

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛУЧАЯ РЕДКОГО РЕЗУС ФЕНОТИПА

Чумак А.А.^{1,*}, Белякова В.В.¹, Майорова О.А.¹, Дрозд Т.С.², Данилец В.В.², Ганцова Е.А.³, Еремина И.З.³

¹ ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения Москвы», 125284, Москва, Россия

² ГБУЗ «Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского Департамента здравоохранения Москвы», 124489, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», 117198, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Система RH представлена основными антигенами D, C/c и E/e, кодируемыми двумя родственными генами *RHD* и *RHCE*. Однако бывают случаи, когда антигены системы RH не определяются при стандартном серологическом типировании. Например, фенотип –D– характеризуется отсутствием экспрессии антигенов C, c, E и e на поверхности эритроцитов вследствие различных генетических перестроек в гене *RHCE*.

Цель — представить обследование семьи, где у двух sibсов, кадровых доноров, определен дефицитный фенотип –D– при нормальном фенотипе резус у родителей.

Основные сведения. Проведено обследование семьи Н., состоящей из 4 человек: родителей и двух сыновей. Причиной обследования стал необычный фенотип –D– у sibсов, которые в настоящий момент являются кадровыми донорами. Все члены семьи идентифицировали себя как татары. Серологические исследования были выполнены с помощью гелевой технологии. Геномную ДНК членов семьи, а также кДНК sibсов исследовали методами аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), экзон-специфичной ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Проводили анализ числа копий экзонов 1 и 7 для идентификации рекомбинаций генов *RHD* и *RHCE*, ставших причиной резус-дефицитного фенотипа. При серологическом типировании sibсов определялся только антиген D, в то время как антигены C/c и E/e отсутствовали. Молекулярно-генетический анализ позволил предположить, что причиной фенотипа –D– у братьев стал гибридный аллель *RHCE-D(3-8)-CE* в гомозиготном статусе, образующий с нормальным аллелем *RHD* гаплотип, унаследованный от каждого родителя. Последовательность первых двух экзонов в гибридном аллеле соответствовала последовательности *RHCE*С*. Родители являются гетерозиготными носителями выявленного аллеля, поэтому экспрессия антигенов C/c и E/e у них не нарушена.

Заключение. Идентификация генетических причин подобных вариантов у реципиентов необходима для обеспечения безопасности при переливании эритроцитсодержащих компонентов крови. Исследования доноров с резус-дефицитными фенотипами также целесообразно дополнять генотипированием для прогнозирования молекулярной структуры антигенов резус.

Ключевые слова: антигены резус, иммуногематология, серологические методы, генотипирование, резус-дефицитный фенотип, геноконверсия.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Чумак А.А., Белякова В.В., Майорова О.А., Дрозд Т.С., Данилец В.В., Ганцова Е.А., Еремина И.З. Комплексное исследование случая редкого резус фенотипа. 2023; 68(4):485–497. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-4-485-497>

A COMPREHENSIVE STUDY OF RARE RHESUS PHENOTYPE CASE

Chumak A.A.^{1,*}, Belyakova V.V.¹, Maiorova O.A.¹, Drozd T.S.², Daniletz V.V.², Gantsova E.A.³, Eremina I.Z.³

¹ Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrilov, 125284, Moscow, Russian Federation

² City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky, 124489, Moscow, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. The RH system includes major antigens D, C/c and E/e encoded by two closely related *RHD* and *RHCE* genes. Correct identification of Rh antigens in both donors and recipients is the key to proper transfusion practice. However, there are cases when Rh antigens cannot be detected by standard serological typing. For example, –D– phenotype has no expression of C, c, E, and e antigens on the surface of erythrocytes due to various genetic rearrangements in the *RHCE* gene.

Aim: to present a study of a family where two siblings have a deficient -D-phenotype with a normal rhesus phenotype in the parents

Materials and methods. A comprehensive study of family N., including parents and two sons was conducted. Initially, an unusual phenotype -D- was identified in the siblings, who are currently donors. All family members identified themselves as Tatars. Serology tests were performed using gel cards. Genomic DNA of family members, as well as cDNA of siblings, was examined by allele-specific PCR, exon-scanning assay, and Sanger sequencing. In addition, copy number analysis was performed to identify rearrangements in the *RHD* and *RHCE* genes.

Results. During serological typing of siblings, only the D antigen was revealed, while the C/c and E/e antigens were absent. Molecular genetic analysis suggested that the cause of the phenotype –D– in the brothers was a hybrid allele *RHCE-D(3-8)-CE* in homozygous status, forming a haplotype inherited from each parent with the normal *RHD* allele. The sequence of the first two exons in the hybrid allele corresponded to *RHCE**C allele. The parents were heterozygous for the identified allele, so the expression of C/c and E/e antigens was not altered.

Conclusion. Two donors with the –D– phenotype were assessed by comprehensive study. Identification of the genetic causes of such variants in recipients is necessary to ensure safety during transfusion of erythrocyte-containing blood components. Genotyping of donors with Rh-deficient phenotypes is also highly recommended in order to predict the molecular structure of Rh antigens.

Key words: Rh antigens, immunohematology, serologic methods, genotyping, Rh-deficiency, gene conversion

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

Financial disclosure: This study received no sponsorship.

For citation: Chumak A.A., Belyakova V.V., Maiorova O.A., Drozd T.S., Daniletz V.V., Gantsova E.A., Eremina I.Z. A comprehensive study of rare Rhesus phenotype case. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (*Gematologiya i transfuziologiya*). 2023;68(4):485–497 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-4-485-497>

Введение

Система резус представлена группой поверхностных антигенов эритроцитов, ассоциированных с высоким риском аллоиммунизации при гемотрансфузиях. От других систем групп крови ее отличает значительная полиморфность, то есть существование множества аллельных вариантов и кодируемых ими полипеп-

тидов. В этой связи представление о молекулярной структуре и распределении разных антигенов резус в популяции необходимо для правильного подбора эритроцитсодержащих компонентов крови (ЭСК) с целью предотвращения аллоиммунизации, а также является ценным инструментом на этапе валидации

результатов серологического типирования в лаборатории [1].

Согласно концепции Р. Tippet [2], система RH контролируется двумя тесно сцепленными генами *RHD* и *RHCE*, расположенными на хромосоме 1. Они кодируют полипептиды RhD и RhCE, экспонирующие антиген D и антигенные C/c и E/e на поверхности эритроцитов [1, 2]. Отличительной особенностью генов является близкое взаиморасположение и ориентация «tail-to-tail», а также высокая степень гомологии — около 93,8 % как в экзонах, так и в интронах, поэтому транслируемые ими антигены имеют более 90 % идентичности. Каждый из белков резус представляет собой полипептидную цепь длиной 417 аминокислотных остатков, которая пронизывает 12 раз мембрану эритроцита и формирует 6 петель, имеющих внеклеточную, трансмембранную и внутриклеточную части [3]. Эпитопы, образованные конфигурацией цепи на поверхности мембраны, определяют антигенные свойства и способность реагировать с моноклональными антителами (МКА) при серологическом тестировании.

Различные генетические перестройки могут влиять на качественный и количественный состав антигенов резус. У 17 % представителей европейской популяции не выявляется антиген D, что связано с полной делецией гена *RHD*. В то же время случаи, когда отсутствуют антигены C/c и E/e, встречаются крайне редко [4]. Среди фенотипов, лишенных антигенов C/c и E/e, описаны резус-дефицитные варианты –D–, Dc–, DCw–, DIV(C)– [4–6]. В фенотипе –D– антигены, образуемые полипептидом RhCE, не определяются при серологическом типировании. Вместе с тем экспрессия антигена D повышена до такой степени, что реагенты IgG анти-D могут агглютинировать эритроциты в солевой фазе [5]. Ожидаемая частота встречаемости комплекса –D– составляет 0,0005 и 0,0047 среди населения Швеции и Исландии, соответственно [7, 8]. При исследовании 620 000 доноров в Японии такой фенотип был выявлен у 7 человек (0,001%) [9]. Аналогичные случаи представлены в работах авторов из Национального института гематологии Индии, где RhCE-дефицитный фенотип выявлен в 10 случаях на 30 000 (0,033 %) обследованных [10]. Было установлено, что вариант –D–, как правило, является результатом грубой делеции гена *RHCE* и/или гибридизации между генами *RHD* и *RHCE*, вероятно, из-за высокой степени их гомологии. В результате генной конверсии участок гена *RHCE* замещается гомологичным участком гена *RHD*. Подобные гибриды не способны транслировать полноценные антигены C/c и E/e, т.к. химерные полипептиды лишены нескольких мембранных эпитопов и не выявляются при рутинном тестировании МКА [4, 9].

Несмотря на то что резус-дефицитные фенотипы скорее являются казуистикой, понимание молекулярно-

генетических причин отсутствия антигенов необходимо как с научной, так и с практической точки зрения.

Цель настоящей работы — представить обследование семьи, где у двух sibсов, кадровых доноров, определен дефицитный фенотип –D– при нормальном фенотипе резус у родителей.

Материалы и методы

Проведено обследование семьи Н., состоящей из 4 человек: родителей (На.Н.-мать, Ну.Н.-отец) и двух сыновей (Э.Н. и А.Н.). Все члены семьи идентифицировали себя как татары. Причиной исследования стал необычный фенотип –D– у сыновей, которые в настоящий момент являются кадровыми донорами. У всех членов семьи получено информированное согласие на обследование.

Серологические методы исследования. Исследование образцов крови проводили с использованием анализатора «IH-1000» и ручными методами с помощью гелевых карт ID-DiaClon ABO/D Reverse Grouping, Coombs Anti-IgG, Rh-Subgroups+K, ID-карта NaCl, реагента ID-DiaClon Anti-D IgG, контрольных образцов IH-QC1 и IH-QC2 фирмы «Bio-Rad» (США, Швейцария). О достоверности результатов, полученных с помощью анализатора, судили на основании параллельного исследования контрольных образцов IH-QC1 и IH-QC2. Система идентификации анализатора «IH-1000» основывалась на процессе определения комплексов «антиген-антитело». Встроенная камера анализировала изображение реакции в каждой микропробирке, а программа интерпретировала результаты реакции в гелевой карте. Система анализатора «IH-1000» позволяла оценивать активность агглютинации эритроцитов от (–) до (++++). Для косвенной оценки экспрессии антигена D провели исследование эритроцитов sibсов Н. с реагентом IgG анти-D в солевой среде. Для сравнения степени агглютинации использовали образцы, ранее исследованные с анти-D IgM при комнатной температуре и при 37 °С с использованием гелевых карт Coombs Anti-IgG и реагента IgG анти-D. В качестве контрольного образца использовали IH-QC1. Реакцию проводили в гелевой карте ID-карта NaCl с добавлением взвеси эритроцитов и анти-D IgG и в карте Coombs Anti-IgG добавлением взвеси эритроцитов, анти-D IgG и физиологического раствора с инкубацией при комнатной температуре 22 °С.

Выделение ДНК. Выделение геномной ДНК для генетического типирования выполняли из лейкоцитов периферической крови методом иммуномагнитной сепарации с помощью реагентов «Protrans AGATHA» (Германия).

Исследование геномной ДНК. Первичное генотипирование членов семьи выполняли методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (АСП-ПЦР) на коммерческих наборах реагентов

для выявления вариантов системы RH (RH-TYPE (C, Cw, c, D, Del, E, e), D-Partial, D-Weak), BAG (Германия). Затем всем членам семьи выполнили экзон-специфическую ПЦР 10 экзонов гена *RHCE* согласно рекомендациям [11, 12]. Последующее секвенирование было выполнено для 1, 2 и 7 экзонов гена *RHCE* с прямым и обратным праймером в отдельных пробирках. Праймеры и Мастер-микс для ПЦР экзонов и секвенирования были изготовлены компанией ЗАО «Евроген» (Россия). Реакцию секвенирования проводили с использованием смеси терминирующих нуклеотидов BigDye Terminator v3.1 Thermo Fisher Scientific (США). Капиллярный электрофорез был выполнен на секвенаторе «ABI 3730xl» с полимером POP-7. Анализ сиквентов выполняли в программе SeqA6. Сопоставление полученных сиквентов с референсной последовательностью гена *RHCE* было проведено в геномном браузере Ensembl.

Выделение РНК и исследование кДНК. мРНК для анализа транскриптов удалось выделить только у сибсов. Биоматериал родителей для получения мРНК был недоступен. мРНК экстрагировали из осадка лейкоцитов, затем синтезировали тотальную кДНК с использованием набора «Magnus Kit» (ЗАО «Евроген» (Россия). Для выявления полиморфизма с.48С в 1 экзоне гена *RHCE* сибсам была выполнена АСП-ПЦР с кДНК согласно опубликованным данным [13]. Для секвенирования кДНК сибсов амплифицировали с помощью ПЦР с использованием различных комбинаций праймеров *RHCE* и *RHD* [11]. Праймеры и Мастер-микс для ПЦР были изготовлены компанией ЗАО «Евроген» (Россия). Продукты ПЦР разделяли в 1 % агарозном геле, полосы ДНК вырезали и очищали с использованием набора для гель-экстракции Lumiprobe (Россия). Очищенные ПЦР-фрагменты секвенировали в обоих направлениях на секвенаторе ABI 3730xl. Последовательности анализировали путем сопоставления с эталонными последовательно-

стями транскриптов *RHCE* и *RHD* (NM_020485.8; NM_016124.6) с использованием геномного браузера Ensembl.

Фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза. Для определения количества копий экзонов генов *RHCE* и *RHD* у членов семьи Н. была выполнена ПЦР экзонов 1 и 7 этих генов с праймерами, меченными флуоресцентным красителем FAM по описанной ранее методике [14, 15]. Для анализа 1 экзона был выбран праймер, специфичный для полиморфизма с.48С и аллеля *RHCE**C в соответствии с генотипом членов семьи Н. Для валидации результатов были использованы контрольные образцы, ранее протипированные методом АСП-ПЦР. Продукты ПЦР были проанализированы методом капиллярного электрофореза на секвенаторе ABI 3730xl. Их относительная флуоресценция (RFU — Relative fluorescence units) была вычислена с помощью программного обеспечения GeneMapper. Количество копий 1 и 7 экзонов генов *RHCE* и *RHD* было оценено по соотношению пиковых значений RFU продуктов ПЦР экзонов 1 и 7.

Результаты

Результаты серологического типирования

При серологическом исследовании антигенного состава образцов крови братьев Н. получены следующие результаты (рис. 1):

- Э.Н. — группа крови О фенотип –D–, не выявлены антигены C/c, E/e;
- А.Н. — группа крови О фенотип –D–, не выявлены антигены C/c, E/e.

При исследовании в ID-карте NaCl агглютинации не наблюдали. Результаты исследования при комнатной температуре в карте Coombs Anti-IgG и в солевой среде показали различную выраженность агглютинации эритроцитов, которая соответствовала результатам предварительного исследования (рис. 2). Сила реакции образцов 101725, 101727 и 111253 с анти-D IgG соответствовала (++++), как и с анти-D IgM. Оценить силу реакции более (++++), данным методом не представляется возможным, поэтому утверждать о более выраженной экспрессии антигена D у сибсов нельзя. В настоящее время нет доступных методов определения количества эпитопов антигенов эритроцитов для сравнительной оценки их экспрессии у разных индивидуумов.

Для выявления наследственного фактора необычного случая отсутствия антигенов системы резус у сибсов были проведены исследования образцов крови матери и отца. Были получены следующие результаты (рис. 3):

- у матери Ну.Н. — группа крови О фенотип ccD^{ee};
- у отца На.Н. — группа крови О фенотип CC^Dee.

Как видно из результатов исследования, антигены C, c и e системы резус присутствуют у обоих родителей.

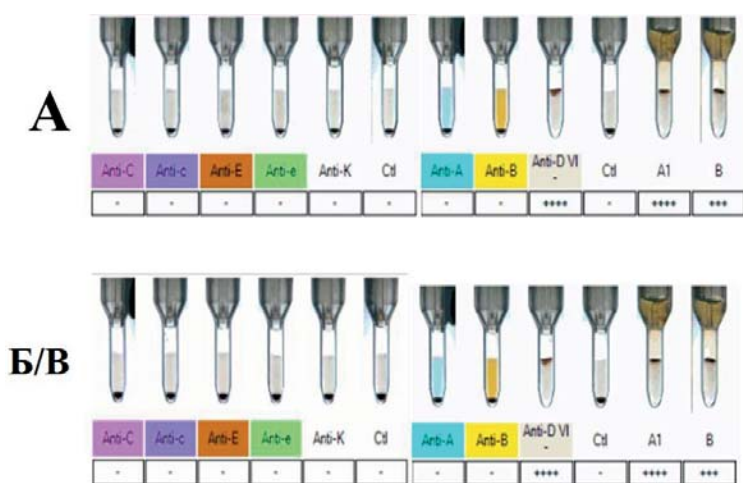


Рисунок 1. Результаты серологического исследования братьев Н. А — Э.Н., сибс, Б — А.Н., сибс

Figure 1. The results of serological testing. A — E.N., sibling, B — A.N., sibling

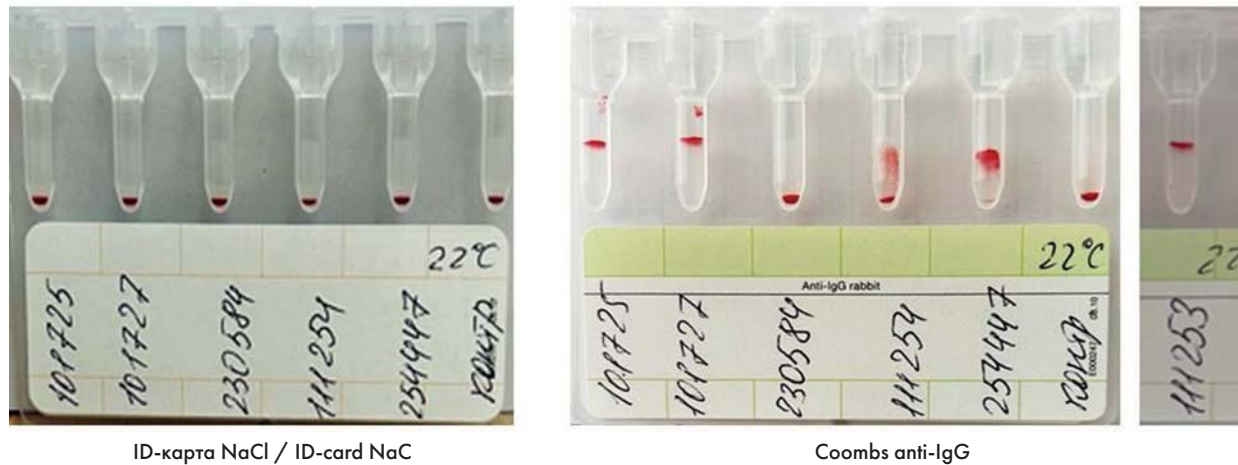


Рисунок 2. Результаты серологического исследования братьев Н. и образцов сравнения в солевой фазе. 101725 — Э.Н., сибс, 101727 — А.Н., сибс. Образцы сравнения: 230584 (сила реакции с анти-D IgM (-)/анти-D IgG (+)), 111254 (анти-D IgM (++)/анти-D IgG (++)), 254447 (анти-D IgM (+++)), 111253 (анти-D IgM (++++)). контр. — контрольный образец IH-QC1

Figure 2. The results of serological testing in saline. 101725 — E.N., sibling (-D-), 101727 — A.N., sibling (-D-). Samples for comparison: 230584 (reaction strength with anti-D IgM (-)/anti-D IgG (+)), 111254 (anti-D IgM (++)/anti-D IgG (++)), 254447 (anti-D IgM (+++)), 111253 (anti-D IgM (++++)). контр. — control sample IH-QC1

Результаты генотипирования

При генотипировании методом аллель-специфичной ПЦР у всех членов семьи были обнаружены неизменные нуклеотидные последовательности 10 экзона гена *RHD*, что соответствует D-положительному статусу. При этом сибсы и отец гомозиготны по гену D (*DD*), а у матери определяется только одна копия гена (*Dd*). У сибсов коммерческими наборами на АСП-ПЦР не выявлены нуклеотидные полиморфизмы, детерминирующие антигены C/c и E/e. У родителей тем же методом установлены фенотипы CСее (отец) и ссее (мать).

У сибсов ПЦР гена *RHCE* с экзон-специфическими праймерами определила наличие 4 экзонов из 10, а именно экзоны 1, 2, 9 и 10. Остальные экзоны не амплифицировались. У родителей детектированы все 10 экзонов гена *RHCE* в неизменном виде (рис. 4, табл. 1). Секвенирование экзонов 1, 2 гена *RHCE* у сибсов выявило полиморфизмы, специфичные для аллеля *RHCE*С* (с.48G>C, с.150C>T, с.178C>A, 201A>G, 203A>G, 307C>T), что противоречит данным серологического типирования и АСП-ПЦР на коммерческих наборах. АСП-ПЦР с кДНК подтвердила обнаруженный в ходе секвенирования полиморфизм с.48C в 1 экзоне, что также свидетельствует в пользу аллеля *RHCE*С* у братьев.

Аналогичное противоречие выявлено при секвенировании геномной ДНК матери: гетерозиготный статус в позиции с.48G/C свидетельствует скорее в пользу фенотипа CСее, а не ссее, как было определено ранее (рис. 5). Секвенирование экзона 7 гена у родителей подтвердило его принадлежность к гену *RHCE*.

Для того чтобы выяснить, связана ли потеря кодирующих областей гена *RHCE* с конверсией генов, исследовали кДНК сибсов. Анализ 5'-конца транскрипта в пределах 6–10 экзонов *RHCE* показал наличие гибрида генов *RHCE* и *RHD*. 9, 10 экзоны *RHCE* присут-

ствовали в неизменном виде, а последовательности 6, 7 экзонов были *RHD*-специфичными. Принадлежность 8 экзона по результатам секвенирования трудно установить, т.к. большая часть аллелей генов *RHCE* и *RHD* идентичны в этой области. В связи с этим необходимо опираться на результаты АСП-ПЦР, которая не выявила 8 экзон гена *RHCE* у братьев. По всей видимости, 8 экзон происходит из гена *RHD*. При исследовании 3'-конца транскрипта не удалось определить нуклеотидную последовательность в пределах 1–5 экзонов из-за множественных перекрывающихся сиквенсов. Вероятно, ввиду высокой степени гомологии и рекомбинации генов *RHCE* и *RHD* образовалось несколько сайтов отжига праймеров для секвенирования.

Таким образом, результаты исследования геномной ДНК и кДНК показали, что у братьев нет ни одной копии полноценного гена *RHCE*, но предполагается гибридный вариант, где с 3 по 8 экзоны гена *RHCE* заменены аналогичным фрагментом гена *RHD*. Для подтверждения

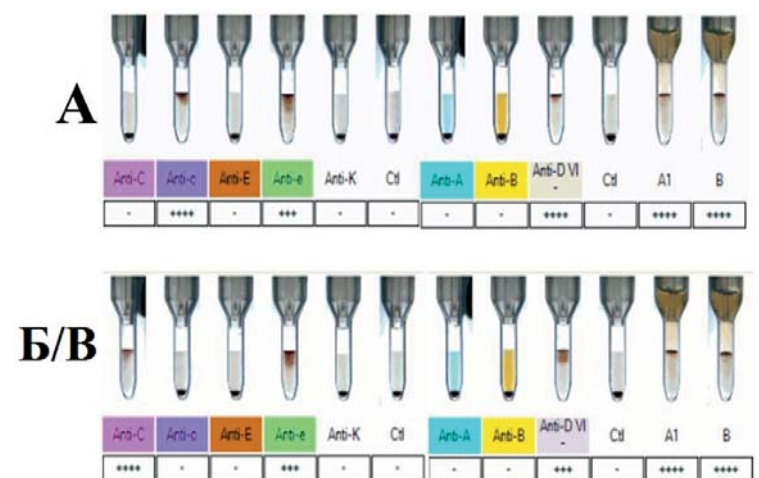


Рисунок 3. Результаты серологического исследования родителей Н. **А** — Ну.Н., мать, **Б** — На.Н., отец

Figure 3. The results of serological testing. A — Nu.N., mother, B — Na.N., father

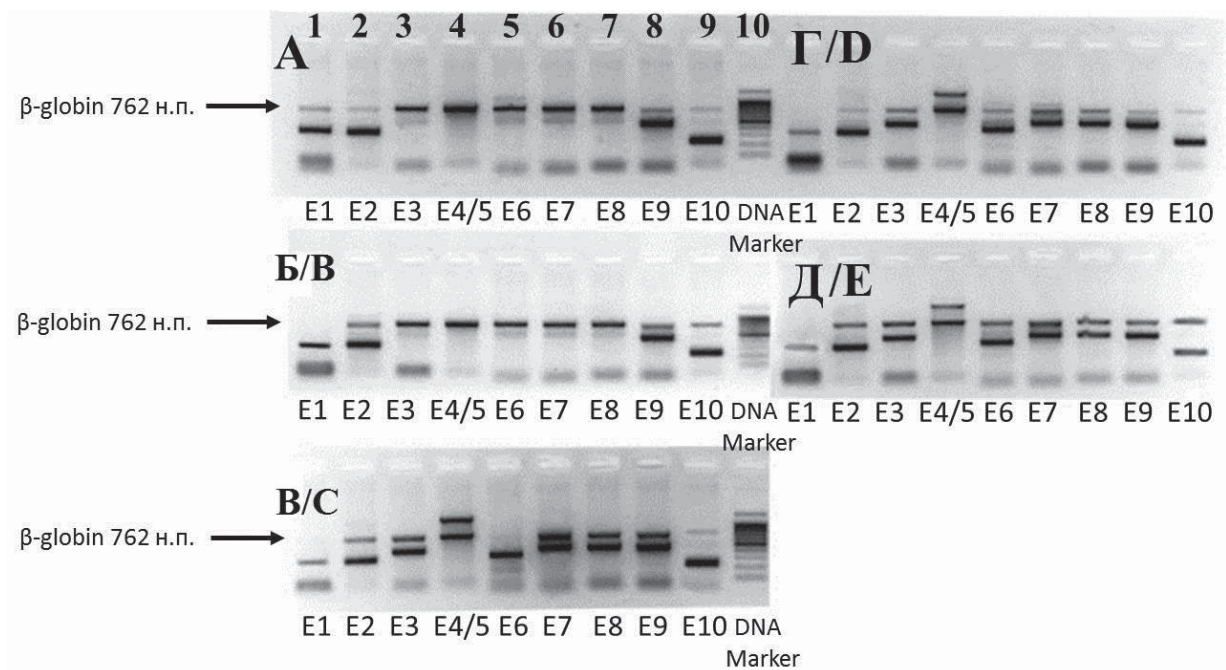


Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов АСП-ПЦР с экзон-специфическими праймерами гена *RHCE*. Продукты ПЦР находятся в дорожках геля 1–9 в соответствии с номером каждого экзона E1–E10. А — Э.Н., сибс (–D–), Б — А.Н., сибс (–D–), В — 6596T, контрольный образец (CCDDee), Г — Ну.Н., мать (ccDdee), Д — На.Н., отец (CCDDee). DNA Marker-маркер длин ДНК от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п.н.) в дорожке 10. Для контроля амплификации использованы праймеры гена β -глобина с образованием специфической полосы в 762 п.н.

Figure 4. Electropherogram of exon-scanning assay for *RHCE* gene. PCR products are in lanes 1–9 according to the number of each exon E1–E10. A — E.N., sibling (–D–), B — A.N., sibling (–D–), C — 6596T, control sample (CCDDee), D — Nu.N., mother (ccDdee), E — Na.N., father (CCDDee). DNA Marker is in lane 10 (lengths from 100 to 1000 bp). Primers for β -globin gene were used as a control (762 bp)

Таблица 1. Результаты АСП-ПЦР с экзон-специфическими праймерами гена *RHCE*. Знак «+» означает наличие специфического продукта АСП-ПЦП, знак «-» означает отсутствие специфической амплификации

Table 1. Exon-scanning assay results. «+» designates positive ASP-PCR result, «-» — negative ASP-PCR result

№ дорожки в геле Lane number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№ экзона гена <i>RHCE</i> Exon <i>RHCE</i> assignment	E1	E2	E3	E4/5	E6	E7	E8	E9	E10	DNA Marker
Размер, п.н. / Size, bp	341	329	455	1460	368	473	471	462	226	100–1000
6596T контрольный образец (CCDDee) 6596T control sample (CCDDee)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Э.Н., сибс (–D–) E.N., sibling (–D–)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
А.Н., сибс (–D–) A.N., sibling (–D–)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
Ну.Н., мать (ccDdee) Nu.N., mother (ccDdee)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
На.Н., отец (CCDDee) Na.N., father (CCDDee)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

теории, а также для определения химерного варианта в генотипе родителей, был проведен анализ числа копий экзонов 1 и 7 генов *RHD/RHCE*. Электрофореграммы продуктов ПЦР 7 экзона обоих генов представлены на рисунке 6. Соотношение пиковых значений RFU продуктов ПЦР экзона 7 приведено в таблице 2.

Результаты исследования контрольных образцов подтвердили, что соотношение пиковых значений RFU зависит от количества копий генов резус. При отсутствии гена, как в случае с контрольным образцом В — 5717T (CCddee), продукт ПЦР не нарабатывал-

ся и значение RFU было равно нулю. Анализ числа копий 1 экзона подтвердил, что сибсы и отец гомозиготны по С, а мать гетерозиготна. Количество копий 1 экзона гена *RHD* в семье Н. соответствовало ранее определенному генотипу.

Дальнейшее исследование 7 экзона генов *RHCE* и *RHD* выявило нетипичную картину. Соотношение RFU у родителей указывает на кратное увеличение числа копий центрального сегмента гена *RHD* по сравнению с контрольными образцами. У сибсов 7 экзон гена *RHCE* ожидаемо не амплифицировался при явном

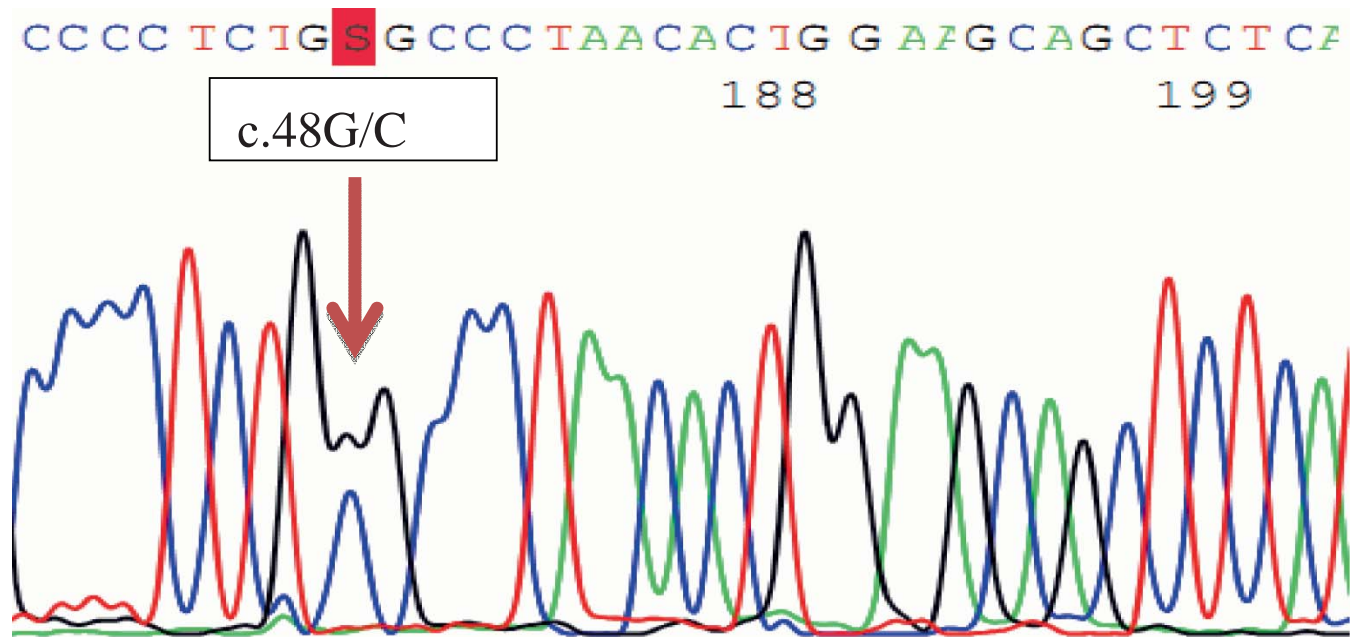


Рисунок 5. Фрагмент сиквенса экзона 1 гена *RHCE* образца Ну.Н. (мать). Стрелкой обозначен полиморфизм с.48G/C
Figure 5. Sequence fragment of exon 1 *RHCE* gene, sample Nu.N. (mother). The arrow shows с.48G/C polymorphism

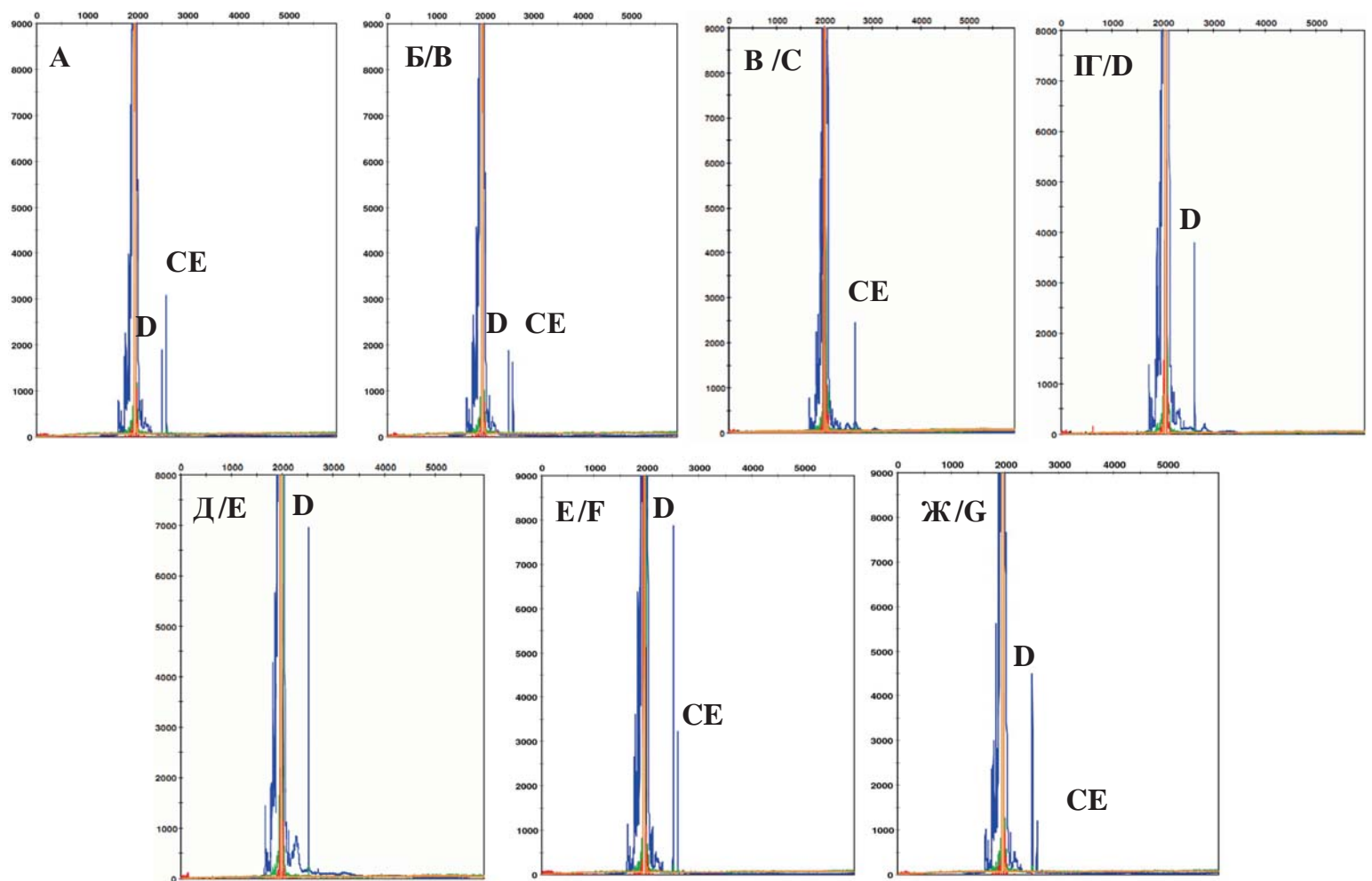


Рисунок 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР экзона 7 генов *RHD* (размер 99 п.н.) и *RHCE* (размер 113 п.н.). А – 5656Т, контрольный образец (ccDdEe), Б – 5796Т, контрольный образец (CCDDee), В – 5717Т, контрольный образец (CCddee), Г – Э.Н., sibс (-D-), Д – А.Н., sibс (-D-), Е – Ну.Н., мать (ccDdee), Ж – На.Н., отец (CCDDee)
Figure 6. Electropherogram of PCR products of exon 7 of the *RHD* (size 99 bp) and *RHCE* (size 113 bp) genes. А – 5656Т, control sample (ccDdEe), Б – 5796Т, control sample (CCDDee), В – 5717Т, control sample (CCddee), Д – E.N., sibling (-D-), Е – A.N., sibling (-D-), F – Nu.N., mother (ccDdee), G –Na.N., father (CCDDee)

Таблица 2. Результаты анализа числа копий экзона 7 генов RHD и RHCE
Table 2. Copy number assay results, Exon 7 of RHD and RHCE

Образец Sample	RFU экзона 7 RHD RFU of exon 7 RHD	RFU экзона 7 RHCE RFU of exon 7 RHCE	Соотношение Ratio
5656T (ccDdEe) контрольный образец 5656T (ccDdEe) control sample	1904	3080	0,61
5796T (CCDDee) контрольный образец 5796T (CCDDee) control sample	1645	1863	1,13
5717T (CCdde) контрольный образец 5717T (CCdde) control sample	0	2642	Только ген RHCE RHCE gene only
Э.Н., сибс (-D-) E.N., sibling (-D-)	3824	0	Только ген RHD RHD gene only
А.Н., сибс (-D-) A.N., sibling	6982	0	Только ген RHD RHD gene only
Н.Н., мать (ccDdee) Nu.N., mother	7890	3251	2,42
На.Н., отец (CCDDee) Na.N., father	4489	1210	3,7

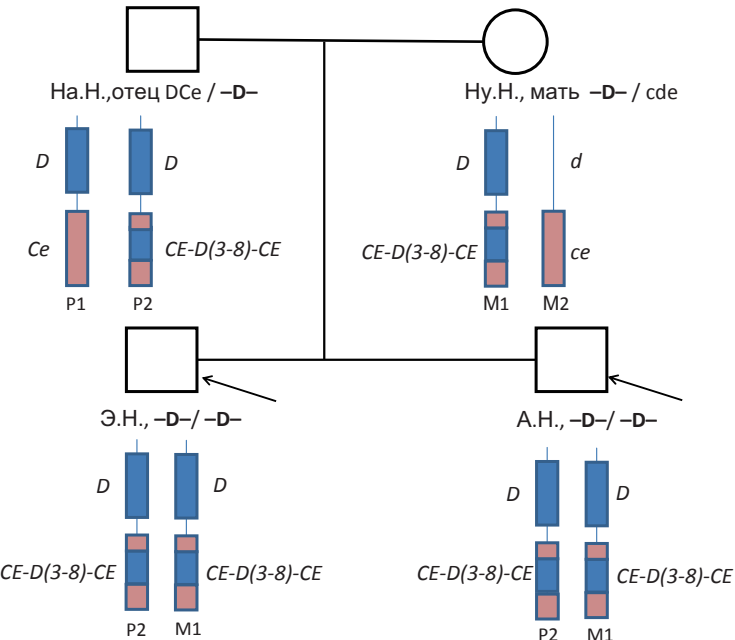


Рисунок 7. Генеалогическое древо семьи Н. с обозначением генотипов и фенотипов системы RH
Figure 7. Family tree of N. with assignment of RH genotypes and phenotypes

повышении дозы гена *RHD*, о чем говорит высокое значение RFU по сравнению с контрольными образцами. На основании полученных результатов наиболее вероятной причиной фенотипа $-D-$ у братьев представляется гибридный аллель *RHCE*^{*C}, центральный сегмент которого составляют экзоны 3–8 гена *RHD*. Значительное увеличение дозы 7 экзона гена *RHD* у сибсов свидетельствует в пользу того, что 2 копии сегмента *RHD*(3–8) они получили от нормального гена *RHD* и 2 копии от мутантного аллеля в гомозиготном статусе. Иными словами, гибриды *RHCE*-*D*(3–8)-*CE* и нормальный ген *RHD* находятся в цис-положении на одной гомологичной хромосоме и, по-видимому, унаследованы от родителей единым блоком. Генеалогическое древо семьи Н. представлено на рисунке 7.

Обсуждение

Система RH является самой полиморфной и иммуногенной среди остальных антигенов эритроцитов. Она представлена пятью основными антигенами: D, C/c и E/e, расположенными на полипептидах RhD и RhCE. Гены *RHD* и *RHCE*, кодирующие полипептиды, состоят каждый из 10 экзонов и имеют противоположную ориентацию, т.е. обращены друг к другу своими 3'-концами и разделены примерно 30 000 п.н. [16]. Характерной чертой этих генов является значительное сходство нуклеотидной последовательности, свидетельствующее, по-видимому, о происхождении из общего предкового гена [16, 17]. Это объясняет гомологию полипептидов RhD и RhCE, которые различаются между собой по 34–37 аминокислотам в зависимости от аллеля *RHCE*. Оба полипептида состоят из 417 аминокислот и образуют 6 внеклеточных петель. Большинство различий между протеинами системы RH локализовано в трансмембранных или внутриклеточных сегментах. Однако основные замены, определяющие специфичность антигенов D и CcEe, сосредоточены в 3, 4 и 6 экстраклеточных петлях, кодируемыми 4, 5 и 7 экзонами соответственно, а также в 2 петле полипептида RhCE. Пролин в 103 положении полипептида RhCE определяет экспрессию антигена c, а серин — экспрессию антигена C на мембране эритроцита. Антиген E ассоциирован с полиморфизмом p.226Pro в 4 петле протеина RhCE, а антиген e связан с присутствием аланина в той же позиции [16]. Есть индивидуумы, эритроциты которых не реагируют с антисыворотками, определяющими один или несколько антигенов Rh. Эти фенотипы показывают как отсутствие реактивности ко всем антигенам резус (обозначаемое как Rh_{null} или «нулевой резус-фенотип»), так и к отдельным антигенам (например, $-D-$, Dc-, DC_w-) [4].

В настоящей работе приведены результаты исследования семьи Н., состоящей из двух сибсов с дефицитным фенотипом –D– и их родителей с серологически определяемыми антигенами резус. Данный вариант был ранее выявлен в разных популяциях, включая белых американцев и европейцев, коренное население Америки, японцев, китайцев, индийцев, однако в России он впервые исследуется на молекулярно-генетическом уровне [11]. Причины, по которым эритроциты могут не экспрессировать антигены С, с, Е и е на своей плазматической мембране, довольно разнообразны. Авторами из Исландии и Италии описана полная делеция гена *RHCE*, повлекшая за собой утрату соответствующих антигенов [18, 19]. В другом исследовании семьи, наоборот, не выявили генетических аномалий *RHD* и *RHCE*, что свидетельствует в пользу нарушения механизмов транскрипции или трансляции полипептида RhCE [6]. У лиц с фенотипом –D– неоднократно выявляли однонуклеотидные вариации и мутации сайтов сплайсинга, препятствующие нормальному синтезу и экспрессии антигенов [4, 10]. Также известно, что генам RH присуща геноконверсия, чему способствует высокая степень гомологии, близкое взаиморасположение и ориентация «tail-to-tail» [16]. Рearанжировка во время кроссинговера приводит к образованию новых гибридных структур, где часть экзонов гена *RHCE* («донор») замещает аналогичный сегмент гена *RHD* («акцептор») [6]. Исследования показали, что данный механизм лежит в основе многих вариантов антигена D. В этом случае часть эпитопов D оказывается утраченной за счет образования рекомбинантного полипептида, несущего как RhD-, так и RhCE-специфичные последовательности [3, 16]. Было установлено, что перестройка возможна и в направлении гена *RHCE* [20, 21]. Размер гибридного блока может охватывать несколько экзонов в центральной части гена *RHCE* (как, например, в аллелях *RHCE-D(3-9)-CE* и *RHCE-D(2-6)-CE*) либо практически полностью замещать его, как в варианте *RHCE-D(1-9)-CE* [10, 11, 22]. Рекомбинантные аллели, состоящие из кодирующих последовательностей от разных генов резус, не в состоянии транслировать полноценный полипептид. На мембране эритроцитов у таких индивидуумов экспонируются химерные антигены, которые содержат D-специфичные эпитопы и лишены большинства участков полипептида RhCE, что объясняет отрицательную реакцию с МКА анти-С/с и анти-Е/е [4, 9, 10, 19, 22]. Кроме того, если ген *RHD*, лежащий на той же гомологичной хромосоме (то есть в положении «цис»), что и гибридный аллель, остается интактным, то наблюдается кратное увеличение числа копий гена *RHD* за счет нормального и рекомбинантного аллелей. Возрастание «дозы» гена сопровождается заметным повышением количества эпитопов антигена D: примерно 110 000–200 000 на эритроцит по сравнению

с 10 000–30 000 у людей с нормальным фенотипом, оцененное по связыванию поликлонального анти-D с радиоактивной меткой [23].

Несмотря на разнообразие генетических сценариев, образование гибрида *RHCE-D(3-8)-CE* представляется нам наиболее вероятной причиной фенотипа –D– у братьев Н. Ни одной копии полноценного гена *RHCE* не было выявлено. Последовательность первых двух экзонов соответствовала аллелю *RHCE*С*. Ген *RHD* представлен референсным аллелем *RHD*01*, что соответствует D-положительному статусу.

Для установления механизма наследования фенотипа –D– сибсам и родителям был проведен анализ числа копий экзонов 1 и 7 генов *RHD* и *RHCE*. На основании соотношения копий генов был сделан вывод, что гибрид *RHCE-D(3-8)-CE* располагается на одной гомологичной хромосоме с референсным аллелем *RHD*01*, т.е. в «цис»-положении. У родителей мутантный аллель маскируется второй неизменной копией гена *RHCE*, поэтому серологическое типирование в их случае не вызвало затруднений. В свою очередь, сибсы унаследовали по гаплотипу *RHD*01/RHCE-D(3-8)-CE* от каждого родителя. В их генотипе — четыре копии сегмента, охватывающего экзоны 3–8 гена *RHD*, и ни одного интактного гена *RHCE*. Разумно предположить, что эритроциты сибсов экспонируют нормальный антиген D, а также химерный протеин RhCE-RhD-RhCE, кодируемый рекомбинантным аллелем (рис. 8).

Поскольку основная часть нуклеотидной последовательности аллеля представлена экзонами гена *RHD*, химерный белок должен экспонировать преимущест-

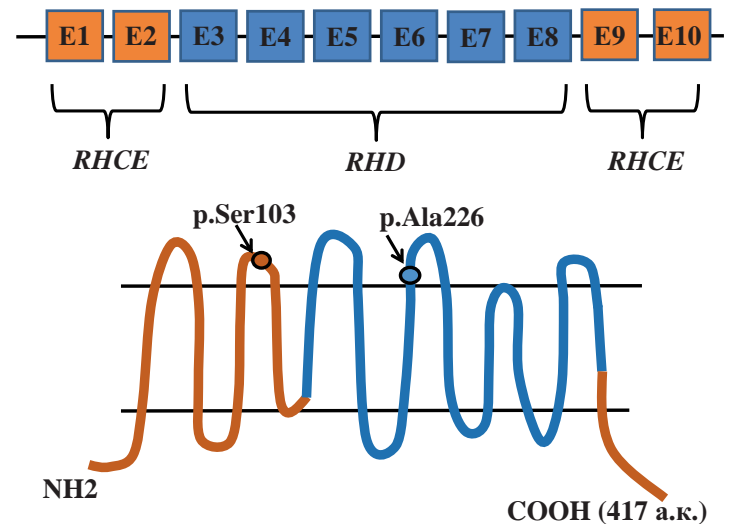


Рисунок 8. Предполагаемая схема гибридного аллеля *RHCE-D(3-8)-CE* и соответствующего ему полипептида RhCE-RhD-RhCE в структуре мембраны эритроцита. Оранжевым цветом обозначены CE-специфичные последовательности, голубым цветом — D-специфичные последовательности. E1–E10 — обозначение экзонов. Стрелками обозначены аминокислотные позиции, специфичные для антигена С (Ser 103) и е (Ala 226)

Figure 8. Anticipated model of hybrid allele *RHCE-D(3-8)-CE* and the corresponding polypeptide RhCE-RhD-RhCE at erythrocyte membrane. Orange color indicates CE-specific sequences, blue one indicates D-specific sequences. E1–E10 — designation of exons. Arrows indicate specific amino acid positions for antigen C (Ser 103) and e (Ala 226)

венно D-специфичные эпитопы. Возрастание «дозы» гена *RHD* за счет присутствия нормального и рекомбинантного аллелей не привело к повышению экспрессии по результатам доступных исследований. В свою очередь, отсутствие экспрессии антигенов C/c и E/e у сибсов напрямую связано со строением химерного продукта. Как было упомянуто выше, пролин в 226 позиции полипептида RhCE детерминирует антиген E, а аланин — антиген e. Данный полиморфизм контролируется экзоном 5 гена *RHCE*. В гибридном аллеле *RHCE-D(3-8)-CE* экзон 5 замещен аналогичным сегментом гена *RHD*, также кодирующим аланин в 226 позиции. Тем не менее даже при высокой степени структурного сходства гибрид не в состоянии воспроизвести полноценный антиген e. С другой стороны, не совсем ясно, почему МКА не выявили антиген C. Потенциально химерный пептид должен реагировать с МКА к антигену C, так как экзоны 1–2 в структуре *RHCE-D(3-8)-CE* идентичны аллелю *RHCE**C. Причина отрицательной реакции с МКА анти-C подробно описана в публикации I. Mougo и соавт. [24]. Согласно представленной теории конформация антигенов C/c и E/e является оптимальной, если они находятся в составе неизменной цепи полипептида RhCE. В гибридах RhCE-RhD-RhCE микроокружение нарушает презентацию эпитопов C/c и E/e на мембране эритроцита, снижая экспрессию этих антигенов и способность взаимодействовать со специфичными МКА [24]. Кроме того, нельзя исключить дополнительные нуклеотидные замены в гибридном аллеле, которые не удалось выявить доступными методами. Однонуклеотидные вариации и мутации сайтов сплайсинга могли стать причиной полного отсутствия либо экстремального снижения экспрессии химерного полипептида [4, 10].

Наиболее правдоподобным сценарием появления гибридного варианта является межгенная рекомбинация. Как было указано выше, геноконверсия по типу нерцепиального переноса генетической информации — нередкое явление для генов системы RH. При обмене участками гомологичных хромосом во время мейоза экзоны 3–8 *RHCE* были замещены аналогичным сегментом гена *RHD*, который сам при этом остался неизменным. В мировой практике уже были подобные случаи, и в настоящий момент аллель внесен в номенклатуру Международного общества переливания крови с наименованием *RHCE**02N.07 [10, 11, 25]. Предположительно у данного варианта точки рекомбинации находятся в промежутке между экзонами 2–3 и 8–9 гена *RHCE*. По данным T.J. Kemp и соавт., несмотря на гетерогенность на 3'-конце, часто 5'-границы рекомбинации находятся в одном и том же интервале длиной 4,2 тысяч п.н. в пределах экзона 2 / интрона 2 генов системы RH [22]. Таким образом, локализация места «разрыва» в области экзона 2 / интрона 2 является довольно закономерной и часто встречается среди

гибридных аллелей резус [4, 9, 11, 22]. Причиной тому может быть высокая плотность рассеянных повторяющихся элементов в этом регионе. Например, на протяжении 5,5 тыс. п.н. имеется восемь повторов *Alu*, что больше ожидаемой средней плотности в 1:7 тыс. п.н. [22] Повышенное число элементов *Alu S* в области интрона 3 у обоих генов было также показано другой группой исследователей [26]. Гомология последовательностей между повторами наряду с высокой степенью идентичности генов *RHD* и *RHCE* может способствовать образованию «горячих точек» рекомбинации и обмену участками ДНК [22, 27].

Подобный механизм поддержания генетического разнообразия наряду с точечными мутациями и делециями является частью естественного процесса эволюции системы RH [27, 28]. Тем не менее на частоту гаплотипа в популяции может влиять этническая принадлежность и социокультурные особенности. Известно о высокой частоте близкородственных браков в семьях, где выявлены обладатели резус-дефицитных фенотипов [4, 11, 19]. Известно, что отец и мать сибсов не приходятся друг другу братом и сестрой, однако родились в соседних населенных пунктах. Не исключено, что выявленный аллель циркулирует в отдельно взятой популяции и его выявление у детей и родителей является результатом изолированного проживания предков семьи Н. на одной территории. Ввиду отсутствия рутинной практики молекулярного типирования в отечественных центрах крови сложно оценить распространенность гибридных аллелей *RHCE* на территории России. Тем не менее можно ожидать, что их число сопоставимо с парциальными вариантами антигена D и выше в определенных этнических группах [20].

Случаи резус-дефицитных фенотипов уникальны с точки зрения клинической и трансфузионной медицины. Антигены Rh принимают участие в транспорте аммиака, углекислого газа и в поддержании структуры плазматической мембраны [17]. Поэтому эритроциты индивидов без антигенов C/c, E/e отличаются осмотической хрупкостью, измененной организацией фосфолипидов мембраны, повышенной проницаемостью для катионов, что нередко приводит к умеренной сфероцитарной анемии [19]. Однако большинство носителей клинически здоровы, как и сибсы Н., которые к тому же являются кадровыми донорами. Повидимому, если отсутствие антигенов Rh не связано с грубой делецией гена, а с геноконверсией, то химерные полипептиды RhCE-RhD-RhCE способны интегрироваться в фосфолипидный бислой мембраны и выполнять свою функцию [19].

Трансфузиологическая тактика имеет ряд особенностей у таких индивидуумов. Отсутствие антигенов системы RH создает ряд трудностей при переливании ЭСК из-за высокого риска аллоиммунизации и низкой

вероятности найти совместимого донора [1, 29]. Лицам с резус-дефицитными фенотипами целесообразно рекомендовать персонифицированную заготовку ЭСК [29]. Кроме того, необходимо заблаговременно обследовать членов семьи, так как зачастую это помогает выявить носителей даже среди представителей второй и третьей линии родства [10, 11]. Заготовка ЭСК от таких лиц также важна для наполнения регистров редких доноров, поскольку их эритроциты пригодны для переливания реципиентам, зависимым от переливания крови [10]. Однако необходимо помнить, что дефицитные фенотипы, как правило, связаны не с полной утратой гена, а со сложными генетическими перестройками. Аберрантные аллели могут кодировать полностью или частично функциональный продукт с новыми антигенами, не определяемыми стандартными методами серологического типирования [19]. Примером тому служат антигены Rh32, Go^a, BARG, FPTT, известные

своей ассоциацией с некоторыми парциальными вариантами системы RH [1, 25]. Было также показано, что некоторые лица с фенотипом –D– на самом деле экспрессируют редко встречающийся антиген Эванс RH37, обозначаемый как •D• [30]. Нетипичное сочетание аминокислотных последовательностей и, как следствие, формирование необычных эпитопов в продуктах аберрантных аллелей может привести к выработке аллоантител у реципиентов ЭСК, заготовленных от доноров с фенотипами делеций.

Таким образом, идентификация редких резус-дефицитных фенотипов и их характеристика молекулярными методами является крайне важной задачей ввиду особого иммунологического статуса их носителей. Всестороннее исследование таких случаев позволит улучшить трансфузиологическую практику и обеспечить более персонализированный подход к переливанию ЭСК.

Литература

1. Донсков С.И., Мороков В.А. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. М.: Бином, 2011. 1016 с.
2. Tippett P. A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet.* 1986; 50(3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1986.tb01045.x.
3. Flegel W.A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus.* 2007; 5(2): 50–7. DOI: 10.2450/2007.0011-07.
4. Ochoa-Garay G., Moulds J.M., Cote J., et al. New RHCE variant alleles encoding the D-- phenotype. *Transfusion.* 2013; 53(11 Suppl 2): 3018–23. DOI: 10.1111/trf.12404.
5. Avent N.D., Reid M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000; 95(2): 375–87.
6. Chérif-Zahar B., Raynal V., D'Ambrosio A.M., et al. Molecular analysis of the structure and expression of the RH locus in individuals with D--, Dc-, and DCw-gene complexes. *Blood.* 1994; 84(12): 4354–60.
7. Rasmuson M., Heiken A. Frequency of occurrence of the human Rh Complexes D(C)(e), d(c)(e), D-- and ---. *Nature.* 1966; 212(5068): 1377–9. DOI: 10.1038/2121377a0.
8. Olafsdóttir S., Jensson O., Thordarson G., Sigurdardóttir S. An unusual Rhesus haplotype, --D--, in Iceland. *Forensic Sci Int.* 1983; 22(2–3): 183–7. DOI: 10.1016/0379-0738(83)90012-9.
9. Okuda H., Fujiwara H., Omi T., et al. A Japanese propositus with D-- phenotype characterized by the deletion of both the RHCE gene and D1S80 locus situated in chromosome 1p and the existence of a new CE-D-CE hybrid gene. *J Hum Genet.* 2000; 45(3): 142–53. DOI: 10.1007/s100380050201.
10. Kulkarni S., Mishra G., Maru H., et al. Molecular characterization of rare D-/D-- variants in individuals of Indian origin. *Blood Transfus.* 2022; 20(1): 59–65. DOI: 10.2450/2020.0183-20.
11. Flatt J.F., Musa R.H., Ayob Y., et al. Study of the D-- phenotype reveals erythrocyte membrane alterations in the absence of RHCE. *Br J Haematol.* 2011; 158(2): 262–73. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09149.x.
12. Kappler-Gratias S., Auxerre C., Dubeaux I., et al. Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfus.* 2014; 12 (Suppl 1): s264–72. DOI: 10.2450/2013.0270-12.
13. Tanaka M., Yamashita N., Takahashi J., et al. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the RHCE gene. *Leg Med (Tokyo).* 2001; 3(4): 205–12. DOI: 10.1016/s1344-6223(01)00035-9.

References

1. Donskov S.I., Morokov V.A. Human Blood groups: Guide on immunoserology. Moscow: Binom, 2011. 1016 p. (In Russian)
2. Tippett P. A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet.* 1986; 50(3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1986.tb01045.x.
3. Flegel W.A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus.* 2007; 5(2): 50–7. DOI: 10.2450/2007.0011-07.
4. Ochoa-Garay G., Moulds J.M., Cote J., et al. New RHCE variant alleles encoding the D-- phenotype. *Transfusion.* 2013; 53(11 Suppl 2): 3018–23. DOI: 10.1111/trf.12404.
5. Avent N.D., Reid M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000; 95(2): 375–87.
6. Chérif-Zahar B., Raynal V., D'Ambrosio A.M., et al. Molecular analysis of the structure and expression of the RH locus in individuals with D--, Dc-, and DCw-gene complexes. *Blood.* 1994; 84(12): 4354–60.
7. Rasmuson M., Heiken A. Frequency of occurrence of the human Rh Complexes D(C)(e), d(c)(e), D-- and ---. *Nature.* 1966; 212(5068): 1377–9. DOI: 10.1038/2121377a0.
8. Olafsdóttir S., Jensson O., Thordarson G., Sigurdardóttir S. An unusual Rhesus haplotype, --D--, in Iceland. *Forensic Sci Int.* 1983; 22(2–3): 183–7. DOI: 10.1016/0379-0738(83)90012-9.
9. Okuda H., Fujiwara H., Omi T., et al. A Japanese propositus with D-- phenotype characterized by the deletion of both the RHCE gene and D1S80 locus situated in chromosome 1p and the existence of a new CE-D-CE hybrid gene. *J Hum Genet.* 2000; 45(3): 142–53. DOI: 10.1007/s100380050201.
10. Kulkarni S., Mishra G., Maru H., et al. Molecular characterization of rare D-/D-- variants in individuals of Indian origin. *Blood Transfus.* 2022; 20(1): 59–65. DOI: 10.2450/2020.0183-20.
11. Flatt J.F., Musa R.H., Ayob Y., et al. Study of the D-- phenotype reveals erythrocyte membrane alterations in the absence of RHCE. *Br J Haematol.* 2011; 158(2): 262–73. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09149.x.
12. Kappler-Gratias S., Auxerre C., Dubeaux I., et al. Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfus.* 2014; 12 (Suppl 1): s264–72. DOI: 10.2450/2013.0270-12.
13. Tanaka M., Yamashita N., Takahashi J., et al. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the RHCE gene. *Leg Med (Tokyo).* 2001; 3(4): 205–12. DOI: 10.1016/s1344-6223(01)00035-9.

14. Fichou Y., Le Maréchal C., Bryckaert L., et al. A convenient qualitative and quantitative method to investigate RHD-RHCE hybrid genes. *Transfusion*. 2013; 53(11 Suppl. 2): 2974–82. DOI: 10.1111/trf.12179.
15. Perl B., Pieber D., Panzitt T., et al. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG*. 2000; 107(12): 1498–502. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb11674.x.
16. Wagner F.F., Flegel W.A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004; 20(1): 23–36.
17. Perry G.H., Xue Y., Smith R.S., et al. Evolutionary genetics of the human Rh blood group system. *Hum Genet*. 2012; 131(7): 1205–16 DOI: 10.1007/s00439-012-1147-5.
18. Huang C.H., Reid M.E., Chen Y. Identification of a partial internal deletion in the RH locus causing the human erythrocyte D--phenotype. *Blood*. 1995; 86(2): 784–90.
19. Blunt T., Steers F., Daniels G., Carritt B. Lack of RH C/E expression in the Rhesus D--phenotype is the result of a gene deletion. *Ann Hum Genet*. 1994; 58(1): 19–24. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1994.tb00722.x.
20. Hundhausen T., Petershofen E.K., Doescher A., et al. Pitfalls in Rhesus genotyping due to RHCE-D-CE hybrid genes. *Vox Sang*. 2002; 83: 268–72.
21. Avent N.D., Reid M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000; 95(2): 375–87.
22. Kemp T.J., Poulter M., Carritt B. A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with the rare D-- phenotype. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(5): 1066–73. Erratum in: *Am J Hum Genet* 1997; 60(3): 749.
23. Rochna E., Hughes-Jones N.C. The use of purified 125-I-labelled anti-gamma globulin in the determination of the number of D antigen sites on red cells of different phenotypes. *Vox Sang*. 1965; 10(6): 675–86. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1965.tb05179.x.
24. Mouro .I., Colin Y., Chérif-Zahar B., et al. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet*. 1993; 5(1): 62–5. DOI: 10.1038/ng0993-62.
25. Silvy M., Chapel-Fernandes S., Beley S., et al. Molecular characterization of a new D- — haplotype in a Comorian man. *Vox Sang*. 2012; 103(4): 352–5. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2012.01620.x.
26. Matassi G., Chérif-Zahar B., Mouro I., Cartron J.P. Characterization of the recombination hot spot involved in the genomic rearrangement leading to the hybrid D-CE-D gene in the D(VI) phenotype. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(4): 808–17.
27. Okuda H., Suganuma H., Kamesaki T., et al. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 274(3): 670–83. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3206.
28. Kemp T.J., Poulter M., Carritt B. Microsatellite variation within the human RHCE gene. *Vox Sang*. 1999; 77(3): 159–63. DOI: 10.1159/000031096.
29. Samareh Salavati Pour M., Soleimany S., et al. A Case Report of a Rare Rh Phenotype: D. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2019; 35(2): 402–4. DOI: 10.1007/s12288-019-01089-7.
30. Cheng G.J., Chen Y., Reid M.E., Huang C.H. Evans antigen: a new hybrid structure occurring on background of D and D-- Rh complexes. *Vox Sang*. 2000; 78(1): 44–51. DOI: 10.1159/000031148.
14. Fichou Y., Le Maréchal C., Bryckaert L., et al. A convenient qualitative and quantitative method to investigate RHD-RHCE hybrid genes. *Transfusion*. 2013; 53(11 Suppl. 2): 2974–82. DOI: 10.1111/trf.12179.
15. Perl B., Pieber D., Panzitt T., et al. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG*. 2000; 107(12): 1498–502. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb11674.x.
16. Wagner F.F., Flegel W.A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004; 20(1): 23–36.
17. Perry G.H., Xue Y., Smith R.S., et al. Evolutionary genetics of the human Rh blood group system. *Hum Genet*. 2012; 131(7): 1205–16 DOI: 10.1007/s00439-012-1147-5.
18. Huang C.H., Reid M.E., Chen Y. Identification of a partial internal deletion in the RH locus causing the human erythrocyte D--phenotype. *Blood*. 1995; 86(2): 784–90.
19. Blunt T., Steers F., Daniels G., Carritt B. Lack of RH C/E expression in the Rhesus D--phenotype is the result of a gene deletion. *Ann Hum Genet*. 1994; 58(1): 19–24. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1994.tb00722.x.
20. Hundhausen T., Petershofen E.K., Doescher A., et al. Pitfalls in Rhesus genotyping due to RHCE-D-CE hybrid genes. *Vox Sang*. 2002; 83: 268–72.
21. Avent N.D., Reid M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000; 95(2): 375–87.
22. Kemp T.J., Poulter M., Carritt B. A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with the rare D-- phenotype. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(5): 1066–73. Erratum in: *Am J Hum Genet* 1997; 60(3): 749.
23. Rochna E., Hughes-Jones N.C. The use of purified 125-I-labelled anti-gamma globulin in the determination of the number of D antigen sites on red cells of different phenotypes. *Vox Sang*. 1965; 10(6): 675–86. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1965.tb05179.x.
24. Mouro .I., Colin Y., Chérif-Zahar B., et al. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet*. 1993; 5(1): 62–5. DOI: 10.1038/ng0993-62.
25. Silvy M., Chapel-Fernandes S., Beley S., et al. Molecular characterization of a new D- — haplotype in a Comorian man. *Vox Sang*. 2012; 103(4): 352–5. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2012.01620.x.
26. Matassi G., Chérif-Zahar B., Mouro I., Cartron J.P. Characterization of the recombination hot spot involved in the genomic rearrangement leading to the hybrid D-CE-D gene in the D(VI) phenotype. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(4): 808–17.
27. Okuda H., Suganuma H., Kamesaki T., et al. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 274(3): 670–83. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3206.
28. Kemp T.J., Poulter M., Carritt B. Microsatellite variation within the human RHCE gene. *Vox Sang*. 1999; 77(3): 159–63. DOI: 10.1159/000031096.
29. Samareh Salavati Pour M., Soleimany S., et al. A Case Report of a Rare Rh Phenotype: D. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2019; 35(2): 402–4. DOI: 10.1007/s12288-019-01089-7.
30. Cheng G.J., Chen Y., Reid M.E., Huang C.H. Evans antigen: a new hybrid structure occurring on background of D and D-- Rh complexes. *Vox Sang*. 2000; 78(1): 44–51. DOI: 10.1159/000031148.

Информация об авторах

Чумак Анна Александровна*, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией HLA-типирования ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения Москвы»,
e-mail: gella5@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5912-3564>

Белякова Вера Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая Централизованной клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения Москвы»,
e-mail: karnas@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8954-1281>

Майорова Ольга Андреевна, доктор медицинских наук, профессор, главный врач ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения Москвы»,
e-mail: olgamai@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8589-7122>

Дрозд Тамара Станиславовна, биолог отделения трансфузиологии ГБУЗ «Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского Департамента здравоохранения Москвы»,
e-mail: peru6ko@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8508-5984>

Данилец Виолетта Вячеславовна, заведующая отделением трансфузиологии ГБУЗ «Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского Департамента здравоохранения Москвы»,
e-mail: gb3opk@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4605-8315>

Ганцова Елена Александровна, младший научный сотрудник НИИ морфологии и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»,
e-mail: gantsova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4925-8005>

Еремина Ирина Здиславовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»,
e-mail: eremina-iz@rudn.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5093-6232>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 09.08.2023

Принята к печати: 20.12.2023

Information about the authors

Anna A. Chumak*, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for HLA-typing, Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrillov,
e-mail: gella5@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5912-3564>

Vera V. Belyakova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Centralized Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrillov,
e-mail: karnas@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8954-1281>

Olga A. Maiorova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head Doctor of Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrillov,
e-mail: olgamai@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8589-7122>

Tamara S. Drozd, Biologist of the Transfusiology Department, City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky,
e-mail: peru6ko@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8508-5984>

Violetta V. Daniletz, Head of the Transfusiology Department, City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky,
e-mail: gb3opk@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4605-8315>

Elena A. Gantsova, Research Assistant, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),
e-mail: gantsova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4925-8005>

Irina Z. Eremina, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor at the Department of histology, cytology and embryology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),
e-mail: eremina-iz@rudn.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5093-6232>

* Corresponding author

Received 09 Aug 2023

Accepted 20 Dec 2023