weak type 6 (1053) | 3' | 1:64 | 3+ | 1' | 4+ |
| 6 | RhD weak type 15 (133–297) | Отрицательная Negative | Отрицательная Negative | Отрицательная Negative | 2' | 4+ |
| 7 | RhD weak type 67 (н/д) RhD weak type 67 (n/d) | Отрицательная Negative | 1:2 | 1+ | 2' | 3+ |
| 8 | RhD weak type RH G255R (н/д) RhD weak type RH G255R (n/d) | Отрицательная Negative | 1:2 | Отрицательная Negative | 2' | 4+ |
| 9 | RhD weak type IVS5 (н/д) RhD weak type IVS5 (n/d) | Отрицательная Negative | Отрицательная Negative | Н/д N/d | 4' | 4+ |

Примечание. Здесь и в табл. 3: метод 1 – агглютинация на плоскости с Цоликлонами анти-D; метод 2 – реакция солевой агглютинации с Цоликлонами анти-D IgM класса; метод 3 – агглютинация анти-D в гелевом методе; метод 4 – классическая непрямая проба Кумбса; метод 5 – непрямая проба Кумбса в гелевом методе. Ig – иммуноглобулин; н/д – нет данных.
Note. Here and in the table 3: method 1 – agglutination on flat surface with anti-D monoclonal antibodies; method 2 – reaction of saline agglutination with IgM anti-D monoclonal antibodies; method 3 – agglutination with anti-D monoclonal antibodies in the gel method; method 4 – classical indirect Coombs' test; method 5 – indirect Coombs' test in the gel method. Ig – immunoglobulin; n/d – no data.

Таблица 3. Чувствительность серологических методов выявления разных типов слабого антигена RhD (RhD weak)

Table 3. Sensitivity of serological methods for detecting different types of weak RhD antigen (RhD weak)

| D Weak | Значения Values | Метод исследования Detecting method | | | | |
|---------|-------------------------------|--|-----|------|-------|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| type 1 | % | 66,7 | 80 | 66,7 | 92,85 | 100 |
| type 2 | % | 12,5 | 75 | 37,5 | 87,5 | 100 |
| type 3 | % | 96,3 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| type 15 | Абсолютные Absolute values | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 1/3 |

серологических методов исследования, однако точно определить вариант отсутствующего эпитопа можно только при молекулярно-генетическом исследовании.

RhD-отрицательный фенотип. В зависимости от причин появления резус-отрицательного фенотипа принято различать истинную и ложную RhD-негативности. Молекулярную основу истинной RhD-негативности

составляют изменения в геномной организации, а ложная RhD-негативность обусловлена лимитированием возможностей серологических методов исследования. Только сочетание серологических методов с молекулярными методами исследования позволяет понять истинные механизмы формирования RhD-отрицательного фенотипа у людей.

Таблица 4. Молекулярные основы формирования парциальных антигенов RhDNB и RhDVII

Table 4. Molecular basis for RhDNB and RhDVII partial antigens formation

| Обозначение Designation | Наименование ISBT ISBT name | Гаплотип Haplotype | Механизм Mechanism | Замена нуклеотида (аминокислоты) Nucleotide (amino acid) substitution |
|----------------------------|--|-----------------------|---|--|
| RhDNB | <i>RHD*25</i> <i>RHD*DNB</i> | CDe | Единичная точечная мутация Single point mutation | c.1063G>A (p.Gly-355Ser) |
| RhDVII | <i>RHD*07.01</i> <i>RHD*DVII. 1</i> | CDEe | Единичная точечная мутация Single point mutation | c.329T>C (p.Leu-110Pro) |

Причины появления истинного RhD-отрицательного фенотипа кроются в возникновении изменений в геноме, следствием которых выступает либо полное отсутствие экспрессии белковой молекулы антигена RhD на поверхности эритроцитов, либо экспрессия неполноценного антигена RhD, не выявляемого серологическими методами исследования. Антигены системы Резус могут экспрессироваться только при условии присутствия на мембране эритроцитов другого белка – Rh-ассоциированного гликопротеина (RhAG, Rh50), являющегося продуктом гена *RHAG*, расположенного на хромосоме 6 (6p11-p21) [40]. Вместе они представляют семейство резусных белков, входящих в большой резусный комплекс, включающий дополнительные гликопротеины: CD47, гликофорины A и B, гликопротеины с антигенами систем LW и Fy [41], белок Band 3 [42]. Доказано, что белковая молекула протеина RhAG представляет собой обязательный посттранскрипционный фактор, влияющий на экспрессию резусных белков [43]. Гликопротеин RhAG необходим для транспортировки Rh-белков к эритроцитарной мембране. Для нормального взаимодействия белков RhAG и Rh необходимы как C-, так и N-концевые последовательности белков Rh [41].

Гены *RHD* фланкированы 2 фрагментами ДНК, названными резусными боксами (Rhesus boxes). Высокая степень гомологии ДНК резусных боксов

способствует неравновесному кроссинговеру между ними, выпадению целого гена *RHD* и появлению 2 гаплотипов *cde* [4]. Описанный D-отрицательный фенотип встречается в основном у представителей европеоидной расы и передается по наследству. Его имеют около 17 % россиян [44], а у представителей негроидной расы делеция целого гена *RHD* встречается в 43 % случаев [45]. Приобретенный D-отрицательный фенотип может формироваться при возникновении функционально неактивных аллелей гена *RHD* вследствие бессмысленных мутаций (например, *RHD* (Q41X), *RHD* (Y330X) [46]), выпадения каких-либо его нуклеотидов (например, *RHD* (488del4), который характеризуется выпадением 4 нуклеотидов в экзоне 4 [46]) или целых экзонов, что приводит к неспособности измененных генов кодировать синтез полноценного резусного белка.

RhD-отрицательный фенотип может формироваться вследствие замен единичных нуклеотидов в гене *RHD*, которые способствуют появлению стоп-кодона. Примером может служить появление гена *RHCE*ceHAR*, когда в нормальном гене *RHD* происходит единичная замена цитозина на тимин в позиции 121 белковой молекулы [46], вследствие замены экзона 5 гена *RHce* эквивалентным экзоном гена *RHD* [7, 47]. Доказано, что антиген R0Na_g является иммуногенным для RhD-отрицательных реципиентов [47].

Для представителей негроидной расы характерно появление генотипа RHD+ с RhD-отрицательными аллелями (RhD-отрицательный фенотип) вследствие отсутствия активности гена *RHD*, обусловленного в основном 2 молекулярными механизмами:

- появлением псевдогена *RHD* (*RHDψ*) (43–66 %), возникающего вследствие вставки 37 пар оснований на границе интрона 3 и экзона 4, приводящей к сдвигу рамки считывания, появлению стоп-кодона в экзоне 6 [45]. Псевдоген *RHDψ* у лиц европеоидной расы встречается с частотой 1:14 748 [48];
- возникновением гибридных генов *RHD-CE-D* (15 %) вследствие генной конверсии между экзонами генов *RHD* и *RHCE*. Такие гибридные гены не способны кодировать синтез антигена RhD на поверхности мембраны эритроцитов. Они часто ассоциированы с гаплотипом CdeS [4].

В 2015 г. Л.Л. Головкиной и соавт. выполнено определение фенотипа системы Резус у 3205 человек, из них RhD-отрицательный фенотип был выявлен у 481 (15 %) [49]. Генотипирование для идентификации причины RhD-отрицательного фенотипа было проведено у 9 человек. По реакции агглютинации на плоскости с моноклональным анти-D-антителом все исследуемые образцы эритроцитов были идентифицированы как RhD-отрицательные. Фенотип и серологические характеристики эритроцитов приведены в табл. 6. Генотипирование позволило выявить у этих лиц присутствие гена *RHD*: у № 1 – *RHDψ*, у № 2, 3 – *D weak type 2*, у № 4, 5 и 6 – *D weak type 15*. Пациенты № 7–9 ген *RHD*

Таблица 5. Серологическая характеристика парциальных антигенов RhD^{DNB} и RhD^{VII}Table 5. Serological characterization of RhD^{DNB} and RhD^{VII} partial antigens

| Тип RhD partial RhD partial type | Фенотип Phenotype | Серология Serology | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|---|--|----------------------------------|---|--|---|
| | | Время появления мелкой агглютинации с анти-D супер Time of fine agglutination appearance with anti-D super | Солевая агглютинация Saline agglutination | | Непрямая проба Кумбса Indirect Coombs' test | | Гелевый метод IgM + IgG Diaclon Gel method IgM + IgG Diaclon |
| | | | титр в опыте titer | титр в контроле control titer | Время появления мелкой агглютинации на плоскости Time of fine agglutination appearance on flat surface | В геле с антиглобулиновой сывороткой LISS/Coombs In a gel with antiglobulin serum LISS/Coombs | |
| RhD partial type DNB | CCD ^w ee | 2–3 мин 2–3 minutes | 256 | 4000 | 2 мин 2 minutes | 4+ | 3+ |
| RhD partial type VII | CCD ^w Ee | Химера Chimera | 512 | 4000 | 25 с 25 sec | 4+ | 3+ |

Таблица 6. Фенотипы и генотипы D-отрицательных обследованных лиц

Table 6. Phenotypes and genotypes of D-negative subjects

| № | Обследуемое лицо Examined person | Генотип Genotype | | Фенотип Phenotype |
|----|-------------------------------------|---------------------|-------|----------------------|
| | | RHD | RHCE | |
| 1 | З. Z. | Dψ | cc*ee | ccdee |
| 2 | Б. B. | D weak type 2 | cc*Ee | ccdEe |
| 3 | А. A. | D weak type 2 | cc*Ee | ccdEe |
| 4 | Ч. Ch. | D weak type 15 | CC*ee | CCdee |
| 5 | М. M. | D weak type 15 | Cc*ee | Ccdee |
| 6 | Л. L. | D weak type 15 | cc*Ee | ccdEe |
| 7 | П. P. | D– | Cc*ee | Ccdee |
| 8 | И. I. | D– | Cc*ee | Ccdee |
| 9 | К. K. | D– | Cc*ee | Ccdee |
| 10 | А. A. | RHnull | | – |

не имели. Генотип локуса RHCE у всех обследованных лиц соответствовал определенному фенотипу.

Таким образом, авторам удалось выявить 1 случай истинного (RHDψ) и 5 случаев ложного RhD-отрицательного фенотипа (RHD weak type 2 (n = 2) и RHD weak type 15 (n = 3)). Во всех 5 случаях подтверждена

ассоциация вариантов слабого антигена RhD с присутствием антигенов RhC или RhE. Как показали результаты исследований, в гелевых картах не всегда можно определить слабые варианты антигена RhD. Некоторые антигены RhD weak были выявлены только с помощью классической непрямой пробы Кумбса с идентификацией фиксации неполных анти-D-антител в гелевых картах, содержащих антиглобулин, в то время как агглютинация эритроцитов, нагруженных неполными анти-D-антителами, при использовании обычной антиглобулиновой сыворотки на плоскости отсутствовала.

В 2015 г. Л.Л. Головкиной и соавт. [50, 51] удалось обнаружить еще одну больную с истинным RhD-отрицательным фенотипом – Rhnull, о чем речь пойдет ниже.

Резус-дефицитные фенотипы. Поскольку для нормального взаимодействия белков RhAG и Rh необходимы как C-, так и N-концевые последовательности белков Rh, то нарушение связей между ними также приводит к отсутствию синтеза самих резусных протеинов и формированию резус-дефицитных фенотипов. Примером может служить так называемый фенотип Rhnull, при котором на эритроцитах отсутствуют все антигены системы Резус. Существуют 2 генетические причины появления данного фенотипа, касающиеся изменений исключительно в генах RH и RHAG:

- Аморфный тип Rhnull является следствием делеции гена RHD и появления гомозиготности по молчащим аллелям в локусе RH из-за мутаций в гене RHCE (делеция 2 нуклеотидов в кодонах 322 и 323 экзона 7 и замена триплета нуклеотидов TCA на одиночный цитозин), приводящих к разрыву рамки считывания генетического материала. Синтезированный на основе такого транскрипта потенциальный белок состоял из 398 вместо 417 аминокислот и имел 10 вместо 12 трансмембранных цепей [41].

• Регуляторный тип фенотипа Rhnull встречается чаще, чем аморфный, и является следствием гомозиготности по супрессорному мутантному аллелю гена *RHAG*, подавляющему экспрессию антигенов Rh на мембране эритроцитов. Все мутации в гене *RHAG*, приводящие к сдвигу рамки считывания (сплайсинговые [41] или бессмысловые [52] мутации), приводят к незавершенной или поздней конечной трансляции белковой молекулы, т.е. к синтезу неполноценного протеина, неспособного формировать функционирующий комплекс с белковой молекулой системы Резус. Лица с фенотипом Rhnull регуляторного типа передают своему потомству нормально функционирующие гены системы Резус, поскольку сами гены *RHD* и *RHCE* не повреждены.

В лаборатории трансфузиологической иммуногематологии НМИЦ гематологии Л.Л. Головкиной и соавт. впервые в России удалось выявить редкий фенотип Rhnull регуляторного типа у больной с менингиомой головного мозга [50]. Определение фенотипа эритроцитов пациентки с помощью моноклональных антител специфичностей анти-D, -C, -C^w, -c, -E, -e на плоскости и в гелевых картах выявило отсутствие всех антигенов системы Резус (фенотип -/- или Rhnull). Молекулярным методом выявлен генотип *CcDee*, что указывало на отсутствие повреждения генов локусов *RHD* и *RHCE*. Все это позволило высказать предположение о наличии регуляторного типа фенотипа Rhnull. Методом прямого секвенирования был определен ген *RHAG*, результаты сравнивали с референсной последовательностью из GenBank. Секвенирование было выполнено А. Doesher (Red Cross Transfusion Service, Ольденбург, Германия). Она выявила новую мутацию в экзоне 4 гена *RHAG* в позиции 571 (с.С571Т), которая привела к формированию раннего стоп-кодона

(р.191R (R191)), и дополнительную мутацию в экзоне 5 с.724G>A [51]. Антиэритроцитарные антитела IgM в сыворотке больной отсутствовали. При постановке непрямой пробы Кумбса в гелевых картах сыворотка агглютинировала все образцы стандартных эритроцитов (реакцию оценивали на 3+) скрининговой и идентификационной панелей, но не реагировала с собственными эритроцитами. Непрямая проба Кумбса в классической постановке с теми же эритроцитами была отрицательной. Полученные результаты авторы трактовали как присутствие антирезусных антител IgG низкой avidности.

Ген *RHCE* и его полиморфизмы

В настоящее время определены более 50 аллелей гена *RHCE*. Поскольку гены *RHD* и *RHCE* происходят из общего предшественника и имеют высокую степень гомологии (93,8 %), то возможно, что полиморфизм гена *RHCE* еще мало изучен, и количество вариантов должно быть больше.

Полиморфизм гена *RHCE* обусловлен заменами 5 нуклеотидов: 1 замена (с.С48G) в экзоне 1, 3 замены (с.А178С, с.G203А, с.Т307С) в экзоне 2 и 1 замена (с.с.676G) в экзоне 5. Нуклеотидные варианты с.307С и с.с.676G принято считать референсными. Эти единичные нуклеотидные замены (single nucleotide polymorphism, SNP) приводят к заменам следующих аминокислот: цистеина на триптофан в позиции 16 трансмембранного домена резусного белка (р.Cys16Trp), изолейцина на лейцин в позиции 60 (р.Iso60Leu) и серина на аспарагин в позиции 68 (р.Ser68Asn) 2-го трансмембранного домена резусного белка. Четвертая аминокислотная замена серина на пролин в позиции 103 белка (р.Ser103Pro) на 2-й экстрацеллюлярной петле белковой молекулы определяет, какой антиген будет экспрессирован на мембране – RhC или Rhc (табл. 7).

Таблица 7. Специфичные аминокислоты антигенов системы Резус

Table 7. Specific amino acids of Rhesus antigens

| Антиген Antigen | Номер позиции аминокислоты в резусных белках (локализация полиморфизма – номер заменяемого нуклеотида в гене) Amino acid position number in Rh proteins (polymorphism localization – number of the replaced nucleotide in the gene) | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|
| | 16 (с.48 экзон 1) 16 (c.48 exon 1) | 60 (с.178 экзон 2) 60 (c.178 exon 2) | 68 (с.203 экзон 2) 68 (c.203 exon 2) | 103* (с.307 экзон 2) 103* (c.307 exon 2) | 226** (с.676 экзон 5) 226** (c.676 exon 5) |
| Ce | Trp | Leu | Asn | Pro | Ala |
| Ce | Cys | Ile | Ser | Ser | Ala |
| cE | Trp | Leu | Asn | Pro | Pro |
| CE | Cys | Ile | Ser | Ser | Pro |
| D | Trp | Ile | Ser | Ser | Ala |

*Фенотип RhC/c зависит от типа аминокислоты в позиции 103 белка (р.Ser103Pro).

**Фенотип RhE/e зависит от типа аминокислоты в позиции 226 белка (р.Ala226Pro) [2].

*The RhC/c phenotype depends on amino acid type at position 103 of the protein (р.Ser103Pro).

**The RhE/e phenotype depends on amino acid type at position 226 of the protein (р.Ala226Pro) [2].

Остальные аминокислотные замены ассоциированы с конформационными изменениями. Полиморфизм антигена Rhe/E обусловлен SNP в экзоне 5 гена *RHCE* (с.G676C), что приводит к синтезу аланина или пролина в позиции 226 (p.Ala226Pro) на 4-й экстрацеллюлярной петле резусного белка [2].

В настоящее время расшифрованы молекулярные основы существования многочисленных аллельных вариантов гена *RHCE*, возникновение которых связано с нуклеотидными заменами в тех или иных экзонах и интронах. Такие нуклеотидные замены способствуют качественным и количественным изменениям в экспрессии антигенов RhC/c и RhE/e. Измененные антигены RhC и Rhe встречаются наиболее часто. У представителей европеоидной расы изменения антигена RhC чаще связаны с заменами аминокислот на первой экстрацеллюлярной петле антигена RhCe и формированием аллельных антигенов RhC^w и RhC^x [53].

Формирование антигена RhC^w (*RHCE*Ce.08*) происходит при замене нуклеотида 122 аденина на гуанин экзона 1 гена *RHCE* (с.A122G), что приводит к замене глутамина на аргинин в позиции 41 экстрацеллюлярной части первой петли резусного белка (p.Gln41Arg) [54].

Появление антигена RhC^x (*RHCE*Ce.09*) связано с заменой гуанина на аденин нуклеотида 106 экзона 1 гена *RHCE* (с.A106G), что приводит к замене аланина на треонин в позиции 36 экстрацеллюлярной части первой петли резусного белка (p.Ala36Thr) [54].

Эпитопы резусного белка представлены пространственными структурами и состоят из нескольких экстра- и даже трансмембранных частей. Поэтому замена даже одной аминокислоты в любой части резусного белка (даже трансмембранной) может привести либо к формированию нового антигена, либо к воздействию на экспрессию уже существующего антигена. Примером может служить антиген RhVS (RH:20, e^s), формирование которого является следствием SNP в экзоне 5 гена *RHCE*, что приводит к замене аминокислоты лейцина на валин в положении 245 8-го трансмембранного домена белковой молекулы (p.Leu245Val). Замена аминокислот в этой позиции приводит к конформационным (пространственным) изменениям, которые нарушают строение эпитопа и способствуют появлению антигена Rhe-VS (RH:20, e^s) с ослабленной экспрессией [55].

Молекулярные основы формирования аллельных вариантов и полиморфизмов генов *RHCE* и *RHD* похожи. Как отмечалось выше, причины их появления обусловлены единичными или многочисленными миссенс-мутациями, сплайсинговыми мутациями или сегментарными заменами частей гена *RHCE* на части гена *RHD*, т. е. формированием гибридных генов *RHCE-D-CE* [7]. SNP в гене *RHCE* обычно обуславливают изменения не только в экстрацеллюлярной части белковой молекулы, но и в трансмембранном и цитоплазматическом сегментах, что приводит к формированию новых антигенов, обозначаемых как редко встречающиеся, или к ослаблению экспрессии классических антигенов.

Ослабление выраженности антигенов обычно обусловлено конформационными изменениями белка RhCE, нарушением сплайсинга транскрипта гена *RHCE* и сниженной трансляцией. В результате этих процессов снижается способность белкового продукта интегрироваться в мембрану эритроцитов или затрудняется его взаимодействие с другими белками резусного комплекса [56].

Наиболее частые изменения представлены заменами единичных нуклеотидов в гене, и чаще эти замены происходят в экзонах 1, 3 и 4 гена *RHCE* (новые аллели обозначают по аминокислотным заменам, например *RHcE* (Arg10Trp)). У 12 из 18 обнаруженных R. Bugert и соавт. новых аллелей гена *RHCE* единичные замены аминокислот в результате таких изменений в гене затрагивали трансмембранную часть белка. Было замечено, что изменения в гене *RHCE* чаще затрагивают синтез антигена RhC, и аминокислотные замены, появляющиеся в результате миссенс-мутаций, были обычно рассеяны по всей белковой молекуле антигена [56]. Такую же рассеянность аминокислотных замен вследствие миссенс-мутаций наблюдали у антигена Rhe, в то время как замены аминокислот антигенов Rhc и RhE были сгруппированы в специфическом регионе [57]. Интересно отметить, что некоторые аллельные варианты антигенов, выявляемые в методах прямой агглютинации, являются следствием сплайсинговых мутаций и разрушения стоп-кодонов, т. е. в их основе лежат генетические процессы, аналогичные изменениям в гене *RHD* при образовании *RHDEL*-аллелей [58].

Единичные замены нуклеотидов могут происходить и в некодирующих регионах гена (в промоторе или интронах). Так, SNP в промоторе или вблизи сплайсинговых участков могут влиять на процесс трансляции белка. Например, изменения в нетранслируемом регионе (untranslated region, UTR), расположенном на 10 нуклеотидов выше стартового кодона, приводит к появлению нового аллельного варианта — *RHce* (5'-UTRc.-10C>T), а ингибирование связывания рибосом с матричной РНК (мРНК) снижает трансляцию белка. Еще один механизм может быть иллюстрирован появлением аллеля *RHce* (IVS3-5G): он образуется в результате замены в позиции —5 от конца интрона 3, в результате чего сплайсинг происходит менее продуктивно, снижается экспрессия кодируемого белка на мембране эритроцита (количественный эффект) или может происходить нарушение сплайсинга транскрипта, что приводит к синтезу поврежденно-го белка (качественный эффект) [7].

Генетические причины ослабления экспрессии антигенов не всегда удается выявить. Это может быть следствием нарушения экспрессии мРНК.

Экспрессию антигенов RhCcEe на эритроцитах определяют методом прямой агглютинации с применением только полных специфических антител. При таком подходе отрицательный результат реакции агглютинации может быть принят за отсутствие

антигенов, т.е. слабо экспрессированные белки можно пропустить. Использование методик на основе гелевой технологии позволяет избежать подобной ситуации. Однако применение только одной гелевой технологии не позволяет выявлять варианты антигенов любых систем. Улучшить ситуацию помогает подход с применением нескольких методов, например определение антигенов на плоскости, в пробирках или в гелевых картах. В работах Л.Л. Головкиной и соавт. продемонстрировано, что только сочетание как минимум 2 разных методик позволяет заподозрить присутствие измененных антигенов RhC. Обязательным условием должно быть также использование минимум 2 видов реагентов от разных производителей или специфических моноклональных антител от разных клонов гибридом. Расхождение результатов или ослабление агглютинации эритроцитов с каким-либо реактивом может указывать на присутствие полиморфизмов антигенов RhCce.

В 2014–2016 гг. Л.Л. Головкиной и соавт. был определен резус-фенотип у 4470 пациентов с заболеванием

системы крови [59]. Исследования проводили параллельно методами прямой агглютинации эритроцитов с Цоликлонами и в гелевых картах. При этом антиген RhC^w выявили в 247 (5,52 %) образцах приблизительно с одинаковой частотой в сочетании с антигенами Rhc и RhC (121 образец – 2,7 % и 126 образцов – 2,82 % соответственно) (табл. 8). В то же время принято считать, что антиген RhC^w значительно чаще сочетается с RhC, чем с Rhc.

Почти во всех случаях полную агглютинацию с анти-С-моноклональными антителами фиксировали как с Цоликлонами на плоскости на 1-й минуте, так и в гелевых колонках на 4+. Расхождение результатов реакции агглютинации с реактивами анти-С было зафиксировано в 3 образцах эритроцитов (табл. 9): в 2 случаях отрицательный результат с Цоликлонами, в 1 случае мелкая агглютинация с Цоликлонами формировалась на 4-й минуте, при этом во всех 3 случаях положительный результат на 4+ идентифицировали в геле. Поскольку расхождение результатов 2 методик могло быть связано с отсутствием некоторых эпитопов антигена RhC на эритроцитах этих индивидуумов, то для изучения типа полиморфизма гена *RHCE* этим лицам было выполнено исследование на молекулярном уровне: методами полимеразной цепной реакции с аллель-специфическими праймерами (ПЦР-АСП) и прямым секвенированием экзонов 1 и 2 гена *RHCE* (см. табл. 9). Методом ПЦР-АСП у 2 больных (с отрицательной реакцией с Цоликлонами анти-С) выявлено присутствие аллеля *RHCE*С*, а прямое секвенирование определило полиморфизм с.А106G экзона 1, ассоциированный с аллельным вариантом *RHCE*Сe.09*, контролирующей синтез антигена RhC^x. В обоих этих случаях антиген RhC^x сочетался с антигеном Rhc.

У больной с ослабленной экспрессией антигена RhC методом ПЦР-АСП также был выявлен вариант *RHCE*С*, прямое секвенирование показало присутствие гуанина в позиции 106 (с.106G), что характерно для обычного гена *RHCE*С*.

У одной больной с острым лимфобластным лейкозом был установлен фенотип антигенов системы Резус как RhC^wcDee. Пациентке было выполнено 2 трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от доноров с фенотипом RhC^wCDee. На +34-й день после 2-й алломиелотрансплантации на фоне множественных трансфузий фенотип больной определяли как RhCcDee. Для установления истинной групповой принадлежности было выполнено генотипирование. Методом ПЦР-АСП определен генотип *RHCE*ССeе*, прямым секвенированием – типичный для варианта *RHCE*Сe.08* полиморфизм с.А122G и типичные для варианта *RHCE*С* полиморфизмы с.48G в экзоне 1 и с.307С в экзоне 2, оба в гомозиготном состоянии, т.е. у больной был констатирован полный донорский химеризм.

Для проверки возможности генетически выявить у RhC^w-положительных лиц замены нуклеотидов,

Таблица 8. Фенотипы антигенов системы Резус у россиян (период с 01.01.2014 по 14.06.2016)

Table 8. Phenotypes of Rhesus antigens in Russians (period from 01.01.2014 to 14.06.2016)

| Фенотип Phenotype | Число обследованных лиц Number of persons examined | % |
|------------------------------|---|------------|
| CcDEe | 718 | 16,06 |
| CcDee | 1552 | 34,72 |
| CcDEE | 3 | 0,07 |
| ccDEe | 628 | 14,05 |
| ccDee | 77 | 1,72 |
| ccdEe | 1 | 0,02 |
| Ccdee | 40 | 0,9 |
| CCdee | 1 | 0,03 |
| C ^w cDEe | 29 | 0,65 |
| C ^w CDDee | – | – |
| C ^w cDee | 92 | 2,06 |
| C ^w CDDee | 126 | 2,82 |
| CcdEe | 1 | 0,02 |
| CCDEe | 1 | 0,02 |
| CCDee | 1087 | 24,32 |
| CCDEE | 1 | 0,02 |
| CcD ^w Ee | 2 | 0,04 |
| ccD ^w ee | 1 | 0,02 |
| CCD ^w ee | 7 | 0,16 |
| ccD ^w Ee | 12 | 0,27 |
| CcD ^w ee | 91 | 2,04 |
| <i>Всего</i> <i>Total</i> | <i>4470</i> | <i>100</i> |

Таблица 9. Серологическая характеристика образцов эритроцитов с вариантами антигена RhC

Table 9. Serological characterization of erythrocyte samples with RhC antigen variants

| ФИО Name | Состояние здоровья Health status | Взаимодействие со специфическими реактивами Reaction with specific reagents | | | | Полный резусный фенотип Complete Rh phenotype |
|-------------------|--|--|---------------------------|------------------|--|---|
| | | Цоликлон анти-С Anti-C monoclonal antibodies | Гель анти-С Anti-C gel | Анти-с Anti-c | Анти-С ^w Anti-C ^w | |
| Л.В.А. L.V.A. | Гемофилия В Hemophilia B | Отр. Neg. | 4+ | 4+ | Отр. Neg. | C ^c D ^e e* |
| В.Н.Г. V.N.G. | ХЛЛ CLL | Отр. Neg. | 4+ | 4+ | Отр. Neg. | C ^c D ^e Ee |
| С.А.Е. S.A.E. | ОЛЛ, ТКМ ALL, HSCT | 100 % | 4+ | 4+ | 100 % | C ^w D ^e e |
| Е.А.В. E.A.V. | Здоров Healthy | 100 % | 4+ | Отр. Neg. | 100 % | C ^w D ^e e |
| Ш.Е.В. Sh.E.V. | Здоров Healthy | 99 % с фоном несклеенных эритроцитов 99 % with non-glued erythrocyte | 4+ | Отр. Neg. | 100 % | C ^w D ^e e |
| К.А.П. K.A.P. | Миелофиброз Myelofibrosis | 100 % | 4+ | 4+ | 100 % | C ^w D ^e e |
| О.А.В. O.A.V. | Здоров Healthy | 100 % | 4+ | 4+ | 100 % | C ^w D ^e e |
| С.Л.И. S.L.I. | Остеомиелит Osteomyelitis | 100 % мелкая на 4–5-й минуте 100 % fine at 4–5 minutes | 4+ | 4+ | Отр. Neg. | CcD ^e Ee |
| К.А.В. K.A.V. | Здоров Healthy | 100 % | 4+ | 4+ | Отр. Neg. | Ccdee |

*Результаты реагирования эритроцитов с Цоликлонами анти-D, анти-E и анти-e представлены в виде фенотипа.

Примечание. ХЛЛ – хронический лимфолейкоз; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ТКМ – трансплантация костного мозга; отр. – отрицательный результат.

*The results of erythrocytes reaction with anti-D, anti-E and anti-e monoclonal antibodies are presented as a phenotype.

Note. CLL – chronic lymphocytic leukemia; ALL – acute lymphoblastic leukemia; HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; neg. – negative result.

Таблица 10. Результаты прямого секвенирования экзона 1 гена RHCE

Table 10. Results of direct sequencing of RHCE gene exon 1

| ФИО Name | Номер кодона Codon number | Полиморфизм нуклеотидов экзона 1 Exon 1 nucleotide polymorphism | Аминокислотные замены Amino acid substitutions | Трактовка результатов Interpretation of results |
|-------------------|------------------------------|--|--|--|
| Л.В.А. L.V.A. | CD16 CD36 | TGG/TGC (c.48) GCT/ACT (c.106) | Trp/Cys (p.16) Ala/Thr (p.36) | C ^c c |
| В.Н.Г. V.N.G. | CD16 CD36 | TGG/TGC (c.48) GCT/ACT (c.106) | Trp/Cys (p.16) Ala/Thr (p.36) | C ^c c |
| С.А.Е. S.A.E. | CD16 CD41 | TGC/TGC (c.48) CAA/CGA (c.122) | Cys/Cys (p.16) Gln/Arg (p.41) | C ^w C |
| Е.А.В. E.A.V. | CD16 CD41 | TGC/TGC (c.48) CAA/CGA (c.122) | Cys/Cys (p.16) Gln/Arg (p.41) | C ^w C |
| Ш.Е.В. Sh.E.V. | CD16 CD41 | TGC/TGC (c.48) CAA/CGA (c.122) | Cys/Cys (p.16) Gln/Arg (p.41) | C ^w C |
| К.А.П. K.A.P. | CD16 CD41 | TGG/TGC (c.48) CAA/CGA (c.122) | Trp/Cys (p.16) Gln/Arg (p.41) | C ^w c |
| О.А.В. O.A.V. | CD16 CD41 | TGG/TGC (c.48) CAA/CGA (c.122) | Trp/Cys (p.16) Gln/Arg (p.41) | C ^w c |
| С.Л.И. S.L.I. | CD16 CD36 | TGG/TGC (c.48) GCT/GCT (c.106) | Trp/Cys (p.16) Ala/Ala (p.36) | Cc |
| К.А.В. K.A.V. | CD16 CD36 CD41 | TGG/TGC (c.48) GCT/GCT (c.106) CAA/CAA (c.122) | Trp/Cys (p.16) Ala/Ala (p.36) Gln/Gln (p.41) | Cc |

характерные для варианта *RHCE*Ce. 09.01* (с.106G), Л.Л. Головкина и соавт. генотипировали 5 человек с антигеном RhC^w (табл. 10). Методом ПЦР-АСП было подтверждено присутствие варианта *RHCE*C^w*, прямым секвенированием также был выявлен полиморфизм с.A122G, типичный для варианта *RHCE*Ce.08*.

В целом частота встречаемости вариантов гена *RHCE*C* у россиян (на 4470 обследованных) составила: аллель *RHCE*Ce.09* – 0,0448 % (резус-фенотипы: C^xcDEe – 1 (0,0224 %); C^xcDee – 1 (0,0224 %)); аллель *RHCE*Ce.08* – 5,52 % (резус-фенотипы: C^wcDee – 92 (2,058 %); C^wcDEe – 29 (0,649 %); C^wcDee – 126 (2,82 %)).

Таким образом, впервые представлена серологическая характеристика антигена RhC^x и его частота у россиян.

Заключение

Результаты многочисленных исследований доказывают значительное многообразие вариантов генов *RHD* и *RHCE*. Впервые представлены результаты ис-

следований встречаемости и распространенности разных полиморфизмов этих генов у россиян, в основном у пациентов с заболеванием системы крови. Определены оптимальные серологические методы выявления различных вариантов антигенов системы Резус со сниженной экспрессией. Присутствие вариантов антигенов RhD и RhC можно заподозрить по расхождению результатов серологических методов исследования. Несовершенство серологических методов доказывает необходимость применения генетического типирования и его широкого внедрения в практическую работу иммуногематологических лабораторий. Подчеркнута решающая роль генотипирования в определении вариантов резус-антигенов. Эти данные найдут применение и в практической трансфузиологии, так как будут способствовать выполнению персонализированной трансфузионной терапии компонентами крови и повышению безопасности гемотрансфузий, обеспечению профилактики аллоиммунизации реципиентов и развития у них посттрансфузионных осложнений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cherif-Zahar B., Mattei M.G., Le van Kim C. et al. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3–1p36.1 by *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1991;86: 398–400. DOI: 10.1007/BF00201843.
2. Scott M.L. The complexities of the Rh system. *Vox Sang* 2004;87(suppl 1):S58–62. DOI: 10.1111/j.1741-6892.2004.00431.x.
3. Okuda H., Suganuma H., Kamesaki T. et al. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between *RHD* and *RHCE* through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274(3):670–83. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3206.
4. Wagner F.F., Flegel W.A. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662–8. DOI: 10.1016/S0887-7963(01)80058-4.
5. Agre P., Saboori A.M., Asimos A. et al. Purification and partial characterization of the M, 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem* 1987;262(36):17497–503.
6. Hermand P., Mouro I., Huet M. et al. Immunochemical characterization of Rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. *Blood* 1993;82(2):669–76.
7. 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.
8. Daniels G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013;161:461–70. DOI: 10.1111/bjh.12275.
9. Scott M. Section 1A. Rh serology. Coordinators report. *Transfus Clin Biol* 2002;9:23–9. DOI: 10.1016/s1246-7820(01)00211-7.
10. Agre P.C., Davies D.M., Issitt P.D. et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion* 1992;32:86–7. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1992.32192116441.x.
11. Tippett P., Sanger R. Further observations of subdivisions of the Rh antigen D. *Arztl Lab* 1977;23:476–80.
12. Kwon D.H., Sandler S.G., Flegel W.A. DEL phenotype. *Immunohematology* 2017;33(3):125–32.
13. Shao C.P., Maas J.H., Su Y.Q. et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83(2):156–61. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2002.00192.x.
14. Rhesus base website <http://www.uni-ulm.de/fwagner/RH/RB>.
15. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93(1):385–93.
16. Avent N.D., Madgett T.E., Lee Z.E. et al. Molecular biology of Rh protein and relevance to molecular medicine. *Exp Rev Mol Med* 2006;8:1–20. DOI: 10.1017/S1462399406010969.
17. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95:2699–708. DOI: 10.1016/S0887-7963(01)80057-2.
18. 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.
19. Witter B. Die Verteilung von Antigen-dichten und weak D-Allelen im Rhesuspänotyp ccD.Ee. Open Access Repository der Universität Ulm. Dissertation, 2001. Available at: <http://vts.uni-ulm.de/doc.asp?id=765>.
20. Hemker M.B., Ligthart P.C., Berger L. et al. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks. *Blood* 1999;94(12):4337–42.
21. 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;53:1821–8. DOI: 10.1111/trf.12009.
22. Dogic V., Bingulac-Popovic J., Babic I. et al. Distribution of weak D types in Croatian population. *Transfus Med* 2011;21:278–9. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2011.01071.x.
23. 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.
24. 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.
25. Wagner F.F., Eicher N.I., Jorgensen J.R. et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood* 2002;100(6):2253–6. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0742.
26. Rouillac C., Le Van Kim C., Beolet M. et al. Leu110 Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the D^{III} category blood group phenotype. *Am J Hematol* 1995;49(1):87–8. DOI: 10.1002/ajh.2830490115.

27. Flegel W.A., Hillesheim B., Kerowgan M. et al. Lack of heterogeneity in the molecular structure of RHD category VII. *Transfusion* 1996;36:50.
28. Fukumori Y., Hori Y., Ohnoki S. et al. Further analysis of Del (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfus Med* 1997;7(3):227–31. DOI: 10.1046/j.1365-3148.1997.d01-31.x.
29. Chen J.C., Lin T.M., Chen Y.L. et al. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD (el) individuals. *Am J Clin Pathol* 2004;122(2):193–8. DOI: 10.1309/3XMF-2NV5-707T-JE7X.
30. Gu J., Wang D.X., Shao C.P. et al. Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. *BMC Med Genet* 2014;15:54. DOI: 10.1186/1471-2350-15-54.
31. Yasuda H., Ohto H., Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45(10):1581–4. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00579.x.
32. Wagner T., Koermoczi 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.
33. Пискунова Т.М. Изучение некоторых изоантигенов крови человека и создание кадров доноров и резерва замороженной крови редких групп. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1970. [Piskunova T.M. The research of some human blood isoantigens and the creation of donor staffs and of frozen rare groups blood reserve. Abstract for dissertation for the candidate of medical sciences. Moscow, 1970. (In Russ.).]
34. Пискунова Т.М. Редкий фактор крови Du. Проблемы гематологии 1973;(5):3–9. [Piskunova T.M. The rare blood factor Du. *Problemy gematologii = Problems of Hematology* 1973;(5):3–9. (In Russ.).]
35. 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. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Molecular-serological characteristics of antigen weak D types of Rhesus system. *Terapevticheskiy archiv = Therapeutic Archive* 2016;88:78–83. (In Russ.).] DOI: 10.17116/terarkh201688778-83.
36. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д., Оловникова Н.И. 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., Olovnikova N.I. Case of exposure of Rhesus system D weak antigen type 15. *Hematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2014;59(4):23–4. (In Russ.).]
37. 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. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. Case of exposure of Rhesus system D weak antigen type 4.2 (category DAR). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(3):70–2. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-70-72.
38. Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С. и др. Выявление распространенных и новых редких типов слабого антигена RhD у больных заболеваниями системы крови и здоровых лиц. *Онкогематология* 2019;14(3):52–9. [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. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-3-52-59.
39. Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Stremoukhova A.G. et al. Distribution of weak D types in Russians. *HLA* 2016;87(4):287.
40. Chou S.T., Westhoff C.M. The Rh and RhAG blood group systems. *Immunohematology* 2010;26(4):178–86.
41. Cherif-Zahar B., Matassi G., Raynal V. et al. Rh-deficiency of the regulator type caused by splicing mutation in the human RH50 gene. *Blood* 1998;92(7):2535–40.
42. Avent N.D. New insight into the Rh system: structure and function. *ISBT Science Series* 2007;2:35–43.
43. Mouro-Chanteloup I., D'Ambrosio A.M., Gane P. et al. Cell-surface expression of RhD group polypeptide is posttranscriptionally regulated by the RhAG glycoprotein. *Blood* 2002;100(3):1038–47.
44. Дашкова Н.Г. Система обеспечения иммунологической безопасности гемоконпонентной терапии. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2006. [Dashkova N.G. System providing immunological safety of blood transfusion. Abstract for dissertation for the doctor of medical sciences. Moscow, 2006. (In Russ.).]
45. Singleton B.K., Green C.A., Avent N.D. The presence of an RHD pseudogene containing 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95(1):12–8.
46. Avent N.D., Martin P.G., Armstrong-Fisher S.S. et al. Evidence of genetic diversity underlying RhD, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the *RHD* gene. *Blood* 1997;89(7):2568–77.
47. Beckers E.A., Porcelijn L., Ligthart P. et al. The R0Har antigenic Complex is associated with a limited number of D epitopes and alloanti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion* 1996;36(2):104–8. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1996.36296181919.x.
48. Wagner F.F., Frohmajer A., Flegel W.A. RHD positive haplotypes in D-negative Europeans. *BMC Genet* 2001;2:10. DOI: 10.1186/1471-2156-2-10.
49. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Молекулярные основы D-отрицательного фенотипа (обзор литературы и описание случаев). *Онкогематология* 2015;10(3):64–9. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. Molecular basis of D-negative phenotype (review of literature and description of cases). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(3):64–9. (In Russ.).]
50. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Первый случай выявления фенотипа Rh null системы Резус в России. *Справочник заведующего КДЛ* 2015;10:14–20. [Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. First case of Rhesus system Rh null phenotype identifying in Russia. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Directory of Head of CDL* 2015;10:14–20. (In Russ.).]
51. Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D. et al. RHD variants including regulatory type RHnull in Russians. *Haematologica* 2016;101(51):877.
52. Hyland C.A., Cherif-Zahar B., Cowley N. et al. A novel single missence mutation identified along the RH50 gene in a composite heterozygous Rhnull blood donor of the regulatory type. *Blood* 1998;91:1458–63.
53. Denomme G.A., Westhoff C.M. The Rh System. In: *Technical Manual*. 18th edn. Ed. M.K. Fung. 2014. Pp. 317–336.
54. Mouro I., Colin Y., Sistonen P. et al. Molecular basis of the RhC^w (Rh8) and RhC^x (Rh9) blood group specificities. *Blood* 1995;86(3):1196–201.
55. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 2009;126(6):729–42. DOI: 10.1007/s00439-009-0738-2.
56. Bugert R., Scharberg E., Geisen C. et al. RhCE protein variants in Southwestern Germany detected by serologic routine testing. *Transfusion* 2009;49:1793–802. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02220.x.
57. Doescher A., Vogt C., Bittner R. et al. RHCE alleles detected after weak/or discrepant results in automated Rh blood grouping of blood donors in Northern Germany. *Transfusion* 2009;49:1803–11. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02221.x.
58. Gassner C., Doescher A., Drnovsek T.D. et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005;45:527–38. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2004.04211.x.
59. Головкина Л.Л., Сурин В.Л., Пшеничникова О.С. и др. Выявление аллельных вариантов антигена RhC у гематологических больных по результатам серологического и молекулярного исследований. *Трансфузиология* 2019;20(4):315–22. [Golovkina L.L., Surin V.L., Pshenichnikova O.S. Identifying of RhC antigen allelic variants in hematological patients by serological and molecular investigations results. *Transfusiology = Transfusiology* 2019;20(4):315–22. (In Russ.).]

Вклад авторов

Л.Л. Головкина: сбор, анализ иностранной литературы, обобщение собственных результатов исследования, написание текста рукописи;
Р.С. Каландаров: сбор и обобщение данных иностранной литературы.

Authors' contributions

L.L. Golovkina: collection, analysis of foreign literature, generalization of own research results, article writing;
R.S. Kalandarov: collecting and summarizing foreign literature.

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>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.