

Молекулярно-серологические характеристики типов слабого антигена D системы резус

Л.Л. ГОЛОВКИНА, А.Г. СТРЕМОУХОВА, Т.Д. ПУШКИНА, Р.С. КАЛАНДАРОВ, Г.В. АТРОШЕНКО, М.Н. ВАСИЛЬЕВА, В.Л. СУРИН, В.В. САЛОМАШКИНА, О.С. ПШЕНИЧНИКОВА, Г.Ю. МИТЕРЕВ, Е.Н. ПАРОВИЧНИКОВА, В.Г. САВЧЕНКО

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Оценка распространенности типов слабого антигена D (weak D) системы резус у россиян и возможности выявления этих типов серологическими методами.

Материалы и методы. Исследовали эритроциты и ДНК людей с ослабленной экспрессией антигена D с помощью реакции агглютинации эритроцитов в солевой среде (2 метода); реакции агглютинации в гелевых колонках с IgM+IgG анти-D-антителами, непрямого антиглобулинового теста с IgG анти-D-антителами (2 метода); полимеразной цепной реакции для установления типа weak D.

Результаты. В 2014—2015 гг. резус-фенотип определен у 5100 человек. Ослабление агглютинабельных свойств эритроцитов выявлено у 102 (2%) обследованных. Генотипирование для идентификации вариантов антигена weak D проведено у 63 обследованных, выявлено 6 типов weak D. Наиболее частыми оказались типы weak D type 3 ($n=31$; или 49,2%) и weak D type 1 ($n=18$; или 28,6%), в том числе в одном случае weak D type 1.1 (1,6%). Остальные 4 типа антигена weak D имели следующие частоты: weak D type 2 — 14,3% ($n=9$), weak D type 15 — 4,8% ($n=3$), weak D type 4.2 (DAR) ($n=1$) и weak D type 6 ($n=1$) — по 1,6% каждый. Наиболее чувствительным серологическим методом идентификации антигена weak D был антиглобулиновый тест в гелевых колонках, содержащих антиглобулиновую сыворотку. В 2 образцах эритроцитов с фенотипами Ccdee и ccdEe наличие weak D type 15 установлено только молекулярным методом.

Заключение. Серологическими методами слабый антиген D выявлен в 96,8% случаев. Особое внимание при проверке на наличие weak D следует уделять людям с D-отрицательным фенотипом, имеющим антигены C или E. Наши исследования, проведенные впервые в России, позволят улучшить иммунологическое обеспечение безопасности трансфузий пациентам сред, содержащих эритроциты.

Ключевые слова: система резус, типы слабого антигена D, фенотип, экспрессия антигена, генотип, профилактика аллоиммунизации, трансфузии эритроцитов.

Molecular serological characteristics of weak D antigen types of the Rhesus system

L.L. GOLOVKINA, A.G. STREMOUKHOVA, T.D. PUSHKINA, R.S. KALANDAROV, G.V. ATROSHCHENKO, M.N. VASILYEVA, V.L. SURIN, V.V. SALOMASHKINA, O.S. PSHENICHNIKOVA, G.YU. MITEREV, E.N. PAROVICHNIKOVA, V.G. SAVCHENKO

National Research Centre for Hematology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Aim. To estimate the spread of weak D antigen types of the Rhesus system in the citizens of the Russian Federation and a possibility of serologically identifying these types.

Subjects and methods. The red blood cells and DNA of people with weakened expression of D antigen were investigated using erythrocyte agglutination reaction in salt medium (2 methods); agglutination reaction in the gel columns containing IgM + IgG anti-D antibodies, indirect antiglobulin test with IgG anti-D antibodies (2 methods); polymerase chain reaction to establish the type of weak D.

Results. A rhesus phenotype was determined in 5100 people in 2014—2015. The weakened agglutinable properties of red blood cells were detected in 102 (2%) examinees. 63 examinees underwent genotyping to identify the variants of the weak D antigen, which identified 6 weak D types. There were the most common weak D types 3 ($n=31$ (49.2%)) and weak D type 1 ($n=18$ (28.6%)), including weak D type 1.1 in one (1.6%) case. The other 4 weak D antigen types were as follows: weak D type 2 (14.3% ($n=9$)), weak D type 15 (4.8% ($n=3$)), weak D type 4.2 (DAR) (1.6% ($n=1$)) and weak D type 6 (1.6% ($n=1$)). The antiglobulin test in the gel column containing antiglobulin serum was the most sensitive serological assay to identify the weak D antigen. Only a molecular test could establish weak D type 15 in 2 samples of red blood cells with Ccdee and ccdEe phenotypes.

Conclusion. The weak D antigen could be serologically identified in 96.8% of cases. When testing for weak D, particular attention should be given to people with the D-negative phenotype who had the C or E antigens. Our investigations conducted for the first time in Russia will be able to improve the immunological safety of red blood cell-containing medium transfusions for patients.

Keywords: Rhesus system, weak D antigen types, phenotype, antigen expression, genotype, prevention of alloimmunization, red blood cell transfusions.

ПЦР — полимеразная цепная реакция
ССЭ — среды, содержащие эритроциты

OD — оптическая единица

Среди выявленных в настоящее время 35 антигенных систем эритроцитов самой полиморфной является система резус. Она включает 59 антигенов. Биосинтез антигенов системы резус кодируется двумя генами — *RHD* и *RHCE*, расположенными на коротком плече 1-й хромосомы (1p36.11) [1]. Эти два гена имеют высокую степень гомологии — 93,8%, касающуюся всех интронов и кодирую-

щих экзонов [2]. Гены расположены близко друг к другу, но в обратной ориентации: $\{RHCE(5' \rightarrow 3') - (3' \leftarrow 5') RHD\}$ [3]. Каждый ген состоит из 10 экзонов. 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, состоящими из 417 аминокислот. Гидрофобные белки прони-

зывают мембрану эритроцита в 12 местах, образуя 6 петель, состоящих из внеклеточной, внутримембранной и внутриклеточной частей и внутриклеточных N- и C-концевых последовательностей. Атипичным для эритроцитарных резус-белков является отсутствие гликозилирования.

Классический антиген D состоит из 37 составных частей эпитопов [4–6]. Принято выделять 3 основные варианта антигена D: слабый антиген D — weak D (этот термин означает снижение количества антигенных детерминант на эритроците), парциальный антиген D — partial D, у которого отсутствует какой-либо из эпитопов (у лиц с таким антигеном D могут вырабатываться антитела к отсутствующим у них эпитопам), антиген DEL [7]. Эритроциты с антигеном DEL при использовании серологических методов обычно идентифицируют как RhD-отрицательные; его выявляют, как правило, с помощью адсорбции—элюции, хотя и не всегда [8]. 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 D [7].

Первым о существовании слабых вариантов антигена D, обозначенных как Du, сообщил F. Stratton в 1946 г. [9]. Термином «Du» называли антиген D на тех эритроцитах, которые не агглютинировались анти-D-антителами класса IgM, но давали положительный результат с антителами анти-D класса IgG в непрямо антиглобулиновом тесте. Чистых анти-Du-антител не выделено: у D-отрицательных больных после переливания им эритроцитов с антигеном Du вырабатывались антитела со специфичностью анти-D, что доказывало существование только количественных различий между антигенами D и Du. Поэтому в 1992 г. антиген Du переименовали в антиген weak D [10].

В настоящее время описаны 84 типа этого антигена [11], которые обозначают как weak D type 1...84. В большинстве случаев появление новых фенотипов weak D обусловлено генетическими причинами: изменениями нуклеотидных последовательностей или в самом гене *RHD*, или в его ближайшем окружении. Мутационные процессы чаще происходят в виде замены единичных нуклеотидов и воз-

никают в экзонах (смысловые мутации), что приводит к заменам единичных аминокислот во внутриклеточной или трансмембранной частях белка RhD [12, 13]. Все аминокислотные замены у аллелей weak D можно объединить в кластеры. Единичные замены аминокислот чаще затрагивали регион между 267-й и 397-й аминокислотами, реже — в позициях 2–13, 149, 179–225 белковой молекулы. В позициях 2–13, 149, 179–225 часто могут происходить и множественные аминокислотные замены [12].

F. Wagner и соавт. [12] представили доказательства взаимосвязи смысловых мутаций в гене *RHD* и уменьшения экспрессии антигена D вследствие снижения интеграции белка RhD в мембрану эритроцитов. Они доказали большое значение аминокислотных последовательностей в позициях 295–385 для оптимальной интеграции белка RhD в мембрану. Количество встраиваемых в мембрану эритроцита молекул белка RhD зависит от локализации аминокислотных замен в нем: чем ближе к внутриклеточной части молекулы белка RhD происходят аминокислотные замены, тем больше антигенных детерминант формируется на самой мембране.

Эпитопы антигена D, предназначенные для связывания антител, формируются из аминокислот одной или нескольких внеклеточных петель Rh-протеина и представляют собой трехмерную структуру. В поддержании пространственной конфигурации эпитопов принимают участие трансмембранная и цитоплазматическая, связанная с цитоскелетом, части белковой молекулы протеина Rh. Изменения в структуре как трансмембранной, так и цитоплазматической частей белка вследствие аминокислотных замен из-за мутаций в гене *RHD* приводят к изменению структуры самих эпитопов, их пространственной конфигурации, способности встраиваться в мембрану и как следствие к изменению экспрессии антигена D на эритроцитах [6]. Более того, антигенсвязывающий сайт может формироваться и из внутримембранной части и эпитопов одной или нескольких экстрацеллюлярных петель. Изменения тех структур молекулы антигена, которые даже не представлены на мембране (например, находятся внутри трансмембранных α -спиралей), могут приводить к ослаблению или разрушению и даже к появлению новых эпитопов [7]. Сайты связывания антител класса IgG локализованы в регионах 3-й и 4-й наружных петель и в 6, 7 и 8-й трансмембранных частях белковой молекулы [14, 15].

Способность анти-D-антител связываться с эритроцитами зависит от строения эпитопов и их количества на эритроцитах. Чем больше антигенных детерминант присутствует на эритроците, тем легче их выявлять серологическими методами. В норме в зависимости от гаплотипов эта величина составляет от 13 283 на эритроцитах с фенотипом CcD_{ee} до 24 509 на эритроцитах с фенотипом CcD_{Ee} [16]. Количество детерминант антигена D на одном эритроците у людей с weak D варьирует от 60 до 3800 [3]. Большинство типов weak D, ассоциированных с аминокислотными заменами в трансмембранной части белка RhD, имеют очень низкую плотность антигенных детерминант — менее 500 на эритроцит. Колебания плотности антигенных детерминант на эритроцитах с weak D, которые имеют аминокислотные

Контактная информация:

Головкина Лариса Леонидовна — д.м.н., зав. научно-клинической лаб. трансфузиологии иммуногематологии; 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4; тел.: +7(495)614-9271; e-mail: largol@mail.ru

Сведения об авторах:

Стремоухова Алла Геннадиевна — врач клинической лабораторной диагностики научно-клинической лаб. трансфузиологической иммуногематологии

Пушкина Татьяна Дмитриевна — биолог научно-клинической лаб. трансфузиологической иммуногематологии

Апрощенко Григорий Владимирович — врач клинической лабораторной диагностики научно-клинической лаб. трансфузиологической иммуногематологии

Васильева Маргарита Николаевна — н.с. научно-клинической лаб. трансфузиологической иммуногематологии

Сурин Вадим Леонидович — зав. лаб. генной инженерии

Саломашкина Валентина Валерьевна — н.с. лаб. генной инженерии

Пшеничникова Олеся Сергеевна — н.с. лаб. генной инженерии

Митерев Георгий Юрьевич — к.м.н., с.н.с. лаб. физиологии кроветворения; e-mail: miterrev-georgii@yandex.ru

Паровичникова Елена Николаевна — д.м.н., рук. научно-клинического отд. химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга; e-mail: PAROVICHNIKOVA EN@blood.ru

Савченко Валерий Григорьевич — д.м.н., проф., акад. РАН, ген. директор

замены во внутриклеточной части белка RhD, составляют от 500 до 2000. Интерес представляют эритроциты weak D тип 7, у которых замененная аминокислота находится глубоко в трансмембранной части 11-й петли белка RhD, т.е. близко к цитоплазме эритроцита: количество антигена D составляет 2400 на эритроцит. Плотность эпитопов (антигенных детерминант) D на эритроцитах колеблется среди эритроцитов одного и того же типа weak D [16]. Кроме того, выявлены связь типов weak D с определенным гаплотипом и постоянство этого феномена [3].

Существуют популяционные различия по распространенности типов weak D. Среди представителей европеоидной расы распространенность weak D типов 1, 2, 3 составляет 93% [12]. Антиген weak D type 3 чаще встречается у жителей Загребского региона Хорватии [17], очень редкий weak D type 38 (Gly278Asp) — у португальцев [18], weak D type 42 — у жителей Квебека — потомков, переселившихся в Канаду европейцев [19].

Выявление weak D как у доноров, так и у реципиентов имеет большое значение для профилактики анти-D-аллоиммунизации. При этом наиболее эффективным методом определения weak D является генотипирование. Генотипирование *RHD* доноров важно для предупреждения аллоиммунизации резус-отрицательных людей, которым могут быть перелиты эритроциты, содержащие weak D-антиген. Тактика, включающая надежное выявление слабых вариантов антигена D, позволяет предупредить образование анти-D-антител у 98—99% пациентов [20]. Доноры, на эритроцитах которых присутствует weak D-антиген, должны быть отнесены к резус-положительным, и их кровь не должна быть перелита резус-отрицательным пациентам. Для пациентов это имеет значение в контексте тактики переливания сред, содержащих эритроциты (ССЭ): например, в американской трансфузиологической практике рекомендовано переливание реципиентам с weak D type 1, 2, 3 эритроцитов от D-положительных доноров для экономии резус-отрицательных ССЭ. Беременным с теми же типами слабого антигена D не рекомендовано введение антирезусного иммуноглобулина. Американские специалисты по трансфузиологии разработали рекомендации, согласно которым постулируется обязательное генотипирование для выявления антигена weak D и идентификации его типов [21].

В практической работе российских иммуногематологов генотипирование людей с пониженными агглютинабельными свойствами эритроцитов не проводят. Однако современные серологические методы определения резус-принадлежности людей не позволяют установить причину ослабления экспрессии эритроцитарных антигенов, в частности антигена D, и идентифицировать все типы weak D. Это можно сделать только молекулярными методами исследования.

Цель исследований: оценить распространенность типов weak D молекулярными методами у россиян и эффективность выявления различных типов слабого антигена D основными серологическими методами.

Материалы и методы

Исследовали эритроциты периферической крови 5100 человек и ДНК 63 человек с ослабленной экспрессией антигена D, выявленной при первичном определении в реакции агглютинации на плоскости (метод №1) моноклональными анти-D-антителами

класса IgM двух серий (ЭРИПРОТЕСТТМ-Цоликлон анти-D-Супер, от клеточной линии — продуцента НМ-92, ООО «Гематолог», Москва). С эритроцитами, экспрессия антигена D на которых была ослаблена, проводили реакцию солевой агглютинации с теми же полными моноклональными антителами анти-D (ЭРИПРОТЕСТТМ-Цоликлон анти-D-Супер) двух серий в круглодонных 96 луночных планшетах (метод №2) и в гелевых картах DiaClon ABO/D+Reverse Grouping с анти-D от клонов LHM 59/20 (LDM3) и 175—2, фирма Bio-Rad, Швейцария (метод №3). Затем выполняли непрямоу антиглобулиновый тест с неполными моноклональными антителами анти-D двух серий (ЭРИПРОТЕСТТМ-Цоликлон анти-D, ООО «Гематолог») в пробирках (классическая непрямоу проба Кумбса — метод №4) и в гелевых картах LISS/COOMBS (ID-Card «LISS/COOMBS» с полиспецифической антиглобулиновой сывороткой, состоящей из смеси кроличьих анти-IgG- и моноклональных анти-C3d-антител, клеточная линия C139—9, фирмы «BioRad», Швейцария (метод №5). Активным компонентом препарата ЭРИПРОТЕСТТМ-Цоликлон анти-D является смесь 4 моноклональных антител анти-D класса IgG1 (линии — продуценты HG-92, HG-90/7, HG-90/17, HG-04/47), направленных к разным эпитопам (6.5, 6.3 и 6.2) антигена D. Антиглобулиновую сыворотку 3 серий (смесь кроличьей антисыворотки против IgG человека и моноклональных анти-C3d-антител клеточной линии BRIC8, ООО «Гематолог») применяли для выявления фиксированных неполных анти-D-антител на исследуемых и контрольных эритроцитах после проведенной инкубации при постановке классической непрямоу пробы Кумбса. Для контрольных исследований использовали стандартные резус-положительные и резус-отрицательные эритроциты. Все результаты иммуногематологических исследований со стандартными резус-отрицательными эритроцитами были отрицательными. Агглютинация со стандартными резус-положительными эритроцитами формировалась в методах №1 и 2 — со 2—3-й секунды, в методе №2 — до разведения анти-D моноклональных антител 1:2000 — 1:4000, в методах №4 и 5 — на 4+.

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

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с праймерами для выявления генотипов системы резус (RH-TYPE) и 12 типов антигена weak D (Weak D-TYPE, фирма BAG, Германия). Детекцию полученных результатов осуществляли посредством электрофореза продуктов амплификации в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл) в ТВЕ буфере при напряженности электрического поля 10—15 В/см. В лунки геля вносили по 10 мкл амплификационной смеси. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете ($\lambda=310$ нм) при помощи трансиллюминатора в виде полос ярко-оранжевого цвета. Наличие полос амплификации внутреннего положительного контроля свидетельствовало о корректности проведенной ПЦР.

Результаты

В 2014—2015 гг. определение резус-фенотипа эритроцитов выполнено у 5100 человек, из них ослабление экспрессии антигена D выявлено у 102 (2%). Генотипирование для идентификации типов антигена weak D проведено 63 обследованным, у которых выявлено 6 типов weak D (табл. 1). Чаще всего у обследованных лиц встречались типы weak D type 3 ($n=31$; или 49,2%) и weak D type 1 ($n=18$; или 28,6%), в том числе в одном случае weak D type 1.1 (1,6%). Остальные 4 типа антигена weak D имели следующие частоты: weak D type 2 — 14,3% ($n=9$), weak D type 15 — 4,8% ($n=3$), weak D type 4.2 (DAR) и weak D type 6 — по 1,6% каждый. Weak D-положительные лица чаще имели фенотип Csee

Таблица 1. Распространенность типов антигена weak D и фенотипов антигенов системы резус у weak D-положительных лиц

Тип антигена D weak	Число		Фенотип					
	абс.	%	CcDwee	CCDwee	ccDwee	ccDWee	Ccdee	ccdEe
1	18	28,5	18	0	0	0	0	0
2	9	14,3	0	0	0	9	0	0
3	31	49,2	28	2	1	0	0	0
4.2, DAR	1	1,6	0	0	1	0	0	0
6	1	1,6	1	0	0	0	0	0
15	3	4,8	0	1	0	0	1	1
Всего, абс. число	63		47	3	2	9	1	1
Всего, %	100		74,5	4,8	3,2	14,3	1,6	1,6

Таблица 2. Серологическая характеристика эритроцитов с разными типами weak D

№	Тип weak D	Количество наблюдений	Реакция прямой агглютинации с анти-D IgM			Реакция непрямой агглютинации с анти-D IgG	
			метод №1 (время появления агглютинации)	метод №2 (разведение анти-тел)	метод №3 (сила агглютинации)	метод №4 (время появления агглютинации)	метод №5 (сила агглютинации)
1	type 1, 1.1	18	2'—4'	1:2—1:32	1+—3+	1'—6'	4+
2	type 2	9	5'	1:8—1:32	1+—4+	2'—5'	1+—4+
3	type 3	31	1'—4'	1:2 —1:1024	1+—4+	10" —2'	4+
4	type 4.2	1	3'	1:32	3+	1'	4+
5	type 6	1	3'	1:64	3+	1'	4+
6	type 15	3	отр	отр	отр	2'	4+

Примечание. отр — реакция отрицательная, агглютинация отсутствовала.

Таблица 3. Чувствительность серологических методов выявления разных типов weak D

Weak D	Метод исследования				
	№1	№2	№3	№4	№5
type 1					
%	55,6	83,3	66,7	94,4	100
абс.	10 из 18	15 из 18	12 из 18	17 из 18	18 из 18
type 2					
%	11,1	77,8	44,4	88,9	100
абс.	1 из 9	7 из 9	4 из 9	8 из 9	9 из 9
type 3					
%	96,8	100	100	100	100
абс.	30 из 31	31 из 31	31 из 31	31 из 31	31 из 31
type 15					
абс.	0 из 3	0 из 3	0 из 3	1 из 3	1 из 3

(74,5%) и ccEe (14,3%), реже встречались фенотипы CCee (4,8%), csee (3,2%). Фенотипы эритроцитов у 2 человек с weak D type 15 определены как Ccdee (1,6%) и ccdEe (1,6%).

Сведения о силе и времени появления агглютинации с эритроцитами разных типов weak D суммированы в табл. 2, чувствительность серологических методов при определении типов weak D — в табл. 3.

Агглютинация эритроцитов weak D type 1 с цоликлоном анти-D-супер класса IgM на плоскости (метод №1) идентифицирована в 55,6% случаев (см. табл. 2, 3), формировалась, как правило, к 3-й минуте и была мелкой. В реакции солевой агглютинации (метод №2) положительный результат получен уже в 83,3% случаев, разведение анти-D IgM антител колебалось от 1:2 до 1:32. Таким образом, дополнительная инкубация тестируемых эритроцитов с полными анти-D-антителами в течение 1 ч способствовала лучшему склеиванию эритроцитов. В методе №3 положительный результат на 1+ и 3+ получен в 66,7% случаев. Применение непрямого антиглобулинового метода в классической постановке (ме-

тод №4) повышало выявляемость weak D type 1 до 94,1%, а в гелевых картах (метод №5) — до 100%.

Мелкая агглютинация эритроцитов weak D type 2 с анти-D Цоликлоном класса IgM (метод №1) формировалась к 5-й минуте наблюдения только у 1 из 9 обследованных лиц, частота выявления составила 11,1% (см. табл. 2, 3). В реакции солевой агглютинации (метод №2) положительный результат получен в 77,8% случаев, разведение анти-D IgM антител колебалось от 1:8 до 1:32. В гелевых картах (метод №3) реакцию на 1+—2+ наблюдали у 4 (44,4%) из 9 человек. Методы, основанные на непрямом антиглобулиновом тесте, были более чувствительными. Непрямая проба Кумбса в классической постановке (метод №4) позволяла идентифицировать антиген weak D type 2 в 88,9% случаев, а в гелевых картах LISS/COOMBS (метод №5) — в 100% случаев.

Генотипирование позволило выявить weak D type 3 у 31 человека, из которых у 30 (96,8%) наблюдали формирование на плоскости мелкой агглютинации в основном ко 2—3-й минуте (метод №1). В реакции солевой агглютина-

ции разведение анти-D моноклонального реагента колебалось от 1:16 до 1:1024, в гелевых картах сила реакции составляла от 3+ до 4+. Отдельно дадим характеристику одного образца эритроцитов: моноклональные анти-D-антитела IgM класса не агглютинировали эритроциты на плоскости, разведение антител в методе 2 составило 1:2, в гелевых картах сила реакции была на 1+. Методы с применением неполных анти-D-антител (методы №4 и №5) позволяли выявить антиген weak D в 100% случаев, сила реакции в геле составляла от 3+ до 4+ (см. табл. 2, 3).

Серологические методы успешно выявляли экспрессию weak D type 4.2 (DAR) и weak D type 6 (см. табл. 2). Экспрессию weak D type 15 удалось выявить на эритроцитах только одного образца и только с помощью непрямого антиглобулинового теста в классическом исполнении (метод №4) и гелевых колонках (метод №5) (см. табл. 2), а с эритроцитами еще двух образцов все серологические методы показали отрицательный результат. Поскольку фенотип эритроцитов у этих людей определен как Ccdee и ccdee, решено выполнить генетическое исследование, при котором и установлено наличие weak D type 15.

Таким образом, самыми эффективными серологическими методами выявления антигенов weak D являются те, что основаны на непрямом антиглобулиновом тесте, выполняемом в гелевых колонках. Однако и эти методики не позволяют идентифицировать некоторые типы слабого D, например некоторые варианты weak D type 15. Мы описали новый методический подход к выявлению таких типов weak D, основанный на применении отдельных неполных моноклональных антител, а не их смеси [22].

Обсуждение

Современные молекулярные методы исследования позволяют идентифицировать редкие аллели генов *RHD*, продукты которых выявляются серологическими методами как слабый антиген D — weak D. При очень слабой выраженности антигена weak D вследствие крайне малого количества антигенных детерминант на эритроците серологические методы для его выявления неэффективны. В проведенных нами исследованиях в большинстве случаев weak D выявляли всеми 5 серологическими методами. При этом во всех случаях отмечали появление более мелкой агглютинации и увеличение времени реакции (до 1–3 мин вместо 0–5 с) по сравнению с контролем, а в реакции агглютинации в солевой среде — снижение титра реакции на 4–10 ступеней по сравнению с положительным контролем. В целом наиболее эффективным методом выявления weak D остается непрямая проба Кумбса, особенно при использовании гелевых колонок с антиглобулиновой сывороткой. Так, только в этом тесте выявлены weak D type 15 (1 случай), weak D type 1 (1 случай), weak D type 2 (1 случай). В проведенных исследованиях скорость реакции в неяркой пробе Кумбса с эритроцитами weak D type 3 (в большинстве случаев 1 мин) оказалась выше, чем с эритроцитами weak D type 1 и weak D type 2 (чаще всего 2 мин), что можно объяснить разным количеством антигенных детерминант на эритроцитах. В 2 случаях антиген weak D type 15 серологически не выявлялся ни одним методом, и этот тип антигена D идентифицирован только молекулярным методом. Таким образом, в настоящее время в иммуногематологической практике нет серологического метода и реакти-

вов, которые обеспечивали бы определение всех без исключения типов weak D. Только молекулярно-генетическое исследование гарантирует выявление всех этих вариантов. Наша работа является продолжением исследований, начатых еще в прошлом столетии Т.М. Пискуновой. Именно она в 70-х годах XX века первой провела работу по изучению серологических свойств эритроцитов с weak D [23, 24] и отметила их разную агглютинабельность.

Трансфузиологическая стратегия. Определение типов антигена weak D зависит от чувствительности типизирующих реактивов и применяемых методик. В большинстве стран реципиентов относят к D+ и переливают D+-эритроциты, если эритроциты потенциальных реципиентов агглютинируются двумя сериями анти-D-реактивов класса IgM. Но такие реактивы не агглютинируют эритроциты с парциальным антигеном DVI. Большим с антигеном DVI переливают эритроциты от D-отрицательных доноров для устранения риска анти-D-аллоиммунизации.

F. Wagner и соавт. [16] предложили свой алгоритм выявления типов антигена weak D и соответствующую трансфузионную тактику для реципиентов. По их мнению, следует принимать во внимание распространенность типов weak D в популяции и качественные изменения их антигенных структур, т.е. оценивать риск анти-D-аллоиммунизации. D+-эритроциты следует переливать большим со слабым D, имеющим на своих эритроцитах схожую или более высокую плотность антигенов, чем у людей с weak D type 2. Таким образом, пороговое значение плотности антигенных детерминант D составит около 400 на 1 эритроцит. Этот показатель является и пороговым значением чувствительности для анти-D-антител класса IgM, применяемых в реакции солевой агглютинации в пробирках или в гелевых картах. Авторы предлагают использовать эритроциты с weak D type 2 для контроля качества реактивов анти-D, применяемых для фенотипирования, что реализовано на практике специалистами из США. У представителей европеоидной расы чаще выявляют слабый антиген D тип 1, тип 2 и тип 3 — в 97% случаев [12]. Плотность антигена D при этих вариантах превышает пороговое значение 400 антигенов на один эритроцит. Поэтому таким реципиентам в 97% случаев для переливания будут ССЭ от резус-положительных доноров [20]. Если для идентификации антигена D необходима постановка непрямого антиглобулинового теста, значит его плотность на клетке ниже пороговой, и таким пациентам следует переливать эритроциты от D-отрицательных доноров. Число таких больных составит около 3%.

Стратегия по отношению к донорам компонентов крови иная: все потенциально иммуногенные D+ образцы эритроцитов следует относить к резус-положительным. Для выявления слабых вариантов антигена D у доноров следует применять высокочувствительные методики, основанные на непрямом антиглобулиновом тесте, и реактивы на основе IgG-антител [25].

Суммируя перечисленное, трансфузионную стратегию можно сформулировать следующим образом: если слабый антиген D можно идентифицировать с помощью реактивов с анти-D-антителами класса IgM любым методом без применения непрямого антиглобулинового теста, то больному можно переливать эритроциты от резус-положительного донора. Однако в практической работе российских иммуногематологов такой подход зарубежных коллег представляется не совсем оправданным, так как

одними серологическими методами нельзя установить причину ослабления экспрессии антигена D. Эритроциты с парциальными антигенами D также могут иметь пониженную агглютинационную активность с анти-D-антителами класса IgM, а больные с такими вариантами антигена D будут подвержены риску анти-D-аллоиммунизации при переливании резус-положительных эритроцитов [26]. Только результаты молекулярных методов исследования (генотипирование) позволяют однозначно выявить причину ослабления экспрессии антигена D. Тип слабого антигена D важно идентифицировать еще и потому, что лю-

ди с weak D type 7 и weak D type 4.2 подвержены риску анти-D-аллоиммунизации, несмотря на большую плотность антигенных детерминант на эритроцитах, и им необходимы для переливания эритроциты от D-отрицательных доноров. Применение генотипирования особенно важно в тех популяциях, в которых распространенность подобных типов слабого антигена D высока. В России нами впервые проводится работа по выявлению частоты типов слабого антигена D в российской популяции.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cherif-Zahar B, Mattei MG, Le van Kim C, Bailly P, Carton JP, Collin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Human Genet.* 1991;6:398-400. doi:10.1007/BF00201843
2. Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274:670-683. doi:10.1006/bbrc.2000.3206
3. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood.* 2000;95:3662-3668. doi:10.1016/S0887-7963(01)80058-4
4. Scott M. Rh serology — Coordinators report. *Transfusion Clin. Biol.* 1996; 3: 333-337. doi:10.1016/s1246-7820(96)80040-1
5. Scott M., Section L.A. Rh serology. Coordinators report. *Transfusion Clinique Biologique.* 2002;9:23-29. doi:10.1016/s1246-7820(01)00211-7
6. Liu W, Avent ND, Jones JW, Scott ML, Voak D. Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythroleukemia cells. *Blood.* 1999;94(12):3986-3996.
7. Daniels G. Variants of RhD — current testing and clinical consequences. *Br J Haematol.* 2013;161:461-470. doi:10.1111/bjh.12275
8. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Kohler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang.* 2002;83(2):156-161. doi:10.1046/j.1423-0410.2002.00192.x
9. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature.* 1946;158:25-26. doi:10.1038/158025c0
10. Agre PC, Davies DM, Issitt PD, Lamy BM, Schmidt PJ, Treacy M, Vengelen-Tyler V. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion.* 1992;32:86-87. doi:10.1046/j.1537-2995.1992.32192116441.x
11. Rhesus base website, <http://www.uni-ulm.de/fwagner/RH/RB>.
12. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999;93:385-393.
13. Avent ND, Madgett TE, Lee ZE, Head DJ, Maddocks DG, Skinner LH. Molecular biology of Rh protein and relevance to molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2006; 8:1-20. doi:10.1017/S1462399406010969
14. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, Avent ND. Modeling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol.* 2005;131:543-551. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05786.x
15. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apheresis Scie.* 2011;44:81-91. doi:10.1016/j.transci.2010.12.013
16. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, Siegel MH, Flegel WA. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 2000;95:2699-2708. doi:10.1016/S0887-7963(01)80057-2
17. Dogic V, Bingleac-Popovic J, Babic I, Hundric-Haspl Z, Jurakovic-Loncar N, Mratinovic-Mikulandra J, Vuk T, Balija M, Jukic I. Distribution of weak D types in Croatian population. *Transfus Med.* 2011;21:278-279. doi:10.1111/j.1365-3148.2011.01071.x
18. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L, Poole I, Chabert T, Sousa G. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion.* 2006;46(suppl.):141A-142A (abstract). doi:10.1111/j.1537-995.2006.01023_1.x
19. St-Louis M, Richard M, Cote M, Ethier C, Long A. Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology.* 2011;27:20-24.
20. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, Jonson ST, Katz L, Queenan JT, Vassallo RR, Simon CD. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015;55:680-689. doi:10.1111/trf.12941
21. Levitt J, ed. *Standards for blood banks and transfusion service.* 29th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 2014.
22. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д., Оловникова Н.И. Случай выявления антигена системы Резус D weak 15-го типа. *Гематология и трансфузиология.* 2014;59(4):23-24.
23. 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.
24. Пискунова Т.М. Редкий фактор крови Du. *Проблемы гематологии.* 1973;5:3-9.
25. Оловникова Н.И., Митерев Г.Ю. Современная стратегия определения резус-принадлежности крови: проблема Du фенотипа в трансфузиологической и акушерской практике. *Справочник заведующего КДЛ.* 2010;4:5-16.
26. Haspel RL, Westhoff CM. How do I manage Rh typing in obstetric patients? *Transfusion.* 2015;55:470-474. doi:10.1111/trf.12995

Поступила 17.03.2016