



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.10.4.005>
УДК 15.38. (091) (470.44)



Гольдинберг Б.М.✉, Дикая Т.В.

б-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Исторические аспекты открытия и изучения полиморфизма антигена RhD серологическими и молекулярно-генетическими методами

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – все авторы; сбор и обработка материала – Дикая Т.В.; анализ и интерпретация данных – все авторы; подготовка рукописи – все авторы; окончательное одобрение рукописи – Гольдинберг Б.М.

Подана: 17.06.2024

Принята: 20.08.2024

Контакты: 6gkb-trfz@mcct.by

Резюме

Введение. Одним из наиболее иммуногенных антигенов является RhD, что имеет существенное значение в трансфузиологии и акушерстве. Серологическое отличие между RhD-положительными и RhD-отрицательными эритроцитами не всегда однозначно из-за различной степени экспрессии антигена на эритроцитах, проявляющейся его полиморфизмом. На сегодняшний день известно более 700 аллелей гена RHD, и их число постоянно растет благодаря внедрению новых иммуногематологических методов, в том числе молекулярно-генетических. Неоднозначно и само наименование системы Rh с исторической точки зрения.

Цель. Осуществить исторический обзор и систематизировать периоды открытия антигена RhD, отобразить выявление его полиморфизма благодаря прогрессу в сфере иммуногематологической диагностики.

Результаты. В 1940 г. K. Landsteiner, A.S. Wiener обнаружили новую систему антигенов эритроцитов Rh-Hr. Однако через много лет было установлено, что фактор, найденный у макаки-резус, отличается по строению от Rh-фактора человека, который открыли K. Landsteiner и A.S. Wiener. Сохранившийся образец сыворотки женщины по имени Mary Seno в 1962 г. был исследован R.E. Rosenfield, H.H. Allen et al., которые нашли в нем активные анти-D-антитела класса IgG. Ошибочное наименование самой системы Rh, не имеющей отношения к обезьянам, решили не менять, но обозначать как Rh и произносить как «эр эйч».

Авторы систематизировали данные научных публикаций с 1940 г. по настоящее время и впервые провели их периодизацию. В основу хронологии положены применяемые методы лабораторного исследования полиморфизма антигена RhD, диагностические тесты на аллосенсибилизацию, а также проведение ее специфической профилактики.

Выводы:

1. В хронологии изучения системы Rh и ее антигена RhD можно выделить три периода: а) открытия системы антигенов эритроцитов Rh-Hr с применением сывороток, изготовленных кустарными методами (1940–1960); б) совершенствования способов массового получения сыворотки антирезус и серологических методов

определения антигена RhD (1961–1991); в) изучения полиморфизма RhD с применением стандартизированных моноклональных реагентов и молекулярно-генетических методов (с 1992 г. по настоящее время).

2. Результаты многочисленных исследований доказывают значительное разнообразие вариантов антигенов RhD и RhCE. Определены оптимальные серологические методы для выявления полиморфизма антигенов системы, однако их возможности ограничены.
3. Внедрение в практику иммуногематологических лабораторий методов молекулярно-генетического типирования гена RHD должно способствовать персонализации трансфузионной терапии компонентами крови, повышению безопасности гемотрансфузий и улучшению профилактики аллоиммунизации реципиентов и беременных женщин, а также обеспечить диагностику RhD плода неинвазивным методом по крови RhD-отрицательной матери.

Ключевые слова: антиген RhD, полиморфизм, лабораторный метод, тест, период

Gol'dinberg B.✉, Dzikaya T.
6th City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Historical Aspects of the Discovery and Study of the Polymorphism of the RhD Antigen by Serological and Molecular Genetic Methods

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – all authors; collection and processing of material – Dzikaya T.; the analysis and the interpretation of the data – all authors; the preparation of the manuscript – all authors; the final approval of the manuscript – Gol'dinberg B.

Submitted: 17.06.2024

Accepted: 20.08.2024

Contacts: 6gkb-trfz@mcct.by

Abstract

Introduction. One of the most immunogenic antigens is RhD that is essential in transfusiology and obstetrics. The serological difference between RhD-positive and RhD-negative erythrocytes is not always unambiguous due to the varying degree of antigen expression on erythrocytes manifested by its polymorphism. Nowadays more than 400 alleles of the RHD gene are known and their number is constantly growing due to the introduction of new immunohematological methods including molecular genetic ones. The very name of the Rh system is ambiguous from a historical point of view.

Purpose. To conduct a historical review and systematize the periods of discovery of the RhD antigen, to display the identification of its polymorphism due to progress in the field of immunohematological diagnostics.

Results. In 1940, K. Landsteiner and A.S. Wiener discovered a new system of Rh-Hr erythrocyte antigens. However, many years later it was determined that the factor found in the Macaque-Rhesus differs in its structure from the human Rh factor discovered by K. Landsteiner, A.S. Wiener. The preserved serum sample of this woman was examined



in 1962 by R.E. Rosenfield, H.H. Allen et al. who found active anti-D antibodies of the IgG class in it. The incorrect name of the Rh system itself which has nothing to do with monkeys was decided not to change but to denote and pronounce it as Rh.

The authors have systematized the data of the scientific publications since 1940 to the present and carried out their periodization for the first time in the literature. The chronology is based on the applied methods of laboratory investigation of RhD antigen polymorphism, diagnostic tests for allosensitization, as well as its specific prevention.

Conclusion:

1. The chronology of the study of the Rh system and its RhD antigen can be presented by three periods: a) discovery of the Rh-Hr erythrocyte antigen system with the use of serums made by artisanal methods (1940–1960); b) improvement methods for mass production of antiresus serum and serological methods for determining antigen RhD (1961–1991); c) studying RhD polymorphism applying standardized monoclonal reagents and molecular genetic methods (since 1992 to the present).
2. The results of numerous studies prove a significant variety of variants of RhD and RhCE antigens. Optimal serological methods for detecting polymorphism of the antigens of the system have been determined but their possibilities are limited.
3. Putting the methods of molecular genetic typing of the RHD gene into the practice of immunohematology laboratories should contribute to the personalization of transfusion therapy with blood components and increase the safety of blood transfusions, ensure the prevention of alloimmunization of recipients and pregnant women as well as ensure the diagnosis of fetal RhD by a non-invasive method based on the blood of a RhD-negative mother.

Keywords: RhD antigen, polymorphism, laboratory method, test, period

■ ВВЕДЕНИЕ

Антигены эритроцитов человека являются структурными образованиями, расположенными на внешней поверхности мембраны эритроцитов и обладающими способностью взаимодействовать с соответствующими антителами, а также образовывать комплекс из антигена и антитела. Антигены эритроцитов наследуются от родителей.

Одним из наиболее иммуногенных антигенов является RhD, что имеет существенное значение в трансфузиологии и акушерстве. Антиген определяется как RhD-положительный или RhD-отрицательный на основании его присутствия или отсутствия на поверхности эритроцитов. Однако серологическое отличие между RhD-положительными и RhD-отрицательными эритроцитами не всегда однозначно из-за различной степени экспрессии антигена на эритроцитах и характеристик анти-D сыворотки, используемой для типирования эритроцитов. Двусмысленное определение RhD может быть сложной задачей для беременных женщин, реципиентов и доноров.

Кроме того, экспрессия и распространение Rh-антигенов могут зависеть от этнической принадлежности, а постоянно растущее количество новых аллелей представляет собой проблему в трансфузионной медицине и акушерстве. На сегодняшний

день известно более 700 аллелей гена RHD. Они открываются путем внедрения новых иммуногематологических методов, в том числе молекулярно-генетических.

Неоднозначно и само наименование системы Rh с исторической точки зрения.

Систематизацию материалов об открытии полиморфизма антигена RhD в доступных литературных источниках мы не нашли.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Осуществить исторический обзор и систематизировать периоды открытия антигена RhD, отобразить выявление его полиморфизма благодаря прогрессу в сфере иммуногематологической диагностики.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала использованы научные публикации о системе Rh с целевым отбором сведений по антигену D, включая опубликованные ранее собственные работы. Изучив научные публикации о системе Rh, мы отобрали сведения по антигену D и составили его описания в хронологическом порядке.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Период открытия системы антигенов эритроцитов Rh-Hr

В 1939 г. P. Levine (уроженец белорусского города Клецка, эмигрировавший в 1908 г. с родителями в США) [23] и E.R. Stetson опубликовали доклад об обнаружении ими в сыворотке крови женщины по имени Mary Seno антител после ее родоразрешения мертвым плодом. Они сделали правильный вывод: в течение беременности организм матери был иммунизирован каким-то антигеном плода, унаследованным им от отца [44].

Под руководством K. Landsteiner один из наиболее талантливых его учеников A.S. Wiener в 1940 г. обнаружил новую систему антигенов эритроцитов Rh-Hr. A.S. Wiener обратил внимание, что сыворотки морских свинок и кроликов после иммунизации эритроцитами обезьян макак-резус агглютинируют не только эритроциты макак, но и эритроциты людей. Эритроциты, содержащие резус-фактор, были обозначены как резус-положительные (Rh+), а не содержащие его – как резус-отрицательные (Rh– или Hr). Большинство исследователей считали, что гетероиммунные антитела, полученные K. Landsteiner, A.S. Wiener, имеют такую же специфичность, что и антитела, обнаруженные P. Levine, E.R. Stetson в сыворотке крови женщины, т.е. они могут обусловить посттрансфузионные осложнения и гемолитическую болезнь новорожденного [44].

Однако через много лет было установлено, что фактор, найденный у макаки-резус, отличается по строению от Rh-фактора человека, который открыли K. Landsteiner, A.S. Wiener. Сохранившийся образец сыворотки той женщины в 1962 г. был исследован R.E. Rosenfield, H.N. Allen et al., которые нашли в нем активные анти-D-антитела класса IgG [14]. Справедливости ради, в 1963 г. фактор, обнаруженный у макаки-резус, в честь его первооткрывателей был назван фактором Ландштейнера – Винера (он выделен у человека в отдельную эритроцитарную систему 016 – LW). Антигены системы LW не имеют ничего общего с антигеном D системы Rh и присущи эритроцитам как человека, так и обезьян.



Ошибочное наименование самой системы Rh, не имеющей отношения к обезьянам, решили не менять, но обозначать как Rh и произносить как «эр эйч». По выражению P. Levine, само наименование «система резус» представляет собой не что иное, как *misnomer*, т.е. «неправильное употребление термина» [44].

Открытие Rh-фактора стало крупным достижением в иммуногематологии, сопоставимым по значимости для медицины и биологии с открытием групп крови по системе ABO. A.S. Wiener, H.R. Peters (1940) показали возможность выработки иммунных антител анти-Rh у человека.

Порядок наследования Rh-фактора был установлен K. Landsteiner, A.S. Wiener (1941) благодаря результатам семейных обследований 60 супружеских пар и 237 их детей [44].

В 1938 г. R.R. Darrow высказал предположение об иммунной этиологии гемолиза эритроцитов плода при конфликте по системе ABO. По его мнению, эритроциты плода проникают в кровоток матери, где образуются антитела на чужеродный антиген, а затем трансплацентарно антитела переходят в кровоток плода и разрушают его эритроциты [9]. Открытие RhD-антигена способствовало точному описанию патофизиологических механизмов эритроblastоза у плода, которое в 1941 г. дали P. Levine, E.M. Katzin, L. Burnham. Они впервые предложили механизм развития гемолитической болезни новорожденного (фетального эритроblastоза) по системе Rh. По мнению авторов, Rh-отрицательная женщина, беременная плодом, который унаследовал от своего биологического отца RhD-фактор, вырабатывает на этот чужеродный ей антиген соответствующие антитела. Циркулирующие в ее крови анти-Rh антитела через плаценту переходят к плоду в конце беременности и во время родов. Такое блестящее предположение было доказано L.H. Rasch (1949) на большом фактическом материале тяжелых патологических осложнений у плодов и новорожденных вплоть до их гибели при изосенсибилизированной беременности по системе Rh [44].

Период совершенствования способов массового получения сыворотки антирезус и методов определения антигена RhD

В 1940–1960 гг. предлагались и совершенствовались способы получения сыворотки антирезус и методы определения антигена RhD [3, 7, 27, 33, 34, 36, 39, 42, 46, 56, 63, 70].

Н.И. Блинов один из первых в СССР предложил технику приготовления стандартов для определения фактора Rh [10]. Сыворотку антирезус получали из следующих источников: 1) от беременных женщин при титре у них RhD-антител не ниже 1:16 в объеме до 200 мл 2 раза в месяц до 8-го месяца беременности; 2) из ретроплацентарной крови при условии ее хранения до 20 часов в комнатном холодильнике для отделения сыворотки; 3) от реципиентов во время заменного переливания крови (бутылки с выпущенной кровью в объеме 500–600 мл в течение 20 часов хранились в комнатном холодильнике, после чего сыворотка сливалась и консервировалась); 4) от изоиммунных доноров, которым предварительно с целью иммунизации с интервалом в 4 дня проводили 5 внутривенных введений донорской крови с RhD-положительным антигеном и через 4 месяца повторяли цикл иммунизации – 3 внутривенные инъекции по 5 мл с теми же интервалами – 4 дня [49].

В 1945 г. R.R.A. Coombs, A.E. Mourant, R.R. Race предложили антиглобулиновый тест, который до сих пор не утратил своей значимости и остается наилучшим методом индивидуального подбора донорских эритроцитов [12]. Реактив получают путем инъекции глобулина человека животным, которые продуцируют поликлональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам человека и факторам системы комплемента человека. Можно использовать более специфические реагенты Кумбса или моноклональные антитела. Суть данного метода заключается в том, что антиглобулиновая сыворотка, содержащая антитела к иммуноглобулинам человека, при реакции с эритроцитами, сенсibilизированными неполными антителами, приводит к их агглютинации. В зависимости от того, фиксированы ли антитела на поверхности эритроцитов или находятся в свободном состоянии в плазме крови, применяется прямая или непрямая проба Кумбса.

В СССР клиническое изучение антигена D системы Rh и его роли в патогенезе посттрансфузионных осложнений и этиологии гемолитической болезни новорожденного началось в 1950-х гг. [38, 56, 62, 64, 65].

Свой вклад в разработку тестирования антигена RhD внесли и белорусские ученые Т.С. Барташевич, Р.М. Пузевская, Л.В. Иванов, В.И. Левин, А.А. Ракитянская, С.С. Харамоненко [6, 24, 25, 29–31, 45, 47].

В 1950-х гг. был разработан тест на определение фетального гемоглобина в кровотоке матери (тест Kleinchauer-Betke, 1957), свидетельствующий о фето-материнском кровотечении, которое и приводит к началу заболевания [22, 32, 59].

Ученые Великобритании и США установили, что антирезус-иммуноглобулин, введенный Rh-отрицательным женщинам в послеродовом периоде, снижает вероятность развития последующей иммунизации [15], а исследователи из Германии уточнили, что при уже имеющейся сенсibilизации антирезус-иммуноглобулин не эффективен [11, 18, 53].

В 1968 г. американские исследователи получили разрешение на использование антирезус-гамма-глобулина. С тех пор за рубежом он широко применяется как для послеродовой, так и для антенатальной профилактики. В нашей стране антирезус-иммуноглобулин был внедрен в практику благодаря работам В.М. Сидельниковой и ее учеников [2, 8, 22, 51, 55].

В 1956 г. Минздравом СССР была утверждена инструкция по определению резус-принадлежности крови у пациентов, доноров и других лиц (в 1965 г. была пересмотрена). Для этих целей применялись методы конгломинации с использованием желатина в пробирках и сывороточной среде на чашках Петри; в солевой среде в маленьких пробирках; экспресс-методы при комнатной температуре на плоскости, приготовленной на альбумине или полиглюкине [24].

В 1960 г. в СССР начали открываться резус-лаборатории в учреждениях родовспоможения как с диагностической целью, так и для заготовки сырья из венозной и ретроплацентарной крови от аллосенсibilизированных женщин. С 1960 г. переливание крови в стране стали проводить с учетом совместимости по антигену RhD [24].

С 1968 г. начали ставить отметку в паспортах и других документах, удостоверяющих личность граждан СССР, о группе и резус-принадлежности крови. Приказом министра здравоохранения СССР от 15 января 1970 г. было утверждено положение о станции переливания крови, в структуре которой как самостоятельное подразделение была выделена резус-лаборатория [24].



Период изучения полиморфизма RhD с применением стандартизированных моноклональных реагентов и молекулярно-генетических методов

Уже к 1943 г. стало известно, что система Rh является сложной по составу. A.S. Wiener с помощью 5 основных антисывороток (анти-D, анти-C, анти-E, анти-c и анти-e) установил 5 различных антигенных факторов этой системы. Сегодня система Rh является одной из наиболее полиморфных групповых систем крови, насчитывающей 59 антигенов и свыше 400 аллелей.

Среди европейцев RhD-отрицательным антигеном обладают 15–17% людей, в Южной Африке – 5%, в Японии, Китае, Монголии и Корее – 3%. Напротив, у басков лишь 34% D-положительных лиц. В Барановичском районе Беларуси частота встречаемости RhD-отрицательного антигена среди первичных доноров крови составляет 20,44% [26].

Отметим, что у европеоидов основной причиной D-отрицательности является делеция гена RHD, в то время как у негроидов и монголоидов часто выявляется неактивный (молчащий) ген RHD или гибридный ген RHD-CE-D, не экспрессирующий антиген D. 20% D-отрицательных японцев имеют резус-фенотип DEL, характеризующийся очень низким уровнем экспрессии антигена D [61].

Первым о существовании слабых вариантов антигена D, обозначенных как Du, сообщил F. Stratton в 1946 г. [58] Термином Du называли антиген D на тех эритроцитах, которые не агглютинировались анти-D-антителами класса IgM, но давали положительный результат с анти-D-антителами класса IgG в непрямом антиглобулиновом тесте. Чистых анти-Du-антител не выделено: у D-отрицательных пациентов 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 D weak [1].

Прорыв в понимании молекулярных основ системы Rh произошел в начале 1990-х гг., когда были клонированы гены локуса RH – ген RHD и ген RHCE. Так, B.Y. Colin et al. (1991) выяснили, что RhD-положительные лица имеют два гена – RHD и RHCE, кодирующие выработку Rh-антигенов, а RhD-отрицательные имеют один ген RHCE. На основании этого открытия P. Tippet et al. (1996) выдвинули концепцию отличия строения RhD-положительного и RhD-отрицательного антигенов (рис. 1).

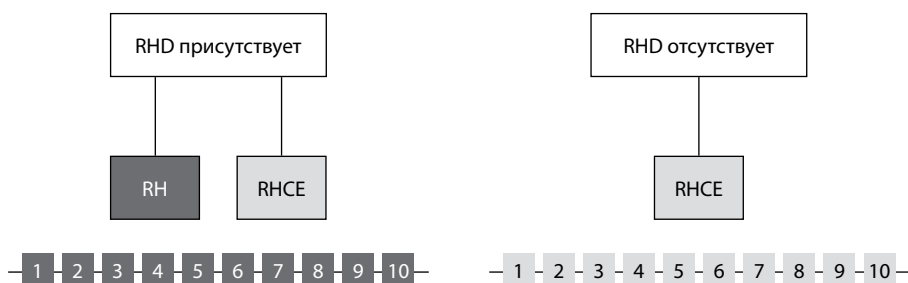


Рис. 1. Схематичное изображение RHD-положительного и RHD-отрицательного генов
Fig. 1. Schematic image of RHD-positive and RHD-negative genes

Классический, или дикий, антиген RhD имеет сложное строение из 37 частей (эпитопов) [52].

Протеин RhD (как и протеин RhCE) – это молекула, 12 раз пересекающая мембрану эритроцитов в направлении от внутренней поверхности к наружной и затем вновь ко внутренней с С- и N-концами, ориентированными к цитоплазме (рис. 2). В мембране одного эритроцита содержится от 10 до 30 тыс. молекул ключевых Rh-антигенов.

F.F. Wagner et al. представили доказательства взаимосвязи между смысловыми мутациями в гене RHD и снижением экспрессии антигена RhD вследствие нарушения интеграции резусного белка в мембрану эритроцитов [67]. 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.

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 меньше по сравнению с классическим антигеном, возможна выработка анти-D-антител) [1], 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) [60], и антиген RhDEL [13, 35]. Эритроциты с антигеном RhDEL при использовании серологических методов обычно идентифицируют как RhD-отрицательные; его выявляют, как правило, с помощью методов адсорбции – элюции [54]. У носителей этого антигена возможен синтез анти-D-антител.

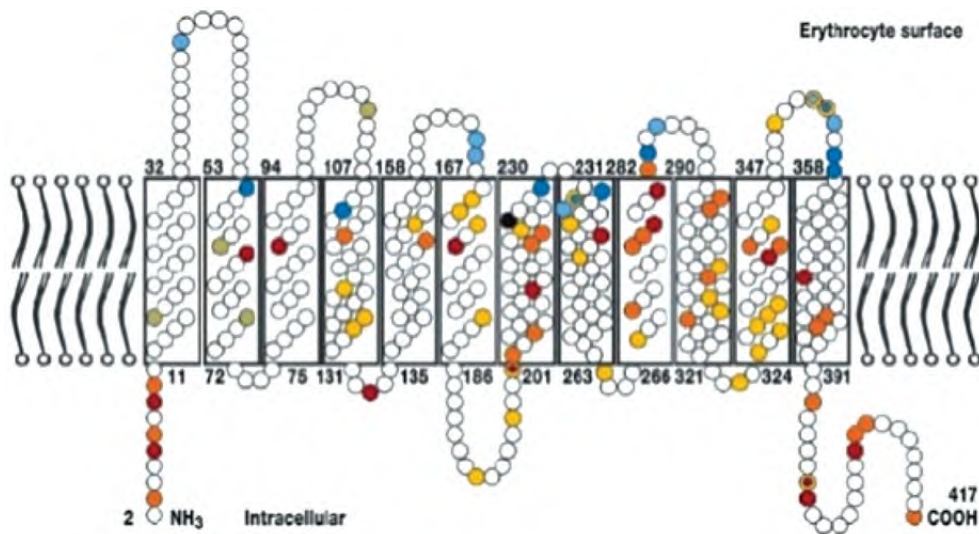


Рис. 2. Модель протеина RhD на эритроците (по M. Conroy et al., 2005)

Fig. 2. A model of the RhD protein on a red blood cell (according to M. Conroy et al., 2005)



Появление новых фенотипов RhD – D 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 [4, 68].

К настоящему времени описан 161 тип антигена RhD weak, которые обозначают как RhD weak type 1 ... 161 или по нуклеотидным заменам в гене [21].

Антиген RhD partial отличается от классического антигена RhD качественными изменениями в структуре антигена – эпитопах (рис. 3).

Мутация объясняется возможным во время мейоза обменом ДНК между генами RHD и RHCE, расположенными на одной хромосоме. В результате в гибридном гене RHD утраченная часть замещается CE-пептидной последовательностью. Наиболее часто встречается фенотип DVI антигена RhD partial (0,01–0,1% у европеоидов и 1,0–1,7% у негроидов) [60]. В Беларуси частота его встречаемости не изучена.

В последнее время RhD weak и RhD partial обозначаются общим термином «вариантные антигены». Термин Du в литературе больше не используется [40].

В 1989 г. для проведения иммуногематологических исследований Y. Lapierre была предложена гелевая технология (называется также колоночной), основанная на реакции агглютинации эритроцитов в агаровом геле «сефадекс», помещенных в микропробирки. Она позволила стандартизировать реакции гемагглютинации и получать достоверные результаты исследования [40, 66].

Для проведения тестов могут применяться три вида геля: 1) нейтральный, не содержащий специфических антител (применяется для поиска и идентификации антител солевым и ферментативным методами, в холодной стадии пробы на совместимость крови донора и реципиента); 2) специфический, содержащий антитела (моноклональные или поликлональные) к антигенам эритроцитов крови человека (применяется для типирования антигенов эритроцитов систем ABO, Rh, Kell и т.д.); 3) антиглобулиновый, содержащий антитела (поли- или моноспецифические) к иммуноглобулинам

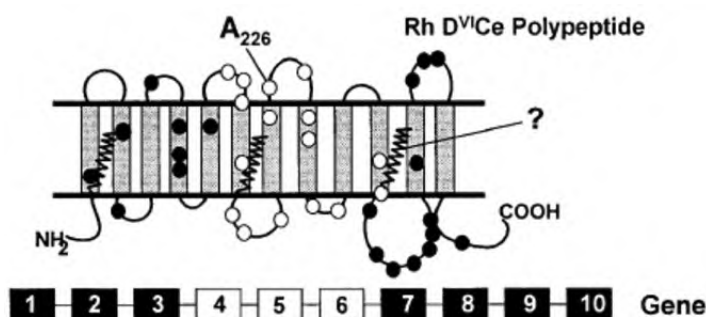


Рис. 3. В результате генной конверсии ряд эпитопов антигена D утрачивается и заменяется на эпитопы других антигенов (экзоны 4, 5 и 6 претерпели качественное изменение)

Fig. 3. As a result of gene conversion a number of antigen D epitopes are lost and replaced by epitopes of other antigens (exons 4, 5 and 6 have undergone a qualitative change)

человека и компонентам системы комплемента (применяется для прямого и непрямого антиглобулинового теста (реакции Кумбса), при поиске и идентификации ауто- и аллоиммунных антител, пробе на совместимость крови донора и реципиента).

Исследуемые или стандартные эритроциты и исследуемая сыворотка (плазма) помещаются в соответствующие микропробирки, где происходит реакция агглютинации, затем идентификационные карты центрифугируются для разделения результатов реакции. При этом неагглютинированные эритроциты свободно проходят между частицами геля и образуют на дне микропробирки компактный осадок красного цвета – отрицательный результат, агглютинированные же располагаются на поверхности или в слое геля (в зависимости от размеров агглютинатов) – положительный результат.

В зависимости от силы реакции агглютинации в гелевой среде принята следующая оценка полученных результатов (рис. 4):

- сильноположительный (++++ – образовавшиеся агглютинаты эритроцитов задержались на поверхности геля;
- положительный (+++) – агглютинаты располагаются в верхней трети столбика геля;
- слабоположительный (++) – агглютинаты зафиксированы в верхних двух третях геля;
- очень слабоположительный (+) – агглютинаты располагаются в нижней трети геля;
- отрицательный (–) – эритроциты формируют на дне микропробирки компактный осадок.

Размер частиц геля, специальный подбор моно- или поликлональных антител позволяют достичь наилучших данных чувствительности и специфичности, а прозрачность геля делает считывание результатов более надежным и позволяет интерпретировать самые сложные диагностические случаи (включая Dw, DVI).

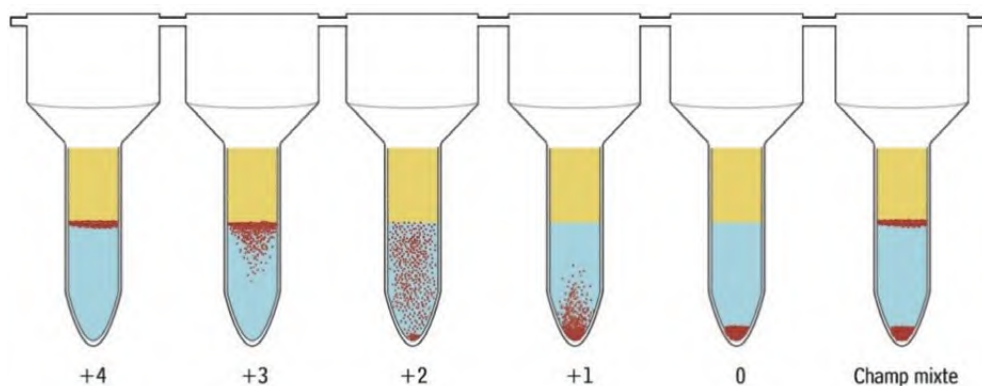


Рис. 4. Варианты результатов исследования с применением гелевой технологии (пояснение в тексте)

Fig. 4. Variants of the study results using gel technology (the explanation is in the text)



К другим преимуществам описываемой технологии следует отнести: удобство и простоту исследования; повышение безопасности персонала; отсутствие этапов отмывания эритроцитов; исследование крови, заготовленной на консервантах и стабилизаторах без искажения результатов; сокращение времени на проведение полного иммуногематологического исследования в 2–5 раз (особенно в автоматическом режиме с компьютерной обработкой результатов); снижение риска заражения персонала инфекциями, передающимися через кровь; возможность использования небольших объемов крови, что наиболее актуально в неонатологии и педиатрии.

Несмотря на то что использование реактивов на основе моноклональных антител в последние годы значительно улучшило качество типирования антигенов эритроцитов, в сложно диагностируемых случаях, связанных с выявлением антигена D, встречаются затруднения [16, 20]. Это объясняется тем, что количество сайтов антигена D на эритроцитах у слабых типов D варьирует от 70 до 4000 по сравнению с 13 000–24 000 для нормально выраженного антигена D [17, 67, 68]. Уменьшение количества эпитопов антигена D на мембране эритроцитов приводит к слабой агглютинации или ее отсутствию при тестировании образца крови серологическими методами [50]. Кроме того, при определении RhD-принадлежности крови возможны расхождения результатов, полученных при использовании различных методов исследований или реагентов разных производителей [40]. В таких случаях достоверный результат можно получить только с помощью молекулярно-генетического анализа [19]. За рубежом разработаны и успешно применяются методы генотипирования, позволяющие достоверно определять присутствие тех или иных вариантов антигенов на клетках крови [21, 41, 50].

Различные фенотипы и генотипы вариантов RhD имеют особое клиническое значение и требуют стратегий переливания крови [57]. Несоответствие группы крови RhD у донора и реципиента может вызвать острый тяжелый иммунный ответ, приводящий к гемолитической болезни новорожденных, гемолитической реакции переливания крови и аутоиммунной гемолитической болезни. Следовательно, генотипирование требуется для определения молекулярных характеристик доноров или реципиентов с вариантом RhD, что полезно для лечения заболевания. Как альтернатива рутинному серологическому тестированию генотипирование имеет значительное потенциальное значение в клинической практике.

В службе крови Беларуси с 2019 г. применяется только неинвазивный метод определения RhD плода по крови матери. ДНК плода (ffDNA – fetal free DNA), извлеченную из венозной крови беременной женщины, впервые выделили в 1997 г. Y.M.D. Lo et al. [37]. На сегодняшний день доказано, что циркулирующая ffDNA появляется в маточном кровотоке в исходе апоптоза и некроза ядродержащих клеточных элементов плаценты, созревания эритроцитов и тромбоцитов, активного выделения клетками нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство, а также деградации плодовых эритроцитов, проникающих через фетоплацентарный барьер [5].

Уже с 5-й недели гестации фетальная внеклеточная ДНК может быть обнаружена в материнском кровотоке и позволяет получить достоверный результат к 7 неделям беременности (более 4%). При этом уровень ее растет на протяжении всего гравидарного периода (на 0,1% в неделю с 10-й по 21-ю неделю беременности и на 1% после 21-й недели гестации), достигая максимума перед родами [5, 69].

В 2011 г. сформировался новый лабораторный неинвазивный пренатальный тест (НИПТ) обследования плода с помощью анализа cfDNA. Метод получил официальное признание Международной ассоциации по пренатальной диагностике и стал использоваться для детекции сначала болезни Дауна, а затем и трисомий по другим аутосомам. После ряда усовершенствований технологии секвенирования тест ДНК стал применяться и для определения RhD-принадлежности плода [48].

Трудность в исследовании молекулярного механизма Rh-группы крови заключается не только в анализе последовательности, но и в выявлении рекомбинации RHD-CE и изменения числа копий гена RHD [28]. Однако в этой области доступно несколько точных методов выявления. Количество копий гена RHD напрямую влияет на экспрессию его поверхностного антигена, что имеет большое значение для пренатальной диагностики и профилактики гемолитической болезни плода и новорожденного [43].

Следовательно, определение количества копий гена RHD имеет решающее значение. В настоящее время анализ MLPA и гибридизационный боксовый тест являются относительно подходящими методами для выявления гетерозиготности.

■ ВЫВОДЫ

1. В хронологии изучения системы Rh и ее антигена RhD можно выделить три периода: а) открытия системы антигенов эритроцитов Rh-Hr с применением сывороток, изготовленных кустарными методами (1940–1960 гг.); б) совершенствования способов массового получения сыворотки антирезус и серологических методов определения антигена RhD (1961–1991 гг.); в) изучения полиморфизма RhD с применением стандартизированных моноклональных реагентов и молекулярно-генетических методов (с 1992 г. по настоящее время).
2. Результаты многочисленных исследований доказывают значительное разнообразие вариантов антигенов RhD и RhCE. Определены оптимальные серологические методы для выявления полиморфизма антигенов системы, присутствие которых можно в основном предположить по расхождению результатов серологических методов исследования, непрямого антиглобулинового теста в гелевых колонках. Это объясняется тем, что в настоящее время в иммуногематологической практике нет серологических методов и реактивов, которые обеспечивали бы определение всех без исключения типов D weak.
3. Внедрение в практику иммуногематологических лабораторий методов молекулярно-генетического типирования гена RHD должно способствовать персонализации трансфузионной терапии компонентами крови, повышению безопасности гемотрансфузий и улучшению профилактики аллоиммунизации реципиентов и беременных женщин, а также обеспечить диагностику RhD плода неинвазивным методом по крови RhD-отрицательной матери.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 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.
2. Ajlamazyan E.K., Pavlova N.G. (2012) *Isoimmunization during pregnancy*. SPb.: N-L. (in Russian)
3. Ashkenazi A.Ya. (1964) *On the mass determination of the Rh factor (obtaining large amounts of universal serum antiresus and the expression method for determining the Rh factor)*: Murmansk – Leningrad. (in Russian)



4. 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
5. Baranov V.S., Kuznecova T.V., Kasheeva T.K., et al. (2017) *Prenatal diagnosis of hereditary diseases. Status and prospects*. SPb: Eko-Vektor. (in Russian)
6. Bartashevich T.S., Puzevskaya R.M. The Rh factor and its significance in blood transfusion. *Proceedings of BNIIPK*. 1950;136–145. (in Russian)
7. Bashlaj A.G. On the accelerated determination of Rh factor and immune Rh antibodies by conglutination with gelatin. *Problems of hematology*. 1960;7:56–58. (in Russian)
8. Belozeroва V.I. (1997) *Obtaining immunoglobulin antiresus and its use for the prevention of sensitization to the Rh factor*. diss. k. m. n. (in Russian)
9. Beluga M.V. Rhesus conflict: Past and present in problem solving. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2012;1:24–9. (in Russian)
10. Blinov N.I. (1947) On-site preparation technique of standards for determining the Rh factor. *Proceedings of Belarusian Institute of Blood Transfusion*. T.4. Minsk. (in Russian)
11. Clarke C.A. Prevention of Rhesus isoimmunization. *Lancet*. 1968;2(7558):1–7.
12. Coombs R.R.A., Mourant A.E., Race R.R. A new test for the detection of weak and 'incomplete' Rh agglutinins. *Brit J Exp Pathol*. 1945;26:255–266.
13. Daniels G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*. 2013;161:461–70. DOI: 10.1111/bjh.12275
14. Donskov S.I., Morokov V.A. (2011) *Human blood groups*. M.: GEOTAR-Media. (in Russian)
15. Finn R., Clarke C.A., Donohoe W.T.A., et al. // *Br. Med. J.* – 1961. – Vol. 1. – P. 1486.
16. Flegel W.A. Modern Rhesus (Rh) typing in transfusion and pregnancy. *CMAJ*. 2021;193(4):E124. DOI: 10.1503/cmaj.201212
17. Flegel W.A., Zubern I.V., Wagner F.F. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D – red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*. 2009;49:465–471. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01975.x
18. Freda V., Gorman J., Pollack W. Successful prevention of experimental Rh-sensitization preliminary report. *Transfusion (Philad.)*. 1964;4:26–32.
19. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion*. 2005;45:1547–1551. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x
20. 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 diseases of the blood system and healthy individuals. *Onkologematologiya*. 2019;14(3):52–59. DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-3-52-59 (in Russian)
21. Golovkina L.L., Stremouhova A.G., Pushkina T.D., et al. Molecular serological characteristics of the types of weak antigen D of the rhesus system. *Therapeutic archive*. 2016;88(7):78–83. (in Russian)
22. Gol'dinberg B.M. (2012) *Clinical aspects of isoserology in obstetrics and neonatology*. Minsk: Law and Economics. (in Russian)
23. Gol'dinberg B.M. Famous fellow countrymen doctors. Philip Levin from Kletsk (for the 120th anniversary of his birth). *The world of medicine*. 2020;7:45–48. (in Russian)
24. Gol'dinberg B.M., Karpenko F.N., Klimovich O.V. (2023) *Belarus Blood Service: yesterday, today, tomorrow*. Minsk: Kolorgrad. (in Russian)
25. Goldinberg B.M., Klimovich O.V., Sekretova E.B. The formation of clinical transfusiology in Belarus (on the 100th anniversary of the first blood transfusion in the national medicine). *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*. 2023;9(2):94–101. doi. org/10.34883/Pl.2023.9.1.001 (in Russian)
26. Gol'dinberg B.M., Polyko V.L., Mihnienok O.A. Features of distribution and transfusion significance of erythrocyte blood groups according to the ABO, Rh, Kell systems and the population of the Baranovichy district of Belarus. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*. 2024;1(4):483–496. doi.org/10.34883/Pl.2024.10.1.006 (in Russian)
27. Grove-Rasmussen M., Levine P. Occurrence of anti-D and anti-E in absence of obvious antigenic stimuli. *Am. J. Clinical Pathology*. 1954;24:145–149.
28. Haer-Wigman L., Veldhuisen B., Jonkers R., et al. RHD and RHCE Variant and Zygosity Genotyping via Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Transfusion*. 2013;53:1559–74. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03919.x
29. Haramonenko S.S. The chemical nature of human blood agglutinogens. *Modern problems of hematology and blood transfusion*. 1955;31:53–54. (in Russian)
30. Haramonenko S.S., Rakityanskaya A.A. (1974) *Electrophoresis of blood cells in normal and pathological conditions*. Minsk. (in Russian)
31. Ivanov L.V. (1965) *Obtaining large amounts of universal antiresus serums from serums of groups O, A and B containing Rh-antitela* [Tekst]: abstract. dis. k. m. n. Smolensk. (in Russian)
32. Kleinhauer K., Betke K. Demonstration von fetalen Haemoglobin in den Erythrozyten eines Blutausschnitts. *Klin. Wschr*. 1957;35:637–640. (in German)
33. Kornstad L., Ryttinger L., Hogman C. Two sera containing probably naturally occurring anti-Cw, one of them also containing a naturally occurring anti-Wra. *Vox Sang*. 1960;5:330.
34. Kosyakov P.N., Muraveva J.I.N. Blood group antigens in ontogenesis. *Bulletin of Expert Biology*. 1962;9:78. (in Russian)
35. Kwon D.H., Sandler S.G., Flegel W.A. DEL phenotype. *Immunohematology*. 2017;33(3):125–32.
36. Layrisse M., Arends T. Nuevo grupo sanguineo encontrado en descendientes de Indios. *Acta Med. Venezol*. 1955;3(4):132–138.
37. Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997, Aug 16;350:485–487.
38. Masik M.G., Cal Yu.A. (1965) Isoimmune antibodies in multiple transfusions. Abstracts of the 42nd plenum of the Scientific Council of the college "Immunology and blood products". M. (in Russian)
39. Mellison P.L., Mourant A.E., Race R.R. (1952) *The Rh-bloodgroups and their clinical effects*. Privy Council. Medical Research Council Memorandum № 27. London. P. 27.
40. Mineeva N.V. (2020) *Human blood groups. Fundamentals of immunohematology*. SPb: Gangut. (in Russian)
41. Mineeva N.V., Gavrovskaya S.V., Syssoeva E.A., et al. The use of the method of molecular genetic typing to determine variants of weak antigen D in the diagnosis of rhesus affiliation. *Kazan Medical Journal*. 2023;104(3):325–331. DOI: 10.17816/KMJ119540 (in Russian)
42. Mourant A.E. The distribution of the human blood group. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, 1954. Vol. 1.
43. Pirelli K.J., Pietz B.C., Johnson S.T., et al. Molecular Determination of RHD Zygosity: Predicting Risk of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Related to Anti-D. *Prenat Diagn*. 2010;30(12–13):1207–12. DOI: 10.1002/pd.2652
44. Prokop O., Gyöler V. (1991) *Human blood groups*. M.: Medicina. (in Russian)
45. Puzevskaya R.M. Obtaining and using human antiresus serums and comparative evaluation of methods for determining the Rh factor. *Trudy BNIIPK*. 1957;VI:176–180. (in Russian)
46. Race R.R., Sanger R. (1950) *Blood Group in Man*. Oxford, England: Blackwell. Pp. 218–221.
47. Rakityanskaya A.A. (1956) *The significance of species-specific products of blood destruction and their protein complexes in the body's response to blood transfusion: abstract*. Minsk. (in Russian)

48. Rouillac Le Sciellour C., Sérazin V., Brossard Y., et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus. Clin. Biol.* 2007;14(6):572–577.
49. Filatov A.N. (ed.) (1965) *Guidelines for the use of blood and blood substitutes*. L.: Medicina. (in Russian)
50. Sandler S.G., Chen L.N., Flegel W.A. Serological weak D phenotypes: A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol.* 2017;179(1):10–19. DOI: 10.1111/bjh.14757
51. Sandler S.G., Horn T., Keller J., et al. A model for integrating molecular-based testing in a transfusion service. *Blood Transfus.* 2016;14(6):566–572. DOI: 10.2450/2015.0070-15
52. Savel'eva G.M., Konoplyannikov A.G., Kurcer M.A., et al. (2013) Hemolytic disease of fetus and newborn. M.: GEOTAR-Media. (in Russian)
53. Scott M. Section 1A. Rh serology. Coordinators report. *Transfus Clin Biol.* 2002; 9:23–9. DOI: 10.1016/s1246-7820(01)00211-7
54. 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
55. Sidelnikova V.M., Antonov A.G. (2004) *Hemolytic disease of fetus and newborn*. M.: Triada-X. (in Russian)
56. Solov'eva T.N. (1963) *The Rh factor and its significance in clinical practice*. Leningrad. (in Russian)
57. Sreelekshmi S., Shastry S., Poornima Baliga B. Variable Reactivity of Rh D Antigen and its Serological Characterization. *Acta Clin. Belg.* 2021;76(5):346–50. DOI: 10.1080/17843286.2020.1735115
58. Stratton F. A new Rh allomorph. *Nature.* 1946;58:25–26.
59. Tabolin V.A. (1967) *Bilirubin metabolism and neonatal jaundice*. M.: Medicina. (in Russian)
60. Tippett P., Sanger R. Further observations of subdivisions of the Rh antigen D. *Arztl Lab.* 1977;23:476–80.
61. Transfusion 2004;44:703, AABB: Technical Manual, 19th Edition, 2017.
62. Umnova M.A., Ichalovskaya T.A., Bejlina V.B., et al. Features of blood selection and compatibility testing in patients with transfusion complications. *Problems of hematology.* 1967;7:3–7. (in Russian)
63. Uspenskaya O.V. (1966) *Materials on increasing the resources of anti-resus serum, development of methods for determining Rh factor and Rh antibodies and their usage in clinics: abstract*. (in Russian)
64. Vinograd-Frenkel F.R.B., Skopina S.B. The role of the Rh factor in the development and prevention of post-transfusion complications. *Modern problems of hematology and blood transfusion.* 1952;27. (in Russian)
65. Volkova Ji. S. Immunohematology in obstetric practice. *Problems of hematology and blood transfusion.* 1961;1:6–10. (in Russian)
66. Volkova O.Ya. (2008) The use of Scangel gel technology for immunohematological blood tests of donors and recipients of hemocomponents. *Methodological recommendations*. SPb. (in Russian)
67. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H., et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999;93(1):385–93.
68. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B., et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 2000;95(8):2699–2708. DOI: 10.1182/blood.V95.8.2699.008k12_2699_2708
69. Wang E., Batey A., Struble C., et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):662–666.