

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ



МЕРИ КИРИЈАС

**ФРЕКВЕНЦИЈА НА ХЛА ХАПЛОТИПОВИТЕ ВО РЕПУБЛИКА
МАКЕДОНИЈА И НИВНАТА УЛОГА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИЈА
НА МАТИЧНИ КЛЕТКИ**

-Докторска дисертација-

Скопје, 2018 година

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ СКОПЈЕ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ



МЕРИ КИРИЈАС

**ФРЕКВЕНЦИЈА НА ХЛА ХАПЛОТИПОВИТЕ ВО РЕПУБЛИКА
МАКЕДОНИЈА И НИВНАТА УЛОГА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИЈА
НА МАТИЧНИ КЛЕТКИ**

-Докторска дисертација-

Скопје, 2018 година

Ментор на докторската дисертација

Проф. д-р Соња Генадиева-Ставриќ, Медицински факултет, Скопје

Комисија за одбрана:

1. Проф. д-р Дејан Трајков
2. Проф. д-р Соња Генадиева-Ставриќ
3. Проф. д-р Кочо Димитровски
4. Проф. д-р Елена Шукарова-Ангеловска
5. Проф. д-р Милка Здравковска

Датум на одбрана

----11.06.2018-----

Оваа докторска дисертација ја посветувам на моите најблиски

На мојот татко, Цане,

Кој целиот свој живот ме учеше на вистинските вредности во животот, на неговата
несебична поддршка и љубов.

На мојот сопруг, Тиберие,

Кој секогаш е полн со љубов и разбирање, моја потпора, секогаш расположен да ме
насмее и да ми даде совет и сила да ја надминам секоја препрека.

На мојот најмил син, Давор,

Светлината во мојот живот, неговата насмевка и преградка ми го исполнуваат секој ден
со неизмерна среќа и благодет.

И на мојот ангел чувар – мојата мајка Весна,

Чишто совети, љубов и поддршка се длабоко врежани во мене и ми помогнаа да
станам личноста којашто сум денес.

Благодарност на проф. д-р Соња Генадиева-Ставриќ за безрезервната поддршка во текот на докторските студии и корисните совети како ментор.

Благодарност на доц. д-р Александар Петличковски за сите совети и сугестии во текот на подготовката на докторската дисертација и за стручната едукација.

Голема благодарност до целиот колектив на Институтот за имунобиологија и хумана генетика за помошта и поддршката при изработката на дисертацијата.

ЛИСТА НА СКРАТУВАЊА

ХЛА	Хумани леукоцитни антигени
КИР	Killer Immunoglobulin-like Receptor
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSO	Sequence Specific Oligonucleotides
SSP	Sequence Specific Priming
SBT	Sequence Based Typing
ГТК	Главен ткивносовпадлив комплекс
КПУ	Клетки природни убијци
АПК	Антиген презентирачки клетки
ТАР	Transporter associated with antigen processing
CD	Clusters of differentiation
CLIP	Class II associated invariant chain peptide
ХМК	Хематопоеетски матични клетки
СЗО	Светска здравствена организација
NMDP	National Marrow Donor Program
LD	Linkage Disequilibrium
ПВР (PCR)	Полимеразно верижна реакција (Polymerase chain reaction)
NIMA	Non inherited maternal antigens
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide
WMDA	World Marrow Donor Association
МКДРКС	Македонски дарителски регистар за коскена срцевина
D`	Relative linkage disequilibrium

СОДРЖИНА:

ИЗВАДОК	1
ABSTRACT	3
1. ВОВЕД	5
1.1. Историја на хуманите леукоцитни антигени	5
1.2. Генетска структура на ХЛА локусот	6
1.3. ХЛА молекули	8
1.3.1. Структура на ХЛА-молекулите.....	8
1.3.2. Ткивна дистрибуција на ХЛА-молекулите.....	9
1.3.3. Функција на ХЛА-молекулите.....	10
1.3.3.1. Улогата на ХЛА во презентацијата на пептиди.....	10
1.3.3.2. Улогата на ХЛА во имунологијата на трансплантацијата.....	11
1.4. Наследување на ХЛА	12
1.5. ХЛА номенклатура	13
1.5.1. Номенклатура на антигените.....	14
1.5.2. Номенклатура на алелите.....	14
1.6. Полиморфизам на ХЛА	15
1.6.1. Врзана нерамнотежа на ХЛА алелите.....	17
1.6.2. Значењето на полиморфизмот во популационите студии.....	18
1.6.3. Асоцијација на ХЛА со болести.....	18
1.7. ХЛА-типизација	20
1.7.1. Серолошка ХЛА-типизација.....	20
1.7.2. Молекуларна ХЛА-типизација.....	20
1.8. Значењето на ХЛА во трансплантацијата на ХМК	22
1.8.1. ХЛА во изборот на дарители на ХМК.....	22
1.8.2. Сроден дарител на ХМК.....	22

1.8.3. Несроден дарител на ХМК.....	23
1.8.4. Матични клетки од крв од папочна врвца.....	24
1.8.5. Регистар на доброволни дарители на ХМК.....	25
1.9. Сознанија за ХЈА полиморфизмот во Република Македонија и мотив за изработка на студијата.....	26
2. ЦЕЛИ НА ДИСЕРТАЦИЈАТА.....	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	28
3.1. Испитаници.....	28
3.2. Анализирани популации.....	28
3.3. Примероци.....	28
3.4. Методи.....	29
3.4.1. Изолација на ДНК.....	29
3.4.2. ХЈА-типизација.....	30
3.4.2.1. Метод на реверзна хибридизација.....	30
3.4.2.2. Метод на секвенчно-специфични олигонуклеотиди.....	30
3.5. Статистичка анализа.....	30
4. РЕЗУЛТАТИ.....	32
4.1. Анализа на ХЈА алелите и хаплотиповите кај група 1.....	32
4.1.1. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа.....	32
4.1.2. Фреквенција на ХЈА алелските групи.....	32
4.1.3. Фреквенција на ХЈА хаплотиповите.....	35
4.2. Популациска студија.....	42
4.3. Анализа на ХЈА алелите и хаплотиповите кај група 2.....	45
4.3.1. Демографски податоци за МКДРКС.....	45
4.3.2. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа.....	45
4.3.3. Фреквенција на ХЈА алелските групи.....	46
4.3.4. Фреквенција на ХЈА хаплотиповите.....	51

4.4. Споредба на ХЛА алелите и хаплотиповите меѓу група 1 и група 2.....	53
5. ДИСКУСИЈА.....	56
6. ЗАКЛУЧОЦИ.....	64
7. БИБЛИОГРАФИЈА.....	65

ИЗВАДОК

Вовед: Комплексот гени кои го кодираат системот на Хумани леукоцитни антигени (ХЛА) лоцирани на кусиот крак на 6-тиот хромозом се најполиморфните гени во хуманиот геном. Сложеноста на ХЛА полиморфизмот е последица на постоењето на поголем број генски локуси, голем број на алели за повеќето локуси и комбинација на нивните продукти. Анализата на ХЛА полиморфизмот и врзаната нерамнотежа меѓу алелите, како и разликата во фреквенцијата на ХЛА алелите и хаплотиповите помеѓу популациите има примена при изборот на дарител за трансплантација на хематопоетски матични клетки и во испитувањето на здруженоста на ХЛА со етиопатогенезата на некои болести. Досега се објавени неколку студии за полиморфизмите на одредени ХЛА локуси во македонската популација. Заради тоа се наметна потребата од одредување на фреквенцијата на HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелските групи и хаплотиповите во македонската популација. Познавањето на овие фреквенции би овозможило скратување на времето потребно за барање на соодветен дарител и правовремена трансплантација на матични клетки. Исто така, испитувањето на ХЛА полиморфизмот во здрава, македонска популација би овозможило докажување на релативниот ризик на одредени алели со разни болести во нашата популација.

Цели на студијата: Основна цел на оваа студија е да се одреди фреквенцијата на ХЛА алелските групи и хаплотипови во македонската популација на примерок со дефинирани хаплотипови и да се одреди степенот на генетска сличност со останатите популации. Дополнителни цели се да се одреди ХЛА профилот на доброволните дарители во Македонскиот дарителски регистар на коскена срцевина (МКДРКС).

Материјал и методи: Испитувањето е работено на две групи испитаници. Група 1 ја сочинуваат 286 здрави индивидуи, родители на пациенти испратени на Институтот за имунобиологија и хумана генетика за ХЛА-типизација. Тие се со дефинирани хаплотипови заради познатата фамилијарна историја. Група 2 е составена од 1541 доброволни дарители, членови на МКДРКС, поделени на три подгрупи според националната припадност: Македонци, Албанци и Македонци муслимани. Во двете групи е испитана фреквенцијата на алелите (HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1) и 4-локусните хаплотипови, а во подгрупа од 566 индивидуи е направена типизација и на HLA-DQ локусот. Типизацијата е работена со тестови за ХЛА-ДНК типизација со средна резолуција. Изолацијата е работена рачно со методот на фенол-хлороформ и со апаратор Duplica Prep, EuroClone. ХЛА-типизацијата е работена со два методи: методот на реверзна хибридизација (RLS) со китови од INNOGENETICS, Belgium и SSO со китови од OneLambda, USA. За пресметување на фреквенцијата на алелските групи, 2, 3, 4 и 6-локусните хаплотипови, како и Hardy-Weinberg-овата рамнотежа беше користена софтверската програма Arlequin, верзија 3.5. Македонската популација е споредена со 30 европски и светски популации со помош на софтверската програма Phylip. Дендрограмот беше конструиран со користење на Nei's генетската дистанца за HLA-A, -B и -DRB1. беше пресметана и врзаната нерамнотежа (D') за двокусните хаплотипови со помош на Arlequin 3.5.

Резултати: Идентификувани се 18 HLA-A, 26 HLA-B, 13 HLA-C и 13 HLA-DRB1 во група 1. Најчести алелски групи со фреквенција поголема од 10 % се: HLA-A*02 (29,0 %), HLA-A*24 (13,8 %), HLA-B*35 (16,1 %), HLA-B*51 (14,7 %), HLA-B*18 (14,7 %), HLA-C*07 (27,9 %), HLA-DRB1*11 (25,5 %) и HLA-DRB1*16 (14,8 %). Најчести четирилокусни хаплотипови се: HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 (2,7 %), HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (2,6 %), HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11 (1,5 %) и HLA-A*24-B*18-C*07-DRB1*11 (1,3 %). Во МКДРКС се детектирани 59 алелски групи во ХЛА класа 1 и 13 во класа 2 кај Македонците, 51 алелска група во класа 1 и 12 во класа 2 кај Албанците и 46 кај класа 1 и 12 во класа 2 кај Македонците муслимани. Најчест хаплотип кај Албанците и Македонците муслимани е HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (4,6 % односно 6,8 %). Најчести HLA-DQA1 алелски групи кај македонската популација се: HLA-DQA1*01 (49,7 %) и HLA-DQA1*05 (33,9 %), а во HLA-DQB1 локусот HLA-DQB1*05 (34,6 %) и HLA-DQB1*03 (33,5 %). Најчест 6-локусен хаплотип кај Македонците е HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DRB1*03 (4,2 %). Македонската популација има најголем степен на сличност со популациите од Балканскиот Полуостров.

Заклучок: Резултатите од ова испитување за првпат ја прикажуваат фреквенцијата на HLA-A-B-C-DRB1 хаплотиповите кај македонската популација со дефинирани хаплотипови. Исто така, одреден е ХЛА профилот на доброволните дарители во МКДРКС и е испитан степенот на генетска сличност на македонската со останатите популации. Добиените податоци можат да се користат за натамошно планирање на стратегии за регрутирање на доброволни дарители и како контролна група за асоцијативни студии со разни болести.

Клучни зборови: ХЛА; ХЛА хаплотипови; полиморфизам; Македонски дарителски регистар за коскена срцевина; популациона студија.

Frequency of HLA haplotypes in Republic of Macedonia and their role in stem cell transplantation

ABSTRACT

Introduction: The gene complex that codes for the Human Leucocyte Antigens (HLA) located on the short arm of chromosome 6, are the most polymorphic genes in the human genome. The complexity of HLA polymorphism is due to the high number of gene loci, a lot of alleles in the loci and the combination of their products. Analysis of HLA polymorphism and linkage disequilibrium between alleles, as well as the difference in frequency of HLA alleles and haplotypes between populations has an application in the search of a donor for hematopoietic stem cell transplantation and in association studies of HLA in the pathogenesis of diseases. Few studies are published so far for the polymorphisms of some HLA loci in the Macedonian population. It imposed the need for determination of the frequency of HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele groups and haplotypes in the Macedonian population. The knowledge of these frequencies would shorten the time necessary for the search of compatible donor and stem cell transplantation. Moreover, the analysis of HLA polymorphism in healthy Macedonian population would help in determining the relative risk of alleles and different diseases.

Aim of the study: The main aim of this study is to determine the frequency of HLA allele groups and haplotypes in the Macedonian population, in a sample with defined haplotypes and to calculate the degree of genetic similarity with other population. Moreover, the aim is to determine the HLA profile of the donors in the Macedonian Bone Marrow Donor Registry (MBMDR).

Material and Methods: This study is performed in 2 groups of participants. Group 1 is 286 healthy individuals, parents of the patients sent to the Institute of Immunobiology and Human Genetics for HLA typing. They have defined haplotypes due to known family history. Group 2 are the 1541 volunteer donors in MBMDR, divided in three groups Macedonians, Albanians and Macedonian Muslims. In both groups we calculated the allele frequency (HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1) and 4-loci haplotypes, and a group of 566 individuals was also typed for HLA-DQ. Typing is performed with HLA-DNA intermedium resolution. DNA is isolated with the phenol-chlorophorm method of isolation and with the automated machine Duplica Prep, EuroClone. HLA typing was performed with two methods: method of reverse line strip (RLS) from INNOGENETICS, Belgium and SSO from One Lambda, USA. Allele group frequency, 2-, 3-, 4- and 6-loci haplotypes, as well as Hardy-Weinberg equilibrium was calculated with the software Arlequin3.5. The Macedonian population was compared with 30 European and world population with the software Phylip. Dendrogram was constructed using the values for Nei's genetic distance calculated for HLA-A, -B and -DRB1 loci. Linkage disequilibrium (D') for two loci haplotypes was calculated in the Arlequin3.5 software.

Results: We identified 18 HLA-A, 26 HLA-B, 13 HLA-C and 13 HLA-DRB1 allele groups in group 1. The most frequent allele groups with frequency >10 % were HLA-A*02 (29,0 %), HLA-A*24 (13,8 %), HLA-B*35 (16,1 %), HLA-B*51 (14,7 %), HLA-B*18 (14, 7 %), HLA-C*07 (27,9 %), HLA-DRB1*11 (25,5 %) and HLA-DRB1*16 (14,8 %). The most frequent 4 loci haplotypes were HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 (2,7 %), HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (2,6 %), HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11 (1,5 %) and HLA-A*24-B*18-C*07-DRB1*11 (1,3 %). We detected in MBMDR 59 allele groups in class I and 13 in class II in Macedonians, 51 in class I and 12 in class II in Albanians and 46 in class I and 12 in class II in Macedonian Muslims. Most common haplotype in Albanians and Macedonian Muslims is HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (4,6 % and 6, 8 %). The most frequent HLA-DQA1 allele groups in the Macedonian population were HLA-DQA1*01 (49,7 %) and HLA-DQA1*05 (33,9 %), and in HLA-DQB1 locus HLA-DQB1*05 (34,6 %) and HLA-DQB1*03 (33,5 %). The most common 6-loci haplotype in Macedonians is HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DRB1*03 (4,2 %). The Macedonian population has the most similarities with the populations from Balkan Peninsula.

Conclusion: The results from this study for the first time show the frequency of HLA-A-B-C-DRB1 haplotypes in the Macedonian population with defined haplotypes. We also determined the HLA profile of the volunteer donors from the MBMDR and the degree of genetic distance of the Macedonian population with other populations. This data can be used for further planning of strategies for donor requirement and as a control group in association studies for different diseases.

Keywords: HLA; HLA haplotypes; polymorphism; Macedonian Bone Marrow Donor Registry; population study.

1. ВОВЕД

1.1. Историја на Хуманите леукоцитни антигени

Откритието на Хуманите леукоцитни антигени (ХЛА) се поврзува со работата на Jean Dausset во 1958 година (1). Тој анализираше серуми од пациенти кои примиле повеќекратни трансфузии на крв и забележал дека тие ги аглутинираве леукоцитите кај 11 од 19 тестирани индивидуи. Антигенот кој го открил на површината на леукоцитите го нарекол MAC, подоцна познат како HLA-A2. За ова свое откритие тој добил Нобелова награда во 1980 година, заедно со Snell и Benacerraf. Во исто време, своите наоди за алоантигените на хуманите леукоцити ги презентирале и Jon van Rood и Payne (2, 3). За таа цел, тие користеле серуми од жени кои родиле повеќепати. Jon van Rood детектирал два леукоцитни антигени кои ги нарекол 4a и 4b (подоцна наречени HLA-Bw4 и -Bw6, соодветно), а Payne ги детектирал антигените LA1 (подоцна HLA-A1) и LA2 (подоцна HLA-A2) веројатно контролирани од алели.

Претпоставките за постоење на трет локус во ХЛА генскиот регион биле потврдени од скандинавска група научници (4) кои при испитувањето на популациите и фамилиите забележале дека се однесува различно од LA и 4. Го нарекле AJ, подоцна означен како HLA-C. Во 70-тите години од XX век биле пронајдени антисеруми кои можеле да детектираат детерминанти само на Б-лимфоцитите и тие биле наречени HLA-DRw1-7 (DR=D related) (5). Ceppellini во 1967 година прв го употребил терминот ХЛА хаплотип за генетската информација која ја носи секој од двата ХЛА хромозомски региони кај една индивидуа (5).

Улогата на ХЛА-молекулите како хистокомпатибилни антигени била потврдена уште во 60-тите години од минатиот век, со експерименти со кожни графтови кај идентични близнаци (подолго преживување) и кај браќа и сестри. Доказ дека ХЛА антигените се важни хистокомпатибилни антигени е факот дека кожните графтови предизвикале создавање на антитела кон ХЛА антигените (6). Првите податоци за врската меѓу ХЛА-молекулите и преживувањето на бубрежните графтови, биле претставени од Terasaki (7), а подоцна потврдени од повеќе научни групи (5, 6, 8) покажале дека навистина ХЛА е главниот хистокомпатибилен комплекс кај луѓето. Првите резултати кои ја покажуваат асоцијацијата на ХЛА со одредени болести биле објавени во 1967 година кај пациенти со Хоџкинсова болест (9).

Откритијата во областа на ХЛА и хистокомпатибилноста во голема мера се должеле на организирањето на Интернационални работни групи за хистокомпатибилност (International Histocompatibility Workshops – IHWS) со кои се обезбедила блиска соработка на научните групи од различни земји (5). Секоја работилница имала за цел споредба на техниките кои се користат, објавување на резултатите и нови наоди на полето на хистокомпатибилноста. Првата работилница е

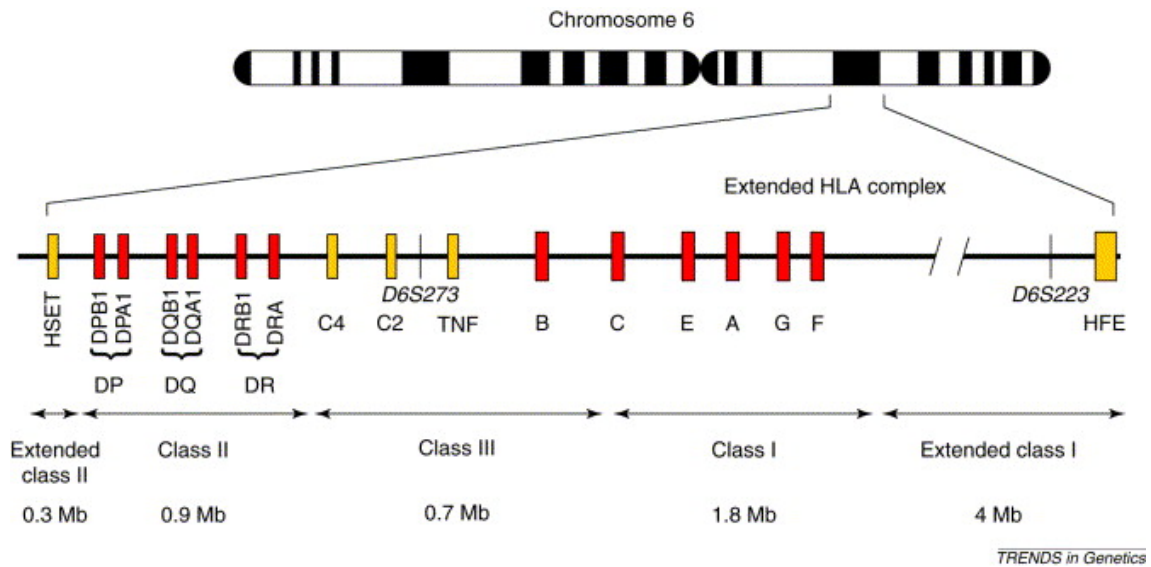
одржана во 1964 година во Дурхам, Северна Каролина и имала за цел да се споредат различните техники за детекција на леукоцитните антигени користени од различни истражувачи, додека последната, 17-тата работилница, одржана во 2017 година, во Калифорнија, ги разработувала современите проблеми со кои се соочуваат истражувачите на полето на ХЛА : NGS (Next-generation sequencing) на ХЛА и КИР гените, мапирање на серолошките епитопи, информатика на геномските податоци и контрола на квалитетот.

Првите податоци кои укажувале на имунобиолошката функција на ХЛА класа 1 и класа 2 молекулите, потекнуваат од 1968 година. Hugh McDevitt и Marvin Tuan (10) покажале дека глвците можат да создадат антителиен одговор на синтетички полипептидни антигени, генетска особина која била блиску поврзана со H-2 комплексот. Структурата на ХЛА-молекулите била откриена во раните 80-ти години (5), а структурата на пептид-врзувачкото место на HLA-A2 молекулата била објаснета со помош на кристалографија со Икс-зраци од страна на Bjorkman и соработниците (11). Првиот ХЛА ген изолиран со молекуларно клонирање бил за HLA-B7 во 1980 година (12). Со откривањето на полимеразно-верижната реакција започнуваат ерата на идентификување на илјадници алели во ХЛА-системот со помош на должински полиморфизам на рестрикциски фрагменти (RFLP), секвенчно-специфични олигонуклеотиди (SSO), па сè до секвенчно-специфични прајмери (SSP) и секвенционирање (SBT).

1.2. Генетска структура на ХЛА локусот

Хумани леукоцитни антигени (ХЛА) е името за хуманиот Главен ткивно совпадлив комплекс - ГТК (Major Histocompatibility Complex – МНС) кој е лоциран на кусиот крак на 6-тиот хромозом (6p21.3) (13). Тој опфаќа регион од околу 4 Мб што е 0,13 % од хуманиот геном, но содржи приближно 0,5 % (>150) од 32.000 познати протеин- кодирачки гени (14, 15).

ХЛА комплексот е поделен во 3 региони: ХЛА класа 1, класа 2 и класа 3, како што било првично предложено од Jan Klein (16). Гените од ХЛА класа 1 се наоѓаат теломерно на ГТК и опфаќаат околу 1.800 kb, додека гените за ХЛА класа 2 се наоѓаат на центромерниот крај на ГТК и опфаќаат околу 900 kb (Слика 1). Помеѓу регионите на класа 1 и класа 2 се наоѓа сегмент на ДНК од околу 1.100 kb, каде што се наоѓаат гени кои не кодираат ХЛА молекули (нон-ХЛА) (14).



Слика 1. Генетска структура на ГТК комплексот (17)

ХЛА класа 1 регионот го сочинуваат три класични, високополиморфни гени: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Нивен продукт е алфа-веригата, која е главен антиген одговорен за ткивната совпаѓливост. Бројот на откриени алели (декември 2017 година) во HLA-A изнесува 4.081, во HLA-B 4.950 и во HLA-C 3.685 (18). Покрај нив во ХЛА класа 1 регионот се наоѓаат и три неklasични гени, HLA-E (27 алели), HLA-F (30 алели) и HLA-G (58 алели), кои се одликуваат со ограничен полиморфизам, ниско ниво на експресија на протеинските производи и ограничена ткивна дистрибуција. Исто така, во класа 1 регионот се наоѓаат и 11 псевдогени: HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L, HLA-P, HLA-T, HLA-U, HLA-V, HLA-W, HLA-X и HLA-Y, кои не кодираат протеински производи (14, 19).

ХЛА класа 2 регионот го сочинуваат три субрегиони: HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ. Секој од нив се состои од повеќе генски локуси кои ги кодираат алфа и бета веригите на антигените HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP (14, 19). Најважен во класа 2 е високоваријабилниот HLA-DRB1 (за бета-веригата од HLA-DR антигенот) во кој има откриено 2.146 алели. Тој заедно со HLA-DRA (за алфа-веригата на HLA-DR антигенот) ги кодира серолошки дефинираните специфичности од HLA-DR1 до HLA-DR18. Кога се присутни гените HLA-DR3, HLA-DR4 и HLA-DR5, заедно со HLA-DRA ги кодираат антигените HLA-DR52, HLA-DR53 и HLA-DR51. HLA-DRB2, HLA-DRB7 и HLA-DRB9 се псевдогени. Во HLA-DQ субрегионот се наоѓаат полиморфните гени HLA-DQA1 (94 алели) и HLA-DQB1 (1.178 алели) кои ги кодираат алфа и бета-веригата на HLA-DQ1 до HLA-DQ9 антигените. HLA-DPA1 и HLA-DPB1 гените ги кодираат HLA-DP антигените и се одликуваат со помал полиморфизам (14, 18, 20).

ХЛА класа 3 регионот има највисок степен на густина на гени, но не се сите вклучени во имуниот систем. Некои од позначајните се: HSP70, TNF, C4A, C4B, C2, BF, CYP21 и други (14).

1.3. ХЛА молекули

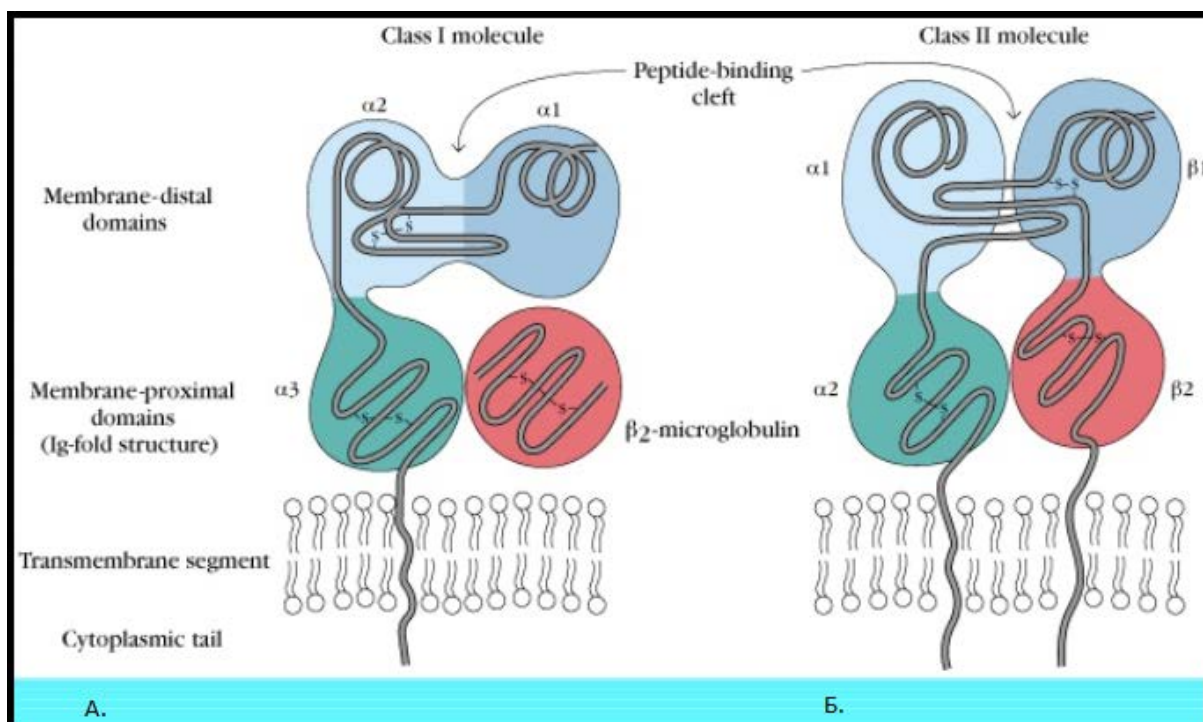
ХЛА молекулите освен што меѓусебно се разликуваат по гените кои ги кодираат, исто така се разликуваат и по нивната структура, ткивната дистрибуција и биолошката функција. Врз основа на овие разлики постојат две групи на ХЛА молекули (антигени): ХЛА класа 1 и ХЛА класа 2.

1.3.1. Структура на ХЛА-молекулите

ХЛА класа 1 молекулите се изградени од две вериги: полиморфен, тежок ланец алфа (45 kD), чишто гени се наоѓаат на 6-тиот хромозом и неполморфен, лесен ланец бета 2 микроглобулин (12 kD), чишто ген е локализиран на 15-тиот хромозом (13, 21).

Алфа-ланецот е организиран во три надворешни домени ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$) секој составен од приближно 90 аминокиселини, трансмембрански домен од околу 25 хидрофобни аминокиселини по што следува кратка низа на наелектризирани (хидрофилни) аминокиселини и цитоплазматски сегмент од 30 аминокиселини (Слика 2). Жлебот каде што се врзува пептидот го формираат $\alpha 1$ и $\alpha 2$ домените, со големина од $25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ во кој може да се смести пептид со големина од 8 до 10 аминокиселини (13, 21, 22).

$\beta 2$ - микроглобулинот содржи околу 100 аминокиселини и е ковалентно поврзан за $\alpha 3$ доменот. Тој е важен за одржување на конформацијата на ХЛА класа 1 молекулите и е идентичен во сите ХЛА класа 1 молекули (мономорфен) (13).



Слика 2. А. Шематски приказ на ХЛА класа 1 молекулата; Б. Шематски приказ на ХЛА класа 2 молекулата (13)

ХЛА класа 2 молекулите се изградени од две вериги: алфа-верига од 33 kD и бета-верига од 28 kD, кои се меѓусебно поврзани со нековалентни врски. За разлика од класа 1, двете вериги се кодирани од гени кои се наоѓаат на 6-тиот хромозом (13).

Двата ланци се изградени од екстрацелуларен (180 аминокиселини), трансмембрански (25 аминокиселини) и цитоплазматски дел со варијабилна должина (Слика 2). Екстрацелуларниот дел кај двете вериги е изграден од по два домена: $\alpha 1$ и $\alpha 2$, односно $\beta 1$ и $\beta 2$. N-терминалните краеве на домените $\alpha 1$ и $\beta 1$ го формираат местото за врзување на пептидот. Жлебот е со отворени краеве така што може да собере пептид со големина и повеќе од 30 аминокиселини (21). Домените $\alpha 2$ и $\beta 2$ се неполиморфни, а на $\beta 2$ доменот се наоѓа местото за врзување на CD4 молекулите од Т-лимфоцитот.

1.3.2. Ткивна дистрибуција на ХЛА-молекулите

Класичните ХЛА класа 1 молекули (HLA-A, HLA-B и HLA-C) се прикажуваат на површината на скоро сите клетки со јадро во организмот. Не ги прикажуваат само невроните, клетките од епителот на корнеата, клетките на трофобластот и герминативните клетки. Нивото на прикажување се разликува кај различни типови на клетки. Високо ниво на прикажување имаат лимфоцитите, како и макрофагите и епителните клетки на тимусот, додека ниско ниво на прикажување на ХЛА-молекулите имаат црnodробните клетки, мускулните клетки и фибробластите (13, 15).

Некласичните ХЛА класа 1 молекули (HLA-E, HLA-G и HLA-F) имаат улога претежно во природниот имунитет и се карактеризираат со ограничена ткивна дистрибуција и ниско ниво на прикажување (23). HLA-G е лиганд за инхибиторните рецептори на клетките природни убијци (КПУ) и се прикажува на екстравилозните трофобласти, каде што се смета дека игра важна улога во супресијата на мајчиниот имун одговор за време на бременоста (24). HLA-F главно е прикажан интрацелуларно во цитоплазмата на периферните Б-лимфоцити, тонзилите, тимусот и феталниот црн дроб. Кога се активирани Т-лимфоцитите прикажуваат голема количина на HLA-F молекули на површината, што ги прави важен маркер за активиран имун одговор (25). HLA-E се наоѓа на површината на сите јадрени клетки, но со пониска експресија (24). Неговата имунолошка функција не е доволно јасна, иако се смета дека главната функција му е заштита на нормалните клетки од несоодветно убивање од страна на КПУ. Полиморфизмот на HLA-E можеби игра улога во исходот од трансплантацијата на матични клетки (26).

За разлика од ХЛА класа 1, ХЛА класа 2 молекулите (HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ) се прикажуваат на ограничен број на клетки (19). Тоа се антиген- презентирачките клетки (АПК): макрофаги, стеблести клетки, моноцити и Б- лимфоцити. Нивното прикажување може да биде поттикнато на површината на тимусните епителни клетки каде што играат улога во создавањето на Т-клеточниот репертоар низ позитивната и негативната селекција на Т-лимфоцитите во тимусот. Исто така, прикажувањето на ХЛА класа 2 молекулите може да зависи и од стадиумот на клеточното диференцирање на клетките (13).

Прикажувањето на ХЛА-молекулите може да се зголеми со влијаење на цитокините кои се создаваат во текот на имуниот одговор. Некои туморски клетки не прикажуваат ХЛА класа 1 молекули и така го избегнуваат имуниот одговор (27). Исто така, невообичаено прикажување на ХЛА класата 2 е присутно кај автоимуните болести (19).

1.3.3. Функција на ХЛА-молекулите

Основна функција на ХЛА-молекулите е презентација на антигените на Т-лимфоцитите. Секој туѓ или сопствен антиген кој го активира клеточниот имун одговор мора да биде прикажан во склоп на сопствените ХЛА-молекули. Покрај природната биолошка улога во разликувањето на своето од туѓото, ХЛА класа 1 и класа 2 антигените имаат важна улога и во аlogenата трансплантација. Совпадливоста во ХЛА помеѓу дарителот и примателот влијае на исходот на аlogenата трансплантација на ткива и органи.

1.3.3.1. Улогата на ХЛА во презентацијата на пептиди

ХЛА-молекулите се синтетизираат во ендоплазматскиот ретикулум, а интрацелуларниот процес на создавање на комплексот ХЛА-пептид е различен за класа 1 и класа 2. Во овој процес, учествуваат голем број молекули и ензими.

Пептидите кои се презентираат од страна на ХЛА класа 1 молекулите потекнуваат од ендогените протеини како што се протеините од вируси, продуктите од туморите, но и протеините од цитоплазмата на нормалните клетки. Интрацелуларните протеини се обработуваат и разградуваат до пептиди со помош на цитозолниот протеолитички систем (протеазом) откако прво ќе се врзат за мал протеин, убиквитин. Протеазите LMP-2 и LMP-7 со нивната каталитичка активност овозможуваат создавање на пептиди кои лесно се врзуваат за ХЛА класа 1 молекулите. Создадениот пептид навлегува во луменот на рапавиот ендоплазматски ретикулум со помош на транспортери поврзани со преработка на антиген (transporter associated with antigen processing – TAP). Процесот на склопување на ХЛА класа 1 молекулата се одвива во рапавиот ендоплазматски ретикулум со помош на повеќе молекулски придружници како калнексин, калретикулин и тапасин. Комплексот ХЛА класа 1-пептид преку Голџиевиот комплекс излегува на површината на клетката. На површината на клетката пептидот во склоп на ХЛА класа 1 е препознаен од CD8⁺ Т-лимфоцитите, со чијашто активација се отстрануваат клетките инфицирани со вируси и туморските клетки (13, 21).

Пептидите кои се врзуваат за ХЛА класа 2 молекулите претставуваат егзогени антигени (бактериски) кои се внесуваат во АПК со помош на фагоцитоза или ендцитоза. Тие стигнуваат до лизозомите на клетките каде што се одвива нивното разградување од присутните ензими до пептиди. Алфа и бета-веригите се синтетизираат во ендоплазматскиот ретикулум, каде што три пара се врзуваат за неменливата верига (L_i) која се врзува за жлебот каде што треба да се врзе пептидот во ХЛА-молекулата. Таа има улога во спречувањето ендогено создадените пептиди да се врзат за жлебот. Учествува во диплењето на веригите и го помага движењето низ

ендоцитната патека на обработка. Комплексот ХЛА класа 2 молекула и неменливата верига излегува од ендоплазматаскиот ретикулум како везикула и се спојува со ендозомот каде што се наоѓаат обработените пептиди. Прво настанува деградација на неменливата верига при што останува само еден мал дел врзан за пептид-врзувачкиот жлеб наречен CLIP (class II associated invariant chain peptide). Размената на CLIP со обработениот пептид е потпомогната од HLA-DM молекула, којашто е мономорфна и не се прикажува на површината на клетката. ХЛА класа 2-пептид комплексот е стабилна структура која излегува на површината на клетката и е препознаена од CD4⁺ Т-лимфоцитите (13, 21).

Секоја молекула на ХЛА има едно место за врзување на пептид, но може да врзе многу различни пептиди така што во склоп на ограничениот специфичен број на ХЛА кој ги има една индивидуа, можат да се презентираат голем број различни ендогени и егзогени пептиди (21). Комплексот пептид-ХЛА е стабилна структура на површината на клетките, а пептидот може да остане врзан неколку часа или неколку дена. Долготрајното перзистирање на комплексот ХЛА-пептид на АПК е важно за препознавање на туѓиот пептид од страна на Т-лимфоцитите и започнувањето на имуниот одговор. За активација на Т-лимфоцитите се доволни 100 комплекси на туѓиот пептид со класа 2 на АПК (околу 0,1 % од вкупниот број на овие комплекси кои се појавуваат на мембраната) (21).

Врзувањето на пептидот за ХЛА-молекулата не е специфично, т. е. ХЛА-молекулата не прави разлика меѓу сопствените и туѓите пептиди. Комплексите со сопствените пептиди нормално не предизвикуваат имун одговор затоа што постои толеранција на сопственото што е својство на Т-лимфоцитите а не на ХЛА. Автореактивните Т-лимфоцити се отстрануваат и инактивираат во текот на негативната селекција во тимусот (13, 21).

1.3.3.2. Улогата на ХЛА во имунологијата на трансплантацијата

При пресадувањето на орган или ткиво од една на друга, генетски неидентична индивидуа, се покренува серија од клеточни и молекуларни реакции кои водат до отфрлање на калемот. Алогениот одговор вклучува различни имунолошки механизми за разликување на сопственото од туѓото кои водат до отфрлање на калемот. За силно и брзо отфрлање одговорни се ХЛА-молекулите на примателот и на дарителот. Постојат и други алоантигени кои водат до послаби и побавни реакции на отфрлање и тие се нарекуваат минорни хистокомпатибилни антигени (21).

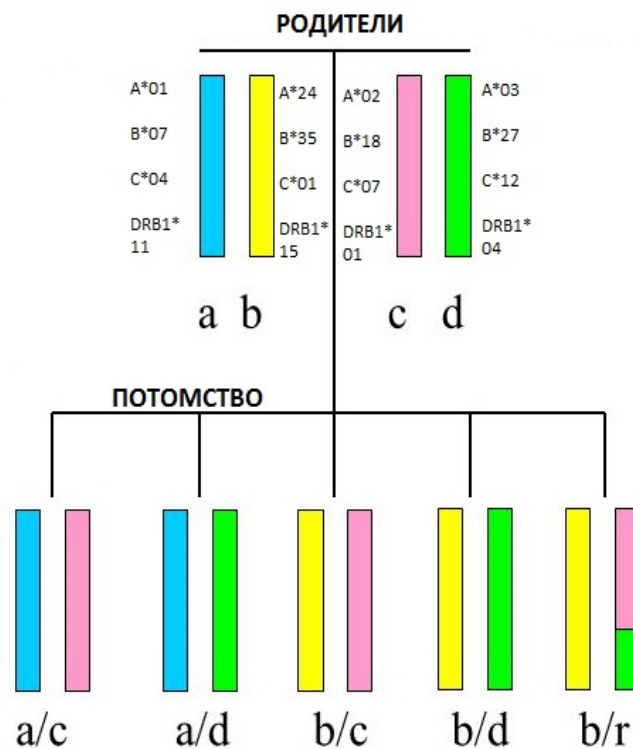
Механизмите кои водат до отфрлање на калемот можат да бидат клеточни и хуморални, а централна улога играат Т-лимфоцитите (28, 29). Препознавањето на алоантигените на површината на ХЛА-молекулите од страна на Т-лимфоцитите може да биде директно и индиректно. Во директната патека Т-клетките на домаќинот ги препознаваат ало-ХЛА молекулите + ало-пептид како да се сопствена ХЛА + туѓ пептид и на тој начин го препознаваат ткивото на дарителот како туѓо. Тие се одговорни за акутното отфрлање на калемот. Кај индиректната патека, Т-клетките препознаваат обработени алоантигени презентирани како пептиди на сопствените АПК. Овој одговор може да се случи при хронично отфрлање на калемот и е поврзан

со Т-клеточни пролиферативни одговори на поваријабилен репертоар, вклучително и пептиди кои биле претходно имунолошки тивки (21).

Превенцијата од отфрлање на калемот се постигнува со имуносупресивна терапија, а се намалува со одбирање на дарител со соодветен степен на совпадливост во ХЛА. При трансплантација на ХМК, успешното прифаќање на калемот се постигнува со предтрансплантациона подготовка на примателот со хемотерапија или зрачење. Меѓутоа, калемот содржи доволно имунокомпетентни клетки така што Т-лимфоцитите на дарителот ќе ги препознаат алоантигените на АПК на примателот (директно препознавање) и во склоп на сопствените АПК (индиректно препознавање) што води до реакција „калем против домаќин“ (13, 21, 30). Разликата во само една аминокиселина меѓу ХЛА на дарителот и примателот може да биде доволна за започнување на реакцијата „калем против домаќин“. И покрај развиените техники за ХЛА-типизацијата, изборот на совпадливи дарители и имуносупресивната терапија, болеста „калем против домаќин“ останува значаен причинител на смртноста по трансплантација на ХМК (21, 30, 31).

1.4. Наследување на ХЛА

Гените во ХЛА-системот се наследуваат хаплотипски поради нивната блиска поврзаност (19, 32). Хаплотип претставува група на алели во организмот кои се наследуваат заедно од еден родител. Секоја индивидуа поседува по два ХЛА хаплотипа: еден наследен од мајката и еден од таткото. Родителите на своите деца можат да им пренесат четири можни комбинации на хаплотипови (Слика 3) односно постои 25 % веројатност децата да бидат идентични, 25 % да бидат различни и 50 % да бидат хаплоидентични. ХЛА-гените се прикажуваат кодоминантно и фенотипот на една индивидуа претставува комбинација од антигените од двата хаплотипа (19).



Слика 3. Наследување на ХЛА

Во текот на мејозата може да дојде до размена на генетскиот материјал помеѓу два хромозома, а рекомбинацијата се пренесува на потомството како нов хаплотип. Честотата на рекомбинациите се поврзува со физичката разделеност меѓу гените, така што очекуваната честота на рекомбинациите на краток сегмент на ГТК е мала (19). Фамилијарните студии покажале дека честотата на рекомбинациите меѓу локусите HLA-A и HLA-DRB1 изнесува околу 2,5 % (33), додека помеѓу локусите HLA-A и HLA-B 0,8 %, а помеѓу локусите HLA-B и HLA-DR е 0,5 % (19). Рекомбинациите помеѓу HLA-B и HLA-C локусите, како и помеѓу HLA-DQ и HLA-DR се многу ретки, што е последица на малото растојание помеѓу овие локуси (33), додека рекомбинациите помеѓу локусите HLA-DQ и HLA-DP се релативно чести (19). Познавањето на начинот на наследување на ХЛА како и утврдувањето за постоење на рекомбинација во фамилијата е важно за еволутивните студии, како и за одредување на степенот на совпадливост меѓу членовите на фамилијата при трансплантација (19, 34).

1.5. ХЛА номенклатура

ХЛА генскиот систем е најполиморфниот генски систем кај луѓето и заради тоа е потребна систематска номенклатура. Именувањето на новите ХЛА алели е одговорност на Комитетот за номенклатура на факторите на ХЛА-системот на СЗО (35) кој е формиран во 1968 година и редовно објавува извештаи и организира состаноци поврзани со номенклатурата на ХЛА алелите. Листата на сите досега именувани алели е достапна на www.hla.alleles.org.

1.5.1 Номенклатура на антигените

Антигените во ХЛА-системот се обележуваат со буквата од генскиот локус (за класа 1) и субрегионот на генот (класа 2) и број (на пример, HLA-A2, HLA-B5, HLA-DR3 итн.). За антигените од С-локусот е задржана и ознаката „w“ (HLA-Cw7) за да се разликуваат од ознаките за системот на комплементот (19, 35). Со подобрување на квалитетот на серумите за типизација, најдено е дека некои ХЛА епитопи можат да бидат заеднички за два или повеќе антигени. Затоа претходнооткриените антигени можат да се одредат како индивидуални специфичности, поттипови. Поттиповите на веќе постојните антигени добивале нов број, но во заграда се означувал и антигенот на кој му припаѓале. На пример: HLA-A23(9) и HLA-A24(9) се засебни антигени, но вооедно и поттипови на HLA-A9. Антигените можат да имаат и други заеднички епитопи и тие често предизвикуваат вкрстени реакции во серолошките тестирања. Ваквите антигени се сместени во групи наречени вкрстено-реактивни групи (cross-reactive groups – CREGs). На антигените од ХЛА класа 1 се наоѓа и епитоп кој е заеднички за повеќето ХЛА антигени и тој епитоп се нарекува „јавен антиген“. Тоа е низа од аминокиселини кои немаат голема варијабилност во ХЛА-молекулата. Два добро карактеризирани „јавни антигени“ се HLA-Bw4 и HLA-Bw6. Сите антигени од HLA-B локусот можат да се распоредат во групата HLA-Bw4 или HLA-Bw6 (19, 35).

1.5.2. Номенклатура на алелите

Од 2010 година во употреба е новата номенклатура на ХЛА алелите заради сè поголемиот број на новооткриени алели (36). Името на секој алел е единствено и се состои од сет четири бројки одвоени со две точки. Секој алел се означува прво со буквата на генскиот локус, потоа со ѕвезда, па следуваат бројките. Првите две бројки ја означуваат алелската група (фамилија) и често одговара на серолошката специфичност (на пример, HLA-B*18). Следниот сет бројки се користи за да се означи поттипот, односно целото име на алелот (на пример, HLA-B*18:01). Тие се назначуваат по редоследот по кој биле откриени ДНК-секвенците. Алелите кои се разликуваат по вториот сет бројки мора меѓу себе да се разликуваат во една или повеќе нуклеотидни супституции кои ја менуваат аминокиселинската секвенца на протеинот. Алелите кои се разликуваат во синонимни супституции во кодирачкиот регион се разликуваат со користење на трет сет бројки (на пример, HLA-B*18:01:01). Алелите кои се разликуваат само во секвенцни полиморфизми во интроните, или во 5' или 3' непреведените региони соседни на егзоните и интроните, се разликуваат со употребата на четврт сет бројки (на пример, HLA-B*18:01:01:01) (18).

Покрај единствениот број, можно е кај некои алели да биде додаден и суфикс-буква, која го означува статусот на експресијата. Суфиксот N се додава доколку алелот не е прикажан ('Null' алел), на пример HLA-A24:09N. Со L (Low) се означува алелот кој има пониско прикажување на клеточната површина во споредба со нормалните клетки. Останати суфикси кои се користат се: C (Cytoplasm) за алели чии продукти се наоѓаат во цитоплазмата; A (Aberrant) кога постои сомнеж дали протеинот е прикажан и Q (Questionable) кога прикажувањето на алелот е под знак прашање бидејќи било

видено дека таа мутација влијае на нормалното ниво на прикажување во другите алели (18).

Покрај тоа, за полесна комуникација кога се работи со амбигвитетни резултати, во употреба е систем од шифри кој го воспоставила и го ажурира биоинформатичката група на Националниот американски регистар (National Marrow Donor Program / Be The Match) и се нарекува NMDP алелски код (37). NMDP-кодот претставува комбинација од 2 до 5 букви кои се однесуваат на одредена комбинација на алели, кои се добиени со тестовите со средна резолуција во рамките на една алелска група. Врз основа на тоа е можно да се исклучат несоодветните дарители од натамошното пребарување, а со тестовите со висока резолуција се докажува кој алел е присутен од алелите во NMDP-кодот.

1.6. Полиморфизам на ХЛА

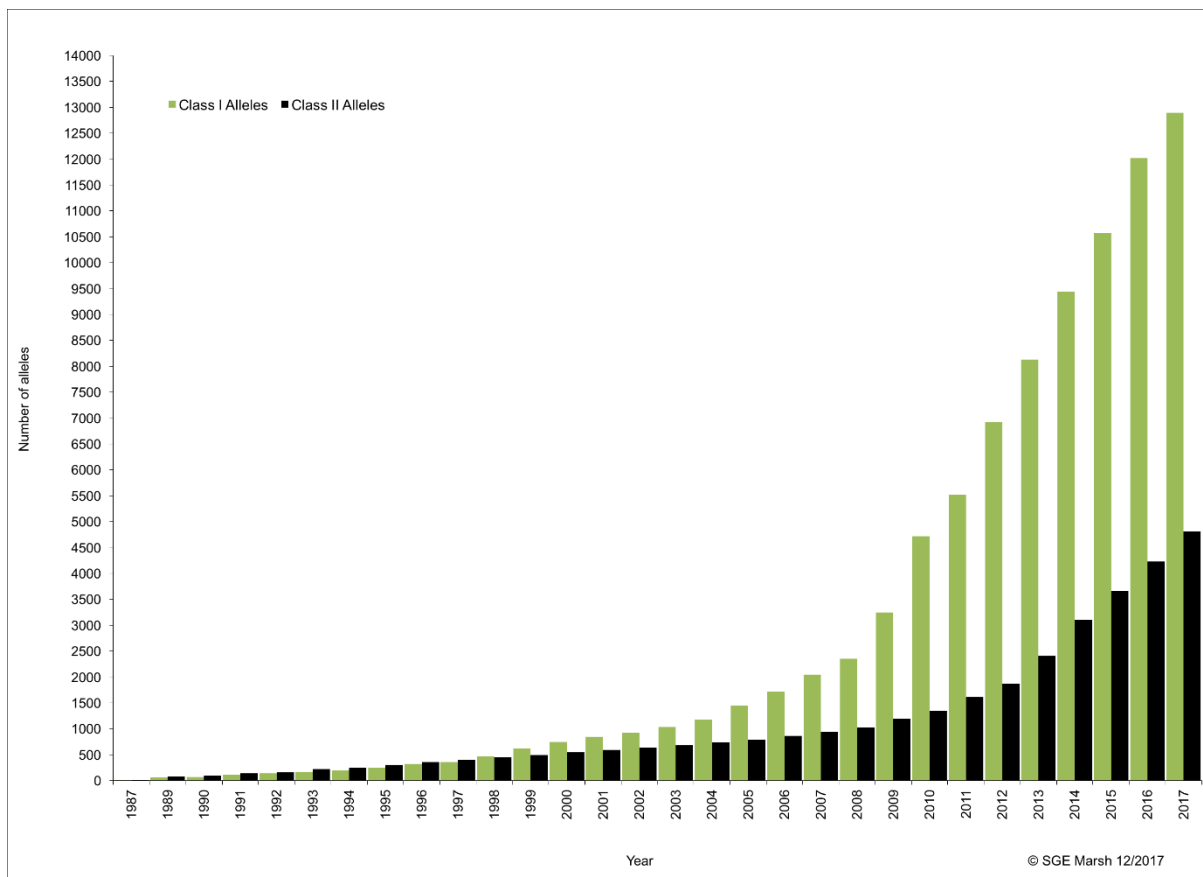
Една од најважните и најосновните карактеристики на ХЛА-системот е неговиот голем полиморфизам (35, 38). Полиморфизам претставува постоење на два или повеќе алели на еден ген во популацијата со фреквенција поголема од 1 % .

Екстремниот полиморфизам на ХЛА е последица на селекцијата посредувана од патогени и претставува предност во еволутивната борба за преживување и опстанок на видот (35, 39). Во ревијалниот труд на Spurgin (39) се опишани три механизми кои, одвоено или во комбинација, водат до селекција посредувана од патогени и одржување на високиот полиморфизам на ХЛА: предност на хетерозиготите, предност на ретките алели и флукуирачка селекција. Механизмот кој се заснова на предноста на хетерозиготите претпоставува дека единките кои се хетерозиготи за ХЛА локусите се во состојба да одговорат на поголем опсег на патогени пептиди отколку хомозиготите и заради тоа имаат поголема резистентност на патогени. На тој начин хетерозиготите се во селективна предност во однос на хомозиготите и одржуваат поголем број алели во популацијата (балансна селекција). Од друга страна, постои и селекција на патогените, односно приспособување на патогените, која настанува за да се надмине отпорноста на домаќините. Хипотезата за предноста на ретките алели подразбира дека секој нов алел кој се појавува во популацијата, веројатно, ќе овозможи поголема заштита од патогени во однос на честите алели и така ќе има селективна предност. Со варирањето на честотата на алелите и отпорноста на патогените се одржува разновидноста на ХЛА. Тоа не ја исклучува хипотезата за селекција на хетерозиготи бидејќи хетерозиготот може да биде во селективна предност затоа што содржи и редок алел. Хипотезата за флукуирачка селекција претпоставува дека разновидноста на ХЛА се одржува поради временската и просторната разновидност на видот и количината на патогените. На функционално ниво, полиморфизмот на ХЛА е веројатно помал поради фактот дека постои преклопување на репертоарот на пептидите за пептид-врзувачките места на ХЛА-молекулите (39).

Изучувањето на механизмите на разновидност на ХЛА во почетокот се засновале на еволутивните теории на селекција, а потоа на изучување на селекцијата во рамките на една генерација или еден еколошки период. Во микро-еволуциска смисла, миграциите би можеле да бидат поважни во обликувањето на ХЛА полиморфизмот од

селекцијата на патогени. Заради големото различие, популационите студии на ХЛА алелите се користени за изучување на хуманата демографија и овозможуваат увид во историските и еволуционите врски меѓу современите популации. Метаанализите на алелското различие во популациите докажуваат дека одржувањето на нови и нискофреквентни алели е многу почесто отколку што би се очекувало во моделот на неутрална еволуција (40). Со анализа на ХЛА полиморфизмот можно е да се следат миграциите на хуманите популации со оглед на тоа дека е покажано дека генетската дистанца помеѓу популациите на основа на честотата на ХЛА корелира со нивното географско потекло (41, 42). Во поширока смисла, сложеноста на ХЛА полиморфизмот е последица на постоењето на поголем број генски локуси, на голем број алели за повеќето гени и комбинација на продуктите на овие алели (35, 38).

Во IPD-IMGT/HLA databazата се складирани податоци за 17.874 алелски секвенци (јануари, 2018) (18). Со развојот на новите молекуларни техники на ХЛА-типизацијата, како и постојаниот раст на зачленети доброволни дарители во Дарителските регистри ширум светот, секоја година се зголемува бројот на новооткриени алели (Слика 4).



Слика 4. Број на алели именувани и складирани во IPD-IMGT/HLA databazата (преземено од <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html>)

Анализата на дистрибуцијата на алелите во популациите покажала дека некои алели се глобално распространети, како HLA-A*02:01 кој е најчест кај европските

популации додека HLA-A*02:03 е присутен само кај популациите на Југоисточна Азија. Исто така, полиморфизмот на ХЛА се гледа и во фактот дека за некои групи на алели е докажан поголем број на алели кои се чести кај повеќе популации, додека кај некои чести групи на алели постои доминантен алел кај повеќето популации (40, 42, 43).

Американското здружение за хистокompatibilност и имуногенетика (ASHI) го создало каталогот на чести и добро-документирани алели (Common and well-documented – CWD) со цел идентификување на алелите кои требало да бидат решени со надворешната контрола (44). Алелите се распоредени во две категории: чести и добро-документирани. Во групата на честите, спаѓаат алелите чијашто фреквенција е позната и постојат доволно податоци кои укажуваат на нивното присуство и честота. Со консензус е прифатено дека во оваа категорија се сместени алели кои имаат фреквенција $>0,1$ % во популација од најмалку 1500 испитаници. Во добро-документирани ХЛА алели се вбројуваат алелите кои не се глобално распространети, но нивното присуство е докажано во повеќе студии. Понекогаш се означуваат и како ретки алели. Алелите се сместуваат во групата на добро-документирани ако се докажани со методот на секвенционирање кај пет несродни лица или во три хаплотипови на несродни лица. Во ажурираната верзија од 2016 година, од работната група на Европската федерација за имуногенетика се докажани 236 чести и 812 добро-документирани алели за локусите HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и -DPB1 (45). Според EFI чести се оние алели за кои се откриени три копии кај најмалку три различни популации, а добро-документирани се оние за кои се откриени најмалку 5 копии кај сите популации. Ретки алели се оние кои се репортирани 2 – 4 пати, а многу ретки – само еднаш.

1.6.1. Врзана нерамнотежа на ХЛА алелите

За ХЛА-системот е карактеристична врзаната нерамнотежа (linkage disequilibrium – LD), односно одредени алели од два локуси се појавуваат заедно во ист хаплотип многу почесто или поретко отколку што би се очекувало според фреквенцијата на алелите во популацијата (35, 46). Фреквенцијата на генот HLA-A1 во европската популација изнесува 0,15, а на генот кој го кодира HLA-B8 е 0,10, па би се очекувало дека хаплотипот кој ги содржи овие две алели има фреквенција од 1,5 % (0,15 x 0,10). Но, во хаплотипот HLA-A1-B8 кај белците е застапен со фреквенција од 7 до 8 % (19, 35). Популационите студии покажале дека постои врзана нерамнотежа помеѓу алелите од локусите HLA-DRB1 со алелите од локусите HLA-DQB1 и HLA-DQA1, како и алелите од локусите HLA-B и HLA-C (42). Врзаната нерамнотежа меѓу алелите од различни локуси укажува на еволутивната поврзаност на ХЛА алелите, а познавањето на поврзувањето на ХЛА алелите во хаплотипот има практично значење при пронаоѓањето на дарител за трансплантација на ХМК.

Врзаната нерамнотежа се изразува нумерички со вредноста D, која претставува разлика помеѓу добиената и очекуваната фреквенција на хаплотипот и со вредноста D` (35, 47). Со оглед на фактот дека на честотата на хаплотиповите влијае и големината на

испитуваната популација, прифатливо е D` да се прикажува за хаплотипови кои се составени од алели со фреквенција поголема од 0,05 % (48).

Бројот на хаплотипови во хуманата популација е помал отколку што би можело да се очекува со оглед на бројот на алели и појавата на рекомбинации внатре во ХЛА регионот (33, 49, 50), а хаплотиповите имаат различна фреквенција во различни етнички групи. Хаплотиповите кои носат заштитни ХЛА за одредена болест очекувано се почести во ендемските подрачја (49).

1.6.2. Значењето на полиморфизмот во популационите студии

Постојат бројни трудови каде што се прикажани фреквенциите на алелите и хаплотиповите во различни популации и етнички групи, а Middleton и соработниците (43, 51) ги обединиле објавените податоци во единствена база на податоци која е достапна на www.allelefrequencies.net и претставува основен извор на информации за географската дистрибуција на ХЛА алелите и хаплотиповите (40, 51, 52).

Популацијата може да биде дефинирана по етничката припадност кај географски и/или социолошки изолирани испитаници. Меѓутоа, заради миграциите, поголемиот број на современи популации се состои од мешавина на различни популации (53). Кога се испитува фреквенцијата на алелите и хаплотиповите во одредена популација многу е важно да се дефинира испитуваната група во поглед на географското потекло, начинот на прибирање на испитаниците и бројот на испитаници (54). Неопходен предуслов за да можат податоците од фреквенцијата на ХЛА алелите да се користат за споредба со други популации е да се испита дали популацијата се наоѓа во Hardy-Weinberg-ова рамнотежа (46, 54).

Сè уште не е јасно дефиниран минималниот број на испитаници кои се потребни за да се процени значајноста на појавувањето на ХЛА алелите (54). За одредување на ХЛА полиморфизмот во одредена популација најчесто се користат податоците за ХЛА-типизацијата од регистрите на доброволни дарители на матични клетки бидејќи содржат голем број испитаници (40, 54, 55). Честотата на хаплотиповите во ваквите студии се добива со статистичките методи за проценка на веројатноста за појава на одреден хаплотип (maximum likelihood estimation) врз основа на честотата на добиените алели во истата популација (47).

Познавањето на фреквенцијата на алелите и хаплотиповите во одредена популација има практично значење при пронаоѓањето на дарител за трансплантација на ХМК, како и за планирање на стратегијата на националните регистри на доброволни дарители на матични клетки (56, 57). Исто така, разликите во алелските и хаплотипските фреквенции помеѓу различните популации и етнички групи се користат за подобро разбирање на асоцијацијата на одредени ХЛА алели и некои болести (58, 59).

1.6.3. Асоцијација на ХЛА со болестите

ХЛА алелите се здружени со неколку стотици болести, поголемиот број автоимуни болести што е опишано во повеќе ревиски трудови (14, 58, 60). Големиот

полиморфизам на ХЛА, изразената врзана нерамнотежа на гените во ХЛА, како и фактот дека на етиопатогенезата на овие болести влијаат и други генетски варијанти, не даваат можност во целост да се востанови молекуларниот механизам кој лежи во основата на асоцијацијата на болестите со ХЛА.

Во основата на автоимуните болести лежи активацијата на Т-лимфоцитите од страна на ткивно специфичните автопептиди презентирани во склоп на ХЛА-молекулите. Меѓутоа, кај поголемиот број автоимуни болести не е познат автоантигенот кој е релевантен за појава на болестите (59, 60). Исто така, заради хетерогеноста на автоимуните болести, веројатно различни адели или комбинација на адели од различни локуси можат да влијаат на појавата на одредени форми на болестите.

Степенот на асоцијација на ХЛА со одредени болести се изразува како релативен ризик (RR) кој се пресметува според формулата $a \times d / b \times c$ каде што a е бројот на заболени лица кои го имаат испитуваниот алел, b е бројот на заболени кои го немаат испитуваниот алел, c е бројот на здрави лица кои го имаат испитуваниот алел и d се здрави лица кои го немаат испитуваниот алел (61).

Познавањето на релативниот ризик на ХЛА за одредени болести и анализата на ХЛА полиморфизмот како заштитен или фаворизирачки фактор во етиопатогенезата, има примена во дијагностиката на некои болести. Таков пример е болеста целијакија. Повеќе од 90 % од болните со целијакија имаат HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (антиген HLA-DQ2) или HLA-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (антиген HLA-DQ8) (59). Кај деца кои имаат клиничка слика на целијакија, ИГА антитела кон ткивната транслугтаминаза и докажан HLA-DQ2 или HLA-DQ8 не е неопходно да се прави цревна биопсија за да се постави дијагнозата, и на тој начин се избегнуваат потенцијалните компликации од биопсијата на цревата, како што наведува Howell во неговиот ревиски труд, а според препораките на Европското здружение за педијатриска гастроентерологија, хепатологија и хутриција (58).

Висок релативен ризик е откриен и кај анкилозирачки спондилитис (АС) и HLA-B27. Повеќе од 95 % од болните со АС имаат HLA-B27 (алелите HLA-B*27:05, B*27:02, B*27:04 и B*27:07), во споредба со здравата популација каде што HLA-B27 го имаат 10 % од лицата (59). Ревматоидниот артритис е автоимуна болест со мултифакториелна патогенеза за која меѓу другото е откриена позитивна поврзаност со следниве ХЛА адели: HLA-DRB1*04:01, DRB1*04:04, DRB1*04:05, а во помал обем HLA-DRB1*01:01 и DRB1*14:02 (58, 62).

Покрај асоцијацијата со болести, ХЛА полиморфизмот е поврзан и со бројни тешки, понекогаш и фатални реакции на преосетливост на лекови. На пример, кај болните со HIV-1 инфекција кои имаат HLA-B*57:01 постои релативен ризик >500 за хиперреактивност на лекот абакавир, антиретровирусен лек кој се користи во терапијата (58). Заради тоа, водичите за терапија на болните со СИДА препорачуваат ХЛА-типизација кај болните пред почетокот на терапијата со абакавир (58, 63).

1.7. ХЛА-типизација

Одредувањето на антигените и алелите во ХЛА-системот, односно ХЛА-типизацијата, се работи со серолошки и со молекуларни тестови. Со помош на серолошките тестови се одредува фенотипот, односно антигените на површината на клетките, со користење на соодветни тест-серуми, додека со молекуларните тестови се одредува генотипот, односно ХЛА алелите (64). Во последниве години, серолошките тестови се скоро во целост заменети со молекуларната типизација.

1.7.1. Серолошка ХЛА-типизација

За одредување на ХЛА антигените се користи микролимфоцитотоксичниот тест (complement dependent cytotoxicity assay – CDC) кој се заснова на лиза на испитуваните лимфоцити по врзувањето на специфичните анти-ХЛА антитела во присуство на комплемент (64, 65). За ова испитување се користат лимфоцити од периферната крв, но и лимфоцити добиени од лимфниот јазол или од слезенката. Тест-серумите се добиваат од имунизирани лица, првенствено повеќеротки, или се користат моноклонски антитела. Лимфоцитната суспензија се додава во микроплочата со тест-серуми, а по инкубацијата со комплемент и додавање на витална боја се проценува интензитетот на реакцијата од односот на живи и мртви клетки (65). На резултатот од серолошките тестови влијае вијабилноста на клетките и прикажувањето на антигенот на површината на клетките, како и специфичноста на антителата кои се користат. При споредбата на тестовите за серолошка и молекуларна типизација е видно дека грешките во серолошкото типизирање се и до 20 % како последица од неможноста да се дефинира антиген ('blank') или да се одреди поттипот заради недостатокот на тест-серуми со ретка специфичност. Причината се должи на фактот што полиморфизмите на ХЛА во најголем дел се локализирани во пептид-врзувачкото место на ХЛА-молекулата кое не е достапно за антителата. Највисоко ниво на дискрепанца во резултатите од серолошките и од молекуларните тестови е најдено во HLA-C-локусот бидејќи со серолошките тестови не е можно да се докаже присуството на повеќето HLA-C антигени (66 – 68). Најголемо несогласување во резултатите е добиено за серолошката типизација на примероци од хематолошки болни и понекогаш точна серолошка типизација била можна само врз основа на типизацијата на членовите од фамилиите. Поради недоволниот број или лошиот квалитет на клетките кај овие болни во некои случаи не е можно да се направи ХЛА-типизација со серолошки тестови. Тоа укажува на предноста на методите за молекуларна типизација (64, 67, 69).

1.7.2. Молекуларна ХЛА-типизација

Молекуларната ХЛА-типизација се заснова на полимеразно-верижната реакција (ПВР) која лежи во основата на повеќе молекуларни техники. Најчесто користени во секојдневната лабораториска практика се хибридизацијата на ДНК-секвенците со специфични олигонуклеотидни проби (Sequence specific oligonucleotide probes – SSO), секвенчно-специфични прајмери (Sequence specific primers – SSP) со детекција на различната електрофоретска подвижност на ПВР-продуктите на гел електрофореза и секвенционирање на нуклеотидите (sequence based typing – SBT) (12, 64, 70 – 73). Иако овие методи користат различни пристапи за идентификација на ХЛА-полиморфизмите,

сите се ограничени со постоењето на нејасни или двосмислени резултати (ambiguity). Двосмислените резултати се појавуваат кога методот не може да ги детектира сите нуклеотиди кои се важни за дефинирање на алелот (како кај SSO и SSP) или кога полиморфизмот е локализиран надвор од регионот кој се секвенционира (како кај SBT).

Резултатите од ХЛА-типизацијата можат да бидат со алелска резолуција, висока, средна и ниска резолуција (52, 54). Алелската резолуција (allelic resolution) подразбира резултат од ДНК-типизацијата што одговара на единечен алел според последната номенклатура (74) (на пример, HLA-A*02:01:01). Високата резолуција (high resolution) е дефинирана како сет алели кои ја специфицираат и кодираат истата протеинска секвенца за пептид-врзувачкиот регион на ХЛА-молекулата. На овој начин ХЛА алелите се дефинирани на резолуциско ниво второ поле (2nd field), порано 4 цифри (4 digit) или повеќе (пример, HLA-A*02:01). Овој резултат се добива со идентификување на полиморфизмите лоцирани во егзоните 2 и 3 за ХЛА класа 1 и егзонот 2 за ХЛА класа 2 локусите. Ниската резолуција (low resolution) подразбира резултат од ДНК-типизација на ниво на првото поле (first field), порано 2 цифри (2 digits), односно одредување на алелската група (HLA-A*02).

Средната резолуција (intermediate resolution) е дефинирана како ДНК базирано типизирање кое вклучува потсет на алели кои ги делат цифрите во првото поле од нивното алелско име (HLA-A*02:01/02:02/02:05). Овој термин е воведен заради постојанорастечкиот број на ново откриените алели и неговата практична примена при изборот на дарители за трансплантација на ХМК. Исто така, резултатите од типизацијата со алелска резолуција можат да се прикажат и како група P и група G алели. Алелите кои имаат иста нуклеотидна секвенца во егзоните кои го кодираат пептид-врзувачкото место се распоредуваат во групата G. Алелите кои имаат идентична полипептидна секвенца во домените кои го сочинуваат пептид-врзувачкото место се распоредуваат во групата P (44, 74, 75). Познавањето на припадноста на алелот во одредена група има практично значење при изборот на соодветни дарители за трансплантација на ХМК. Бидејќи разликите во два алела кои припаѓаат на иста G или P група се наоѓаат надвор од пептид-врзувачкото место, несовпадливоста заради овие алели нема да има влијание врз исходот од трансплантацијата на ХМК. Така на пример, познато е дека несовпадливоста на алелите во HLA-DRB1 локусот влијае на исходот од трансплантацијата (76, 77), но несовпадливоста која подразбира HLA-DRB1*14:01 и HLA-DRB1*14:54 не влијае на појавата на компликации по трансплантацијата (78). Комитетот за Номенклатура на Светската здравствена организација во 2005 година го дефинирал HLA-DRB1*14:54 како нов алел за кој ретроспективно е покажано дека е трипати почест во популациите, а од HLA-DRB1*14:01 се разликува во само 1 нуклеотид (Т-С) на позиција 51 во егзон 3. Оваа мутација доведува до замена на аминокиселината тирозин со хистидин во $\beta 2$ доменот на DR молекулата на позиција 112. Овој полиморфизам е локализиран во близина на клеточната мембрана, така што нема влијание на врзувањето на пептидот или интеракцијата на ХЛА-молекулите со рецепторот на Т-лимфоцитите. Во студија на 189 парови кои имале несовпадливост HLA-DRB1*14:01/HLA-DRB1*14:54, Pasi и соработниците (78) покажале дека ова несовпаѓање не влијаело на појавата на

компликации кај болните по трансплантација на ХМК од несроден дарител. За алелите HLA-B*44:02 и HLA-B*44:27 кои припаѓаат на истата група HLA-B*44:02P и се разликуваат во секвенцата на нуклеотидите кои го кодираат $\alpha 3$ доменот, со помош на функционални ин витро-тестови е покажано дека овие разлики не се препознаваат од алореактивните CD8⁺ Т-лимфоцити, односно дека овие два алела можат да се распоредат во групата на дозволени несовпадливости (79).

1.8. Значењето на ХЛА во трансплантацијата на ХМК

Алогената трансплантација на хематопоетски матични клетки (ХМК) е прифатлив облик на лечење на бројни хематолошки и онколошки заболувања, болести на имуниот систем и метаболизмот (80). Несовпадливоста во ХЛА локусите е независен значаен фактор кој влијае на инциденцата и тежината на компликациите по трансплантацијата и вкупното преживување на болните. Бројни студии се објавени кои укажуваат на значајноста на ХЛА совпадливоста, а разликите во заклучоците за значењето на поедините локуси во исходот на трансплантацијата се должат на разноликоста на клиничките студии во поглед на големината на примерокот, етничкото потекло на испитаниците, дијагнозата и стадиумот на болеста, изворот на матични клетки, како и различните техники за ХЛА-типизација. Современите препораки за избор на парови за трансплантација (76, 81 – 83) се засновани на резултатите од анализата на влијанието на ХЛА кај голем број болни со направена трансплантација (77, 84 – 86).

1.8.1. ХЛА во изборот на дарители на ХМК

Со развојот на техниките на ХЛА-типизацијата е овозможен напредок во сигурноста на одредување на совпадливоста помеѓу дарителот и примателот на ХМК, но се усложнува постапката на пронаоѓање на дарител поради големиот полиморфизам на ХЛА (76, 87).

1.8.2. Сроден дарител на ХМК

Најдобар дарител за еден болен на кој му е потребна трансплантација на ХМК е неговиот брат или сестра со кои е идентичен во ХЛА. Бидејќи ХЛА гените се наследуваат како хаплотип, а нивното прикажување е кодоминантно, веројатноста браќата и сестрите да се идентични или различни изнесува 25 %, а да се хапloidентични 50 % (19). Хапloidентичните трансплантации од сроден дарител се терапевска опција кај болните кои немаат соодветен совпадлив дарител или доколку степенот на итност не овозможува спроведување на постапката на пронаоѓање соодветен несроден дарител (88 – 90). Заеднички хаплотип подразбира совпадливост не само во главните хистокомпатибилни локуси туку и во други имунолошки релевантни локуси на заедничкиот хаплотип (91, 92). При изборот на хапloidентичен дарител мора да се земат предвид и специфичностите на анти-ХЛА антителата доколку се присутни кај примателот (93, 94).

1.8.3. Несроден дарител на ХМК

Со оглед на фактот дека само околу 30 % од болните имаат соодветен дарител во рамките на фамилијата (76, 95), шансата за останатиот дел од болните е во пронаоѓањето на соодветен несроден дарител, матични клетки од крв од папочна врвца или хаплоидентична трансплантација. Современите критериуми за избор на несроден дарител се засноваат на дефинирањето на алелите со тестовите за висока резолуција на локусите HLA-A, HLA-B и HLA-C од класа 1 и HLA-DRB1 и HLA-DQB1 за класа 2 (76, 81, 96). Совпадливоста во сите пет локуси (10/10) го намалува ризикот од смртност и ризикот за појава на тешката болест калем против домаќинот и е здружена со подобро преживување без болест во споредба со трансплантациите од несовпадлив дарител (96). Совпадливоста на ниво на висока резолуција за локусите HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1 (8/8) е минимално ниво на совпадливост здружено со подобро преживување и е препорачано од NMDP (81, 97 – 99).

Кога за еден пациент не е можно да се пронајде потполно идентичен дарител, несовпадливоста во еден алел се смета за прифатлив ризик за појава на смртност поврзана со трансплантацијата (82, 96). При изборот на дарител е важно познавањето на исходот од трансплантацијата во однос на несовпадливоста во поедини локуси, како и разликите во значењето на алелските и антигенските несовпадливости. Fernandez-Vina (92) ги класифицира ХЛА локусите во две групи во однос на значењето кое го имаат во исходот од трансплантацијата. HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1 локусите имаат високо ниво на прикажување на антигенот на површината на клетките и се многу поврзани со исходот од трансплантацијата, додека HLA-DRB3/4/5, HLA-DQ и HLA-DP се локуси со ниско ниво на прикажување.

Несовпадливоста во HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1 локусите е здружена со неповолен исход од трансплантацијата (76, 83, 84, 86, 96), односно несовпадливоста и на ниво на алели и на ниво на антигени ќе има еднакво влијание врз појавата на компликации по трансплантацијата. Постојат докази и за конкретни аминокиселински супституции кај несовпадливите алели кои влијаат на исходот од трансплантацијата. Така на пример, покажано е дека несовпадливоста помеѓу дарителот и примателот во алелите HLA-A*02:01 и A*02:06 е може ризик-фактор за појава на тежок облик на акутната болест калем против домаќин и поголема смртност, додека несовпадливоста помеѓу A*02:01 и A*02:05 може да се толерира (100). Испитувањата со ин витро-тестови покажале дека истиот пептид во жлебот за врзување на антигенот кај B*44:02 и B*44:03 може да има различна ориентација, а таа разлика можат да ја препознаат Т-лимфоцитите и може да има клиничко значење (101).

За HLA-C локусот е потврдено дека антигенската несовпадливост има неповолно влијание на појавата на компликации, но и понатаму е спорно значењето на несовпадливоста во HLA-C локусот (77, 83, 84, 86, 102). Причината за тоа може да биде фактот дека HLA-C молекулите се лиганди за инхибиторните рецептори на клетките природни убијци (КПУ). Инхибиторните рецептори на КПУ кои се врзуваат за ХЛА класа 1 молекулите се наречени КИР (killer immunoglobulin-like receptor – KIR). Отсуството на одреден ХЛА лиганд на клетките води до активација на КПУ (103 –

105). HLA-C-алелите се распоредуваат во две групи во однос на присуството на аминокиселината Asn80 (група C1) или Lys80 (група C2). Во зависност од HLA-C алелите кај примателот, се потенцира активирачката или инхибиторната активност на КПУ на дарителот. Од тоа ќе зависи дали ќе се постигне заштитен ефект на појавата на релапс на леукемија и намалена смртност. Голем ризик за неповолен исход од трансплантацијата има алелската несовпадливост помеѓу дарителот и примателот во група C1 и совпадливоста во група C2 на алелите од HLA-C-локусот (106, 107). Покрај позицијата на несовпадливи аминокиселини и нивото на прикажување на несовпадливиот HLA-C алотип, кај пациентот може да влијае врз исходот од Т-клеточното алопрепознавање, со постоење на можни дозволени несовпадливости кај пациентите со C-алели со ниско прикажување (108).

Претходните сознанија (77) дека алелската несовпадливост во HLA-B или HLA-C локусите подобро се толерира отколку во локусите HLA-A и HLA-DRB1 не се доволно потврдени во други понови студии (82).

ХЛА локусите со ниско прикажување (HLA-DRB3/4/5, HLA-DQ и HLA-DP) имаат помало генско различие, но можат да предизвикаат алореактивност ин витро (92). Меѓутоа, изолираната несовпадливост на овие локуси врз исходот од трансплантацијата е занемарлива или тешко се докажува заради тоа што постои и изразена врзана нерамнотежа меѓу алелите од блиските локуси. Повисок морталитет е забележан ако постои несовпадливост во HLA-DQ локусот, како и здружена несовпадливост во локусите со ниско прикажување со веќе присутна несовпадливост во други локуси (76, 83, 109). Несовпадливоста во HLA-DPB1 може да предизвика алореактивен одговор на Т-клетките што води до акутна болест калем против домаќин, но воочен е и корисен ефект во намалувањето на ризикот од релапс на леукемијата (110). Заради тоа HLA-DP алелите се поделени во групи во однос на епитопите кои ги препознаваат алореактивните Т-клетки што овозможува разликување на дозволени и недозволени несовпадливости за HLA-DPB1 (111, 112).

1.8.4. Матични клетки од крв од папочна врвца

Употребата на матични клетки од крв од папочна врвца како извор на ХМК има предност затоа што се лесно достапни, нема ризик за дарителот, има помала веројатност за пренесување на болести, а типизираната единица умбиликална крв може да се чува во замрзната состојба (113). Најголемо влијание за исходот од трансплантацијата на матични клетки од папочна врвца има бројот на CD34⁺ клетки, а заради незрелоста на имуниот систем на дарителот прифатливо е едно или две несовпаѓања (76, 113). Совпадливоста се однесува на HLA-A и HLA-B локусите со тестови со ниска резолуција и за HLA-DRB1 со висока резолуција (76). Поновите препораки (82) ги вклучуваат и останатите локуси, како и типизација со тестови за висока резолуција на примерокот крв од папочна врвца и одредување на мајчините ХЛА (114, 115). Толеранцијата која се стекнува во текот на феталниот развој на ненаследените мајчини антигени (non inherited maternal antigens – NIMA) придонесува да биде прифатлива несовпадливоста која се однесува на NIMA (NIMA совпадливост). Поновите студии покажале дека трансплантациите со NIMA совпадливи единици крв

од папочна врвца и покрај ХЛА несовпадливоста, биле здружени со подобро севкупно преживување на болните и помал степен на релапс на болеста (82, 114, 115).

1.8.5. Регистар на доброволни дарители на ХМК

Заради големиот полиморфизам на ХЛА гените и малата веројатност за пронаоѓање на идентичен дарител во фамилијата на пациентот, овозможено е барање на соодветен дарител во рамките на Дарителските регистри. Дарителски регистар за коскена срцевина претставува листа за ткивниот тип (ХЛА-типизација) на здрави доброволци кои се согласиле да бидат потенцијални дарители на матични клетки. Идејата за формирање на Дарителски регистри во светски рамки се појавила во 70-тите години од минатиот век. Во тие години, во Велика Британија било родено момчето Ентони Нолан, кое страдало од реткиот Вискот-Олдричов синдром. Единствениот познат лек бил трансплантација на матични клетки од дарител со компатибилен ткивен тип. Наоѓањето на таков дарител не било лесна работа. Мајката на Ентони, Ширли Нолан, ја насочила својата енергија кон создавање на систем за собирање на информации за ткивниот тип на лицата и нивното чување, во облик кој ќе овозможи лесно наоѓање на соодветен дарител за пациентите на кои им е потребна трансплантација. На тој начин, започнала работата на Дарителските регистри. Базите на податоци за ХЛА-типизацијата од националните регистри на доброволни дарители на ХМК, како и банките за крв од папочна врвца се обединети во единствена база Светски регистар на дарители на коскена срцевина (Bone Marrow Donors Worldwide – BMDW). Тој е формиран во 1989 година, со седиште во Лајден, Холандија. BMDW претставува најголема светска база на хематопоезиски клетки во која се наоѓаат податоци од ХЛА-типизацијата достапни за пребарување за повеќе од 29,5 милиони дарители на матични клетки и 721.289 единици крв од папочна врвца (2.2.2018 година), од 75 регистри на коскена срцевина од 53 земји и 53 банки на крв од папочна врвца од 36 земји (<https://statistics.wmda.info/>). Функционирањето на Регистрите на глобално ниво е дефинирано со стандардите на WMDA (World Marrow Donor Association) која има за цел меѓународна соработка во размената на висококвалитетни ХМК за потребите на клиничката трансплантација ширум светот и промовирање на интересите на дарителите (116 – 120). На 1.1.2017 година BMDW се спои со NetCord и стана сервис на WMDA.

Македонскиот регистар на доброволни дарители на коскена срцевина (МКДРКС) е формиран во 2010 година на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје. Од 2012 година тој е член на BMDW и има пристап до базата на податоци на Светскиот регистар, со што е овозможено пребарување на потенцијални, совпадливи дарители за пациентите од нашата земја.

Шансата за наоѓање на совпадлив дарител во Светскиот регистар зависи од повеќе фактори како етничката припадност, честотата на ХЛА алелите и хаплотиповите и друго (121). За таа цел, се создадени алатки кои ја пресметуваат веројатноста за пронаоѓање соодветен дарител, Harlogic го користи NMDP од САД и OptiMatch го користи ZKRD од Германија (121 – 124). За планирање на идното лечење може да биде корисно и одредувањето дали ХЛА-типизацијата на болниот спаѓа во

групата со висока веројатност (веројатност над 95 %) за наоѓање на 10/10 алелска совпадливост со дарителот во тек на 6 месеци, група со ниска веројатност (помалку од 5 %) или средна веројатност (121).

На исходот на трансплантацијата, покрај совпадливоста во ХЛА, може да влијаат и нон-ХЛА полиморфизмите и разликите во другите имунолошки релевантни локуси на хромозомот 6. Таквите разлики можат да бидат поизразени кај болните со ретки фенотипови и кога дарителот е со друга етничка припадност. Затоа, пациентите кои се трансплантирани од дарители од Националниот регистар, имаат подобро преживување отколку болните кои добиле ХМК од интернационален дарител (83). Заради тоа, постои препорака според која националната стратегија за развој на регистрите се заснова на национални дарители (125), што влијае и на брзината на пронаѓањето на дарител и на правремената трансплантација.

1.9. Сознанија за ХЛА полиморфизмот во Република Македонија и мотив за изработка на студијата

Значењето на одредувањето на ХЛА хаплотиповите се потврдува со бројните студии кои се објавуваат во последниве години. Притоа е многу важно да се дефинира популацијата кај која се испитуваат хаплотиповите (126 – 132). Во научната јавност се поттикнува дефинирање на хаплотиповите во различните популации и нивно групно анализирање во рамките на некои проекти (54, 133, 134). Целта е да се одреди фреквенцијата на ХЛА алелите и хаплотиповите во различни популации како и да се одреди поврзаноста меѓу различни популации и корелацијата меѓу генските и географските дистанци. Исто така, овие проекти имаа за цел да ги дефинираат стратегиите за работа со ХЛА податоците, а коишто се однесуваат на дефинирањето на популациите и стратегиите за прибирање на примероците, стандардите за ХЛА-типизацијата, чување и анализа на податоците и етичките прашања.

Досега во македонската популација се направени неколку студии кои се однесуваат на алелската и хаплотипската фреквенција на ХЛА алелите. Во однос на ХЛА хаплотиповите направени се две студии. Едната е на 172 индивидуи со претпоставени ХЛА хаплотипови и нивната поврзаност со останатите медитерански популации (125), а во втората студија се испитани хаплотиповите од ХЛА класа 2 (HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP) кај 300 несродни индивидуи (135). Постојат и неколку студии кои се однесуваат само на фреквенцијата на ХЛА алелите во одредени локуси (136 – 138). Досега не постојат објавени податоци за фреквенцијата на фамилијарно дефинираните ХЛА хаплотипови во македонската популација и нивната поврзаност со останатите европски и светски популации.

2. ЦЕЛИ НА ДИСЕРТАЦИЈАТА

Главни цели на оваа докторска дисертација се:

1. Да се утврди фреквенцијата на ХЛА алелите во локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1 кај несродни индивидуи во македонската популација;
2. Да се утврди фреквенцијата на најчестите ХЛА дефинирани хаплотипови во македонската популација (дволокусните, трилокусните и четирилокусните хаплотипови);
3. Да се испита генетската дистанца и поврзаноста на македонската популација со останатите европски и светски популации.

Дополнителни цели се:

1. Да се утврди фреквенцијата на ХЛА алелите во локусите HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQ кај доброволните дарители во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина;
2. Да се утврди фреквенцијата на најчестите ХЛА хаплотипови кај доброволните дарители во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина;
3. Да се направи споредба на фреквенцијата на алелите и хаплотиповите меѓу фамилијарно дефинираниот примерок од македонската популација и доброволните дарители во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1. Испитаници

Во оваа студија анализиравме 2 (две) групи испитаници. Групата 1 (еден) ја сочинуваат 286 здрави, несродни индивидуи со македонска националност. Тие се родители на пациентите испратени на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје, за ХЛА-типизација на локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1 за трансплантација на хематопоеетски матични клетки. Бидејќи е позната фамилијарната историја, испитаниците се со дефинирани хаплотипови. Примероците се собрани во периодот од 1.1.2003 година до 31.12.2016 година.

Групата 2 (два) ја сочинуваат 1.541 здрава индивидуа, кои доброволно станале членови на Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина (МКДРКС). Според националноста, која лично ја навеле во потпишаната согласност, овие испитаници се поделени во неколку подгрупи: 1283 Македонци (православни), 128 Албанци, 76 Македонци муслимани, 21 Турци, 6 Роми, 4 Босанци, 1 Србин и 22 не навеле националност. Во оваа студија ја одредивме алелската и хаплотипската фреквенција во HLA-A, -B, -C и -DRB1 локусите за три подгрупи (Македонци, Албанци и Македонци муслимани), а дополнително се анализирани фреквенциите за HLA-DQA1 и HLA-DQB1 во група од 566 Македонци.

3.2. Анализирани популации

За да се одреди генетската дистанца меѓу македонската популација и другите европски и светски популации, беа користени податоци достапни на веб-страницата на D. Middleton www.allelefrequencies.net, пристапена во јуни, 2017 година (51). Одбрани се популации од Европа и од светот, а за кои имаше достапни податоци за алелската фреквенција во локусите HLA-A, -B и -DRB1. Споредбата е направена со 239.879 испитаници од 30 популации: Срби (n=1.992), Албанци (n=160), Бугари (n=55), Босанци (n=134), Хрвати (n=4.000), Грција_пор7 (n=11.250), Грција_север (n=500), Турција_пор2 (n=228), Словенија_пор3 (n=130), Австрија (n=200), Албанци_Косово (n=120), Италија (n=159.311), Унгарија (n=1.644), Романија (n=348), Германија (n=11.407), Франција_Марсеј (n=1.000), Франција_Лион (n=4.813), Шпанија_Мурсија (n=173), Шпанија_Мајорка (n=407), САД OPTN белци (n=8.525), Велика Британија централно (n=135), Велика Британија север (n=330), Мароко (n=647), Португалија_Лисабон (n=17.420), Португалија_Порто (n=7.937), Русија_Москва (n=2.650), Шведска_пор4 (n=966), Норвешка_пор2 (n=576), Чешка Република Роми_пор2 (n=46) и Бразил Парана белци (n=2.775).

3.3. Примероци

По потпишувањето на информирана согласност, примероците крв од сите испитаници се земени со венепункција, во стерилни епрувети со соодветен антикоагуланс (BD Vacutainer K₂ (EDTA), 10 ml). Примерокот крв беше складиран во фрижидер на 4°C до 7 дена по венепункцијата, а потоа на -20°C.

ДНК беше изолирана од периферните леукоцити со помош на фенол-хлороформниот метод на изолација (139) и со помош на автоматизираниот апарат Duplica Prep, Euro Clone, во согласност со упатството на производителот. Примероците ДНК се складираат во фрижидер на -20°C на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Скопје (140).

3.4. Методи

3.4.1. Изолација на ДНК

Со помош на рачниот метод на изолација на ДНК со фенол-хлороформ од 6 мл крв се добиваат 2 тубички со по 1 мл ДНК во концентрација од 50 до 150 $\mu\text{l/ml}$. Најпрво крвта се префрла во туба од 15 мл и се додава ретикулоцитен раствор за плакнење. По 10 минути мешање на тубите, се центрифугираат 10 минути на 1800 ввм (вртежи во минута) на 4°C , по што се добива талог кој ги содржи клетките. По отстранувањето на супернатантот, на талогот од клетки се додава раствор за лизирање на еритроцитите. Со повторување на постапката на 10-минутно мешање и центрифугирање на тубите, се добива бел талог од леукоцити. На талогот од леукоцити му се додава смеса од: 5 мл СТЕ пуфер, 250 μl 10 % натриум додецил сулфат и 100 μl протеиназа К. Тубите убаво се промешуваат и се оставаат во инкубатор на 37°C преку ноќ за да настане дигестија на леукоцитите. Наредниот ден во тубите се додава еднаков волумен на заситен фенол, се мешаат 10 минути, а потоа се центрифугираат 10 минути на 4000 ввм, на 4°C . Супернатантот се префрла во нова туба и се додава еднаков волумен на смеса од хлороформ-изоамил алкохол. По мешањето и центрифугирањето на примероците, супернатантот се префрла во туба од 50 мл и му се додава апсолутен етанол претходно оладен на -20°C . Добро преципитираната ДНК е во вид на бел конец кој се издигнува на површината на епруветата. Преципитираната ДНК внимателно се префрла во тубичка од 1,5 мл во која се додава 1 мл 70 % етил алкохол и се промешува. Тубичката се центрифугира на 12.000 ввм, 5 минути. Преципитираната ДНК се гледа како бел талог на дното на тубичката. Супернатантот се отстранува и тубичката се остава да се исуши отворена. Во тубичката се додава 1 мл стерилна вода, се промешува и се остава на 37°C преку ноќ за убаво да се раствори. Примероците се складираат на -20°C (139).

Изолацијата на ДНК со помош на апаратот Duplica Prep е автоматизирана постапка, со којашто истовремено се изолира ДНК од 12 примероци со помош на магнетни партикли. Од 250 μl полна крв се добива ДНК во волумен од 200 μl , со концентрација од 20 до 100 $\mu\text{l/ml}$. Во апаратот се поставуваат растворите за лизирање, врзување, плакнење и елуција, а на плочката за работа се поставуваат примероците крв, магнетните партикли и протеиназата. Во целосно автоматизирана постапка, за околу 60 минути се добива примерок ДНК.

3.4.2. ХЛА-типизација

За ХЛА-типизацијата на примероците беа користени два методи со средно ниво на резолуција: методот на реверзна хибридизација (Reverse Line Strip= RLS) и методот на секвенчно-специфични олигонуклеотиди (Sequence Specific Oligonucleotides= SSO).

3.4.2.1. Метод на реверзна хибридизација

За ХЛА-типизацијата на примероците со методот на реверзна хибридизација беа користени китови од INNOGENETICS, Belgium. Постапката беше работена според упатствата на производителот, а накусо таа е следната: типизацијата започнува со PCR амплификација на егзоните 1, 2, 3 и 4 од HLA-A-генот, на егзоните 2, 3 и 4 од HLA-B-генот, на егзоните 2 и 3 од HLA-C и егзон 2 од HLA-DRB1-генот со користење на биотинилирани прајмери. Условите на PCR циклусот беа: 96°C 5 мин.; 5 пати на 96°C 30 сек., 64°C 50 сек. и 72°C 50 сек.; петпати на 96°C 30 сек., 62°C 50 сек. и на 72°C 50 сек., десетпати на 96°C 30 сек., 60°C 50 сек. и 72°C 50 сек.; петнаесетпати на 96°C 30 сек., 55°C 50 сек. и на 72°C 50 сек. и крајна елонгација на 72°C 10 минути. По проверката на успешноста на амплификацијата на 2 % агарозен гел обоен со етидиум бромид следува хибридизација на обележаните PCR продукти на нитроцелулозни ленти на кои се наоѓаат 44 проби за HLA-A, 67 проби за HLA-B, 28 проби за HLA-C и 62 проби за HLA-DRB1. За детекција на формираните хибриди меѓу биотинилираните продукти и пробите беше користен стрептавидин врзан со алкална фосфатаза. По додавањето на хромоген субстрат на местото на позитивните проби се добиваат виолетови линии. Резултатите беа анализирани со помош на софтверската програма LiRAS™ каде што од позитивните линии со посебен алгоритам се добива бараниот генотип.

3.4.2.2. Метод на секвенчно-специфични олигонуклеотиди

За ХЛА-типизацијата со методот на SSO беа користени китови LABType SSO Typing Tests од ONE LAMBDA, INC, USA. Постапката започнува со PCR амплификација на егзоните 2 и 3 за HLA-A, -B, -C и -DQ и егзонот 2 за HLA-DRB1 со користење на биотинилирани прајмери. Условите за циклирање вклучуваат иницијална денатурација на 96°C 3 мин.; потоа 5-пати 96°C 20 сек., 60°C 20 сек. и 72°C 20 сек.; 30-пати на 96°C 10 сек., 60°C 15 сек. и 72°C 20 сек.; крајна екстензија на 72°C 10 мин. и бесконечно на 4°C. PCR продуктот беше денатуриран и повторно рехибридизиран со комплементарни ДНК проби коњуирани за флуоресцентно обележани микросфери. За детекција на новосоздадените хибриди беше користен R-Phycocerythrin-conjugated Streptavidin (SAPE). Интензитетот на флуоресценцијата на фикоеритринот на секоја микросфера беше детектиран со Luminex200, проточен анализатор. Резултатите за ХЛА-типизацијата беа интерпретирани со помош на софтверската програма Fusion3.0 според инструкциите на производителот.

3.5. Статистичка анализа

Алелската и хаплотипската фреквенција беше пресметана со помош на софтверската програма Arlequin3.5 (141). Hardy-Weinberg-овата рамнотежа беше тестирана со користење на скриена Маркова верига со 1.000.000 чекори долг пристап и

100.000 демеморизирачки чекори, како што е имплементирано во софтверот Arlequin. Два, три и четирилокусните хаплотипови беа пресметани за познатата гаметска фаза. Понатаму, беа пресметани врзаната нерамнотежа (linkage disequilibrium, LD) (D) и релативната врзана нерамнотежа (relative linkage disequilibrium) (D') за секој пар на локуси А и В, како што е претходно опишано (142), по следниве формули:

$$D = x_{11} - p_1q_1$$

каде што p_1 и q_1 се фреквенцијата на алелеот A_1 и B_1 , додека x_{11} е добиената честота на A_1B_1 хаплотипот;

$$D' = \frac{D}{D_{max}}$$

каде што D_{max} има една од следниве вредности:

$$\min(p_1q_1, p_2q_2) \text{ кога } D < 0$$

$$\min(p_1q_2, p_2q_1) \text{ кога } D > 0$$

при што p_2 и q_2 се фреквенцијата на алелите A_2 и B_2 . Вредноста 0 за D' укажува дека испитуваните локуси се независни едни од други, додека вредноста 1 покажува комплетна зависност на испитуваните локуси.

Хаплотипската фреквенција за дарителите во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина беше пресметана со користење на Expectation-Maximization (EM) алгоритмот за непозната гаметска фаза, кој е имплементиран во Arlequin софтверот.

Македонската популација беше споредена со 30 популации од целиот свет со пресметување на Nei's генетската дистанца (143) за локусите HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1 и беше конструирано бескоренесто стебло со користење на Neighbour-Joining методот (144) имплементиран во софтверот Phylip. Дендрограмот беше конструиран со помош на TreeView. Исто така, беше пресметана и вредноста за F_{st} и p -вредноста за локусите HLA-A; HLA-B и HLA-DRB1 со помош на софтверот Arlequin. F_{st} е директно поврзан со варијацијата со алелската фреквенција меѓу популациите и спротивно на степенот на сличност меѓу индивидуите во популациите. Ако вредноста за F_{st} е мала (0 и негативна) значи дека не постои генетска субдивизија меѓу популациите, а ако е голема (1) значи дека двете споредени популации се различни.

Споредбата на алелските фреквенции помеѓу група 1 (Македонци со дефинирани хаплотипови) и група 2 (Македонци од МКДРКС) и статистичката значајност беше одредена со помош на χ^2 тестот, додека Fisher-овиот егзактен тест беше користен кога вредностите беа помали од 5. За статистички значајна беше сметана вредноста за $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Анализа на ХЛА алелите и хаплотиповите кај група 1

Алелските групи се прикажани како резултати со ниска резолуција. Во групата 1 анализирани се 286 индивидуи со дефинирани хаплотипови за локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1. Во оваа група се анализирани Hardy-Weinberg-овата рамнотежа, фреквенцијата на алелските групи, два, три и четирилокусните хаплотипови и генетската дистанца меѓу македонската популација и 30 светски популации.

4.1.1. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа

Испитуваната група е во Hardy-Weinberg-ова рамнотежа за сите испитувани локуси ($p > 0,05$). Вредностите за набљудуваната и очекуваната хетерозиготност и p вредноста за локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1 се прикажани на Табела 1.

Табела 1. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа за четирите испитувани локуси во група 1.

ХЛА локус	Број на индивидуи	Број на идентификувани алелски групи	Набљудувана хетерозиготност	Очекувана хетерозиготност	p -вредност	S.D.
A	286	18	0,88811	0,85708	0,68125	0,00026
B	286	26	0,90559	0,90999	0,94459	0,00012
C	286	13	0,87413	0,85244	0,12552	0,00026
DRB1	286	13	0,88811	0,87041	0,80615	0,00021

S.D. (стандардна девијација)

4.1.2. Фреквенција на ХЛА алелските групи

Фреквенцијата на HLA-A алелските групи кај испитаниците од група 1 е прикажана на Табела 2. Кај македонската популација се идентификувани 18 различни алелски групи од кои 14 имаат фреквенција поголема од 1 % . Најчести алелски групи кај македонската популација се: HLA-A*02 (29 %), HLA-A*24 (13,8 %), HLA-A*01 (12,5 %) и HLA-A*03 (10,1 %). На нив отстаѓаат околу 65,5 % од сите HLA-A аели во примерокот. Останатите алелски групи имаат фреквенција помала од 10 % . Кај испитаниците не се идентификувани следниве алелски групи: A*34, A*36, A*43 и A*80.

Табела 2. Фреквенција на HLA-A алелските групи кај испитаниците од група 1 (n=286).

Реден број	HLA-A алелска група	n	Фреквенција	Стандардна варијација
1	A*02	166	0,290210	0,018993
2	A*24	79	0,138112	0,014439
3	A*01	72	0,125874	0,013882
4	A*03	58	0,101399	0,012632
5	A*11	46	0,080420	0,011380
6	A*26	29	0,050699	0,009181
7	A*68	25	0,043706	0,008556
8	A*30	17	0,029720	0,007107
9	A*32	17	0,029720	0,007107
10	A*23	16	0,027972	0,006901
11	A*33	14	0,024476	0,006466
12	A*29	11	0,019231	0,005747
13	A*31	11	0,019231	0,005747
14	A*25	7	0,012238	0,004601
15	A*37	1	0,001748	0,001748
16	A*66	1	0,001748	0,001748
17	A*69	1	0,001748	0,001748
18	A*74	1	0,001748	0,001748

На табела 3 се прикажани фреквенциите на HLA-B алелските групи кај македонската популација. HLA-B е најполиморфниот локус во кој идентификувавме 26 различни алелски групи, од кои најчести се: HLA-B*35 (16,1 %), HLA-B*51 (14,7 %) и HLA-B*18 (14,7 %) на кои отстаѓаат околу 45,5 % . По нив следуваат: HLA-B*44, HLA-B*07, HLA-B*08, HLA-B*40 и HLA-B*27.

Табела 3. Фреквенција на HLA-B алелските групи кај испитаниците од група 1 (n=286).

Реден број	HLA-B алелска група	n	Фреквенција	Стандардна девијација
1	B*35	92	0,160839	0,015374
2	B*51	84	0,146853	0,014813
3	B*18	84	0,146853	0,014813
4	B*44	45	0,078671	0,011267
5	B*07	36	0,062937	0,010163
6	B*08	34	0,059441	0,009895
7	B*40	26	0,045455	0,008717
8	B*27	23	0,040210	0,008221
9	B*38	19	0,033217	0,007499
10	B*13	18	0,031469	0,007306
11	B*14	14	0,024476	0,006466
12	B*39	12	0,020979	0,005998
13	B*49	12	0,020979	0,005998
14	B*52	10	0,017483	0,005485
15	B*55	10	0,017483	0,005485
16	B*57	8	0,013986	0,004914
17	B*37	8	0,013986	0,004914
18	B*41	7	0,012238	0,004601
19	B*15	7	0,012238	0,004601
20	B*58	7	0,012238	0,004601
21	B*56	6	0,010490	0,004264
22	B*53	5	0,008741	0,003895
23	B*50	2	0,003497	0,002470
24	B*47	1	0,001748	0,001748
25	B*48	1	0,001748	0,001748
26	B*78	1	0,001748	0,001748

Во HLA-C генскиот локус идентификувавме 13 различни алелски групи (Табела 4). Најчести HLA-C алелски групи кај македонската популација се: HLA-C*07 (27.9 %), HLA-C*04 (18.3 %) и HLA-C*12 (12.7 %). Тие сочинуваат 58,9 % од сите HLA-C алелски групи во испитуваниот примерок. Само HLA-C*17 е присутен во фреквенција помала од 1 % .

Табела 4. Фреквенција на HLA-C алелските групи кај испитаниците од група 1 (n=286).

Реден број	HLA-C алелски групи	n	Фреквенција	Стандардна девијација
1	C*07	160	0,279720	0,018784
2	C*04	105	0,183566	0,016201
3	C*12	73	0,127622	0,013964
4	C*02	39	0,068182	0,010548
5	C*15	39	0,068182	0,010548
6	C*06	35	0,061189	0,010030
7	C*03	26	0,045455	0,008717
8	C*01	25	0,043706	0,008556
9	C*05	22	0,038462	0,008048
10	C*14	20	0,034965	0,007687
11	C*08	16	0,027972	0,006901
12	C*16	10	0,017483	0,005485
13	C*17	2	0,003497	0,002470

HLA-DRB1 е алелскиот локус од втора класа кој е испитан во група 1 (Табела 5). Откриени се 13 алелски групи, од кои само HLA-DRB1*09 има фреквенција под 0,01. Најголема фреквенција е забележана за следниве алелски групи: HLA-DRB1*11 (25,5 %), HLA-DRB1*16 (14,7 %), HLA-DRB1*15 (9,0 %) и HLA-DRB1*13 (8,5 %).

Табела 5. Фреквенција на HLA-DRB1 алелските групи кај испитаниците од група 1 (n=286).

Реден број	HLA-DRB1 алелски групи	n	Фреквенција	Стандардна девијација
1	DRB1*11	146	0,255245	0,018246
2	DRB1*16	84	0,146853	0,014813
3	DRB1*15	52	0,090909	0,012031
4	DRB1*13	49	0,085664	0,011712
5	DRB1*04	46	0,080420	0,011380
6	DRB1*03	45	0,078671	0,011267
7	DRB1*07	45	0,078671	0,011267
8	DRB1*01	43	0,075175	0,075175
9	DRB1*14	34	0,059441	0,009895
10	DRB1*10	11	0,019231	0,005747
11	DRB1*08	8	0,013986	0,004914
12	DRB1*12	8	0,013986	0,004914
13	DRB1*09	1	0,001748	0,001748

4.1.3. Фреквенција на ХЛА хаплотиповите

Фреквенцијата на дволокусните хаплотипови и вредноста за врзаната нерамнотежа (D') се пресметани за следниве парови на локуси: HLA-A-B, HLA-A-C, HLA-A-DRB1, HLA-B-C и HLA-B-DRB1. Вкупно беа идентификувани 143 HLA-A-B

хаплотипови, а 28 од нив имаа фреквенција поголема од 0,01 и се прикажани на Табела 6. Најчести се: HLA-A*02-B*51 (5,4 %), HLA-A*02-B*18 (4,8 %), HLA-A*01-B*08 (3,3 %), HLA-A*02-B*44 (3,1 %) и HLA-A*02-B*35 и HLA-A*11-B*35 (2,9 %). Во оваа група, највисоката вредност за D' беше забележана за два хаплотипа: HLA-A*33-B*14 (D'=0,71) и HLA-A*01-B*37 (D'=0,71), следени од HLA-A*31-B*51 (D'=0,57).

Табела 6. Фреквенција на HLA-A-B дволокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-B хаплотип	Фреквенција	Стандардна девијација	D'
A*02 B*51	0,054196	0,009475	0,11
A*02 B*18	0,048951	0,009030	0,06
A*01 B*08	0,033217	0,007499	0,50
A*02 B*44	0,031469	0,007306	0,15
A*02 B*35	0,029720	0,007107	-0,36
A*11 B*35	0,029720	0,007107	0,25
A*03 B*35	0,026224	0,006687	0,12
A*24 B*18	0,024476	0,006466	0,04
A*24 B*35	0,024476	0,006466	0,02
A*03 B*18	0,020979	0,005998	0,07
A*02 B*27	0,019231	0,005747	0,26
A*24 B*51	0,019231	0,005747	-0,05
A*03 B*07	0,017483	0,005485	0,20
A*01 B*35	0,017483	0,005485	-0,14
A*33 B*14	0,017483	0,005485	0,71
A*02 B*40	0,015734	0,005208	0,08
A*11 B*51	0,015734	0,005208	0,06
A*02 B*07	0,015734	0,005208	-0,14
A*26 B*38	0,015734	0,005208	0,45
A*31 B*51	0,012238	0,004601	0,57
A*01 B*51	0,012238	0,004601	-0,34
A*68 B*18	0,012238	0,004601	0,16
A*24 B*44	0,012238	0,004601	0,02
A*01 B*18	0,012238	0,004601	-0,34
A*02 B*13	0,012238	0,004601	0,14
A*68 B*35	0,012238	0,004601	0,14
A*23 B*44	0,010490	0,004264	0,32
A*01 B*37	0,010490	0,004264	0,71

Беа идентификувани 111 HLA-A-C хаплотипови и 32 од нив имаа фреквенција поголема од 1 % (Табела 7). Кај македонската популација најчести се: HLA-A*02-C*07 (8.5 %) и HLA-A*01-C*07 (5.2 %). Највисока вредност за D' беше забележана за хаплотипот HLA-A*33-C*08 (D'=0,71).

Табела 7. Фреквенција на HLA-A-C дволокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-C хаплотип	Фреквенција	Стандардна девијација	D'
A*02 C*07	0,085664	0,011712	0,02
A*01 C*07	0,052448	0,009329	0,19
A*24 C*07	0,036713	0,007870	-0,05
A*03 C*07	0,034965	0,007687	0,09
A*02 C*04	0,031469	0,007306	-0,41
A*02 C*02	0,029720	0,007107	0,21
A*02 C*12	0,029720	0,007107	-0,20
A*11 C*04	0,027972	0,006901	0,20
A*03 C*04	0,026224	0,006687	0,09
A*02 C*15	0,026224	0,006687	0,13
A*26 C*12	0,024476	0,006466	0,41
A*24 C*04	0,022727	0,006237	-0,10
A*01 C*06	0,019231	0,005747	0,22
A*02 C*03	0,019231	0,005747	0,19
A*01 C*04	0,019231	0,005747	-0,17
A*03 C*12	0,019231	0,005747	0,07
A*02 C*05	0,017483	0,005485	0,23
A*02 C*06	0,017483	0,005485	-0,02
A*02 C*14	0,017483	0,005485	0,30
A*33 C*08	0,017483	0,005485	0,71
A*68 C*04	0,015734	0,005208	0,22
A*24 C*12	0,013986	0,004914	-0,21
A*24 C*01	0,013986	0,004914	0,21
A*11 C*12	0,013986	0,004914	0,05
A*68 C*07	0,013986	0,004914	0,06
A*11 C*07	0,013986	0,004914	-0,38
A*23 C*04	0,012238	0,004601	0,31
A*24 C*05	0,012238	0,004601	0,21
A*24 C*02	0,012238	0,004601	0,05
A*24 C*03	0,010490	0,004264	0,11
A*23 C*07	0,010490	0,004264	0,13
A*02 C*01	0,010490	0,004264	-0,17

Добиени се 123 можни хаплотипови кои ги формираат алелските групи од локусите HLA-A и -DRB1. На Табела 8 се прикажани 31 хаплотип ($f > 0,01$) на кои отпаѓаат околу 66,0 % од сите HLA-A-DRB1 хаплотипови. Највисока фреквенција беша забележана за следниве хаплотипови: HLA-A*02-DRB1*11 (6,9 %) и HLA-A*02-DRB1*16 (6,29 %), додека хаплотипот HLA-A*33-DRB1*01 има највисока вредност за D' (0,45).

Табела 8. Фреквенција на HLA-A-DRB1 дволокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-DRB1 хаплотип	Фреквенција	Стандардна девијација	D'
A*02 DRB1*11	0,069930	0,010673	-0,05595
A*02 DRB1*16	0,062937	0,010163	0,19493
A*24 DRB1*11	0,048951	0,009030	0,13318
A*01 DRB1*11	0,034965	0,007687	0,03026
A*01 DRB1*03	0,033217	0,007499	0,33902
A*02 DRB1*14	0,029720	0,007107	0,29557
A*02 DRB1*04	0,027972	0,006901	0,08117
A*02 DRB1*13	0,026224	0,006687	0,02242
A*03 DRB1*15	0,022727	0,006237	0,16537
A*03 DRB1*11	0,020979	0,005998	-0,18942
A*02 DRB1*07	0,020979	0,005998	-0,08112
A*11 DRB1*11	0,020979	0,005998	0,00755
A*03 DRB1*16	0,019231	0,005747	0,05017
A*02 DRB1*15	0,017483	0,005485	-0,33735
A*24 DRB1*15	0,013986	0,004914	0,01826
A*24 DRB1*16	0,013986	0,004914	-0,31043
A*11 DRB1*16	0,013986	0,004914	0,03172
A*68 DRB1*13	0,013986	0,004914	0,25629
A*24 DRB1*04	0,013986	0,004914	0,04154
A*24 DRB1*07	0,012238	0,004601	0,02024
A*02 DRB1*01	0,012238	0,004601	-0,43906
A*33 DRB1*01	0,012238	0,004601	0,45936
A*02 DRB1*03	0,012238	0,004601	-0,46399
A*03 DRB1*01	0,012238	0,004601	0,06832
A*01 DRB1*07	0,010490	0,004264	0,00853
A*68 DRB1*11	0,010490	0,004264	-0,05973
A*32 DRB1*11	0,010490	0,004264	0,13118
A*11 DRB1*15	0,010490	0,004264	0,04348
A*26 DRB1*11	0,010490	0,004264	-0,18942
A*26 DRB1*04	0,010490	0,004264	0,13754
A*11 DRB1*01	0,010490	0,004264	0,06429

Исто така беа испитани и HLA-B-C дволокусните хаплотипови и беа забележани 74 различни хаплотипови. Дваесет и седум имаат фреквенција поголема од 1 % (Табела 9), а најчести се HLA-B*35-C*04 (13,9 %), HLA-B*18-C*07 (10,4 %), HLA-B*08-C*07 (5,9 %) и HLA-B*51-C*15 (5,4 %). Пет од овие хаплотипови имаат вредност за D' од 1,00, HLA-B*08-C*07, HLA-B*51-C*14, HLA-B*14-C*08, HLA-B*49-C*07 и HLA-B*56-C*01.

Табела 9. Фреквенција на HLA-B-C дволокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-B-C хаплотип	Фреквенција	Стандардна девијација	D'
B*35 C*04	0,139860	0,014515	0,84
B*18 C*07	0,104895	0,012823	0,60
B*08 C*07	0,059441	0,009895	1,00
B*51 C*15	0,054196	0,009475	0,76
B*07 C*07	0,040210	0,008221	0,50
B*51 C*14	0,034965	0,007687	1,00
B*18 C*12	0,034965	0,007687	0,15
B*27 C*02	0,033217	0,007499	0,81
B*44 C*05	0,033217	0,007499	0,85
B*38 C*12	0,031469	0,007306	0,94
B*13 C*06	0,029720	0,007107	0,94
B*51 C*01	0,026224	0,006687	0,53
B*14 C*08	0,024476	0,006466	1,00
B*40 C*02	0,020979	0,005998	0,42
B*49 C*07	0,020979	0,005998	1,00
B*40 C*03	0,019231	0,005747	0,40
B*44 C*04	0,019231	0,005747	0,07
B*39 C*12	0,017483	0,005485	0,81
B*52 C*12	0,015734	0,005208	0,89
B*51 C*07	0,013986	0,004914	-0,66
B*55 C*03	0,013986	0,004914	0,79
B*57 C*06	0,012238	0,004601	0,87
B*44 C*07	0,012238	0,004601	-0,44
B*37 C*06	0,012238	0,004601	0,87
B*35 C*12	0,010490	0,004264	-0,49
B*07 C*12	0,010490	0,004264	0,04
B*56 C*01	0,010490	0,004264	1,00

Покрај тоа, беше анализиран и HLA-B-DRB1 дволокусниот хаплотип и беа идентификувани 131 хаплотип, од кои 31 се прикажани на Табела 10 (фреквенција поголема од 1 %). Најголема фреквенција имаат хаплотиповите HLA-B*18-DRB1*11 (7,6 %), HLA-B*35-DRB1*11 (5,4 %) и HLA-B*08-DRB1*03 (5,4 %). Највисока вредност за врзаната нерамнотежа беше пресметана за хаплотипот HLA-B*08-DRB1*03 ($D'=0,90$), следена од HLA-B*52-DRB1*15 ($D'=0,78$) и HLA-B*14-DRB1*01 ($D'=0,76$).

Табела 10. Фреквенција на HLA-B-DRB1 дволокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-B-DRB1 хаплотип	Фреквенција	Стандардна девијација	D'
B*18 DRB1*11	0,076923	0,011151	0,36061
B*35 DRB1*11	0,054196	0,009475	0,10972
B*08 DRB1*03	0,054196	0,009475	0,90423
B*51 DRB1*11	0,038462	0,008048	0,00894
B*07 DRB1*15	0,026224	0,006687	0,35833
B*35 DRB1*01	0,026224	0,006687	0,22403
B*18 DRB1*16	0,022727	0,006237	0,22403
B*13 DRB1*07	0,020979	0,005998	0,63820
B*51 DRB1*13	0,020979	0,005998	0,11492
B*51 DRB1*04	0,020979	0,005998	0,13364
B*44 DRB1*07	0,019231	0,005747	0,17993
B*14 DRB1*01	0,019231	0,005747	0,76830
B*51 DRB1*16	0,019231	0,005747	-0,10828
B*27 DRB1*16	0,017483	0,005485	0,33749
B*44 DRB1*16	0,015734	0,005208	0,06230
B*39 DRB1*16	0,013986	0,004914	0,60929
B*51 DRB1*14	0,013986	0,004914	0,10366
B*35 DRB1*14	0,013986	0,004914	0,08873
B*44 DRB1*11	0,013986	0,004914	-0,30350
B*40 DRB1*11	0,013986	0,004914	0,07042
B*52 DRB1*15	0,013986	0,004914	0,78000
B*18 DRB1*15	0,013986	0,004914	0,00820
B*35 DRB1*07	0,012238	0,004601	-0,03285
B*35 DRB1*16	0,012238	0,004601	-0,48188
B*51 DRB1*15	0,012238	0,004601	-0,08333
B*38 DRB1*13	0,012238	0,004601	0,30925
B*35 DRB1*04	0,012238	0,004601	-0,05388
B*40 DRB1*14	0,012238	0,004601	0,22305
B*49 DRB1*11	0,012238	0,004601	0,44053
B*35 DRB1*13	0,010490	0,004264	-0,23869
B*44 DRB1*04	0,010490	0,004264	0,05754

Покрај тоа, во група 1 беа анализирани и трилокусните хаплотипови HLA-A-B-C и HLA-A-B-DRB1. Беа идентификувани 218 HLA-A-B-C хаплотипови, од кои 22 имаа фреквенција поголема од 0,01 и се прикажани на Табела 11, а само два имаа фреквенција поголема од 0,03, HLA-A*02-B*18-C*07 (4,0 %) и HLA-A*01-B*08-C*07 (3,3 %).

Табела 11. Фреквенција на HLA-A-B-C трилокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-B-C хаплотипови	Фреквенција	Стандардна девијација
A*02 B*18 C*07	0,040210	0,008221
A*01 B*08 C*07	0,033217	0,007499
A*02 B*35 C*04	0,024476	0,006466
A*24 B*18 C*07	0,024476	0,006466
A*11 B*35 C*04	0,024476	0,006466
A*03 B*35 C*04	0,022727	0,006237
A*02 B*51 C*15	0,020979	0,005998
A*24 B*35 C*04	0,019231	0,005747
A*02 B*51 C*14	0,017483	0,005485
A*02 B*44 C*05	0,017483	0,005485
A*02 B*27 C*02	0,017483	0,005485
A*03 B*07 C*07	0,017483	0,005485
A*33 B*14 C*08	0,017483	0,005485
A*01 B*35 C*04	0,015734	0,005208
A*26 B*38 C*12	0,015734	0,005208
A*02 B*07 C*07	0,010490	0,004264
A*02 B*40 C*03	0,010490	0,004264
A*02 B*13 C*06	0,010490	0,004264
A*03 B*18 C*07	0,010490	0,004264
A*68 B*35 C*04	0,010490	0,004264
A*03 B*18 C*12	0,010490	0,004264
A*01 B*37 C*06	0,010490	0,004264

На Табела 12 се прикажани HLA-A-B-DRB1 хаплотиповите. Вкупно беа откриени 320 различни хаплотипови, а само десет имаа фреквенции поголеми од 1 % . Најчести кај македонската популација се: HLA-A*02-B*18-DRB1*11 (2,9 %) и HLA-A*01-B*08-DRB1*03 (2,7 %).

Табела 12. Фреквенција на HLA-A-B-DRB1 трилокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-B-DRB1 хаплотипови	Фреквенција	Стандардна девијација
A*02 B*18 DRB1*11	0,029720	0,007107
A*01 B*08 DRB1*03	0,027972	0,006901
A*24 B*35 DRB1*11	0,017483	0,005485
A*24 B*18 DRB1*11	0,013986	0,004914
A*02 B*51 DRB1*11	0,012238	0,004601
A*33 B*14 DRB1*01	0,012238	0,004601
A*02 B*35 DRB1*11	0,012238	0,004601
A*03 B*35 DRB1*01	0,010490	0,004264
A*02 B*51 DRB1*04	0,010490	0,004264
A*03 B*07 DRB1*15	0,010490	0,004264

Во група 1, кај македонска популација со дефинирани хаплотипови, идентификувавме 373 различни хаплотипови од 572 HLA-A-B-C-DRB1 четирилокусни хаплотипови кои беа анализирани. Само 8 од нив, имаа фреквенција поголема од 1 % и се прикажани на Табела 13. Најчест четирилокусен хаплотип кај македонската популација е: HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 (2,7 %), следен од ХЛА -A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (2,6 %), ХЛА -A*24-B*35-C*04-DRB1*11 (1,5 %) и ХЛА -A*24-B*18-C*07-DRB1*11 (1,3 %).

Табела 13. Фреквенција на HLA-A-B-C-DRB1 четирилокусните хаплотипови во група 1 (n=286).

HLA-A-B-C-DRB1 хаплотип	Хаплотипска фреквенција	Стандардна девијација
A*01 B*08 C*07 DRB1*03	0,027972	0,006901
A*02 B*18 C*07 DRB1*11	0,026224	0,006687
A*24 B*35 C*04 DRB1*11	0,015734	0,005208
A*24 B*18 C*07 DRB1*11	0,013986	0,004914
A*33 B*14 C*08 DRB1*01	0,012238	0,004601
A*24 B*35 C*04 DRB1*01	0,010490	0,004264
A*03 B*07 C*07 DRB1*15	0,010490	0,004264
A*03 B*35 C*04 DRB1*01	0,010490	0,004264

4.2. Популациска студија

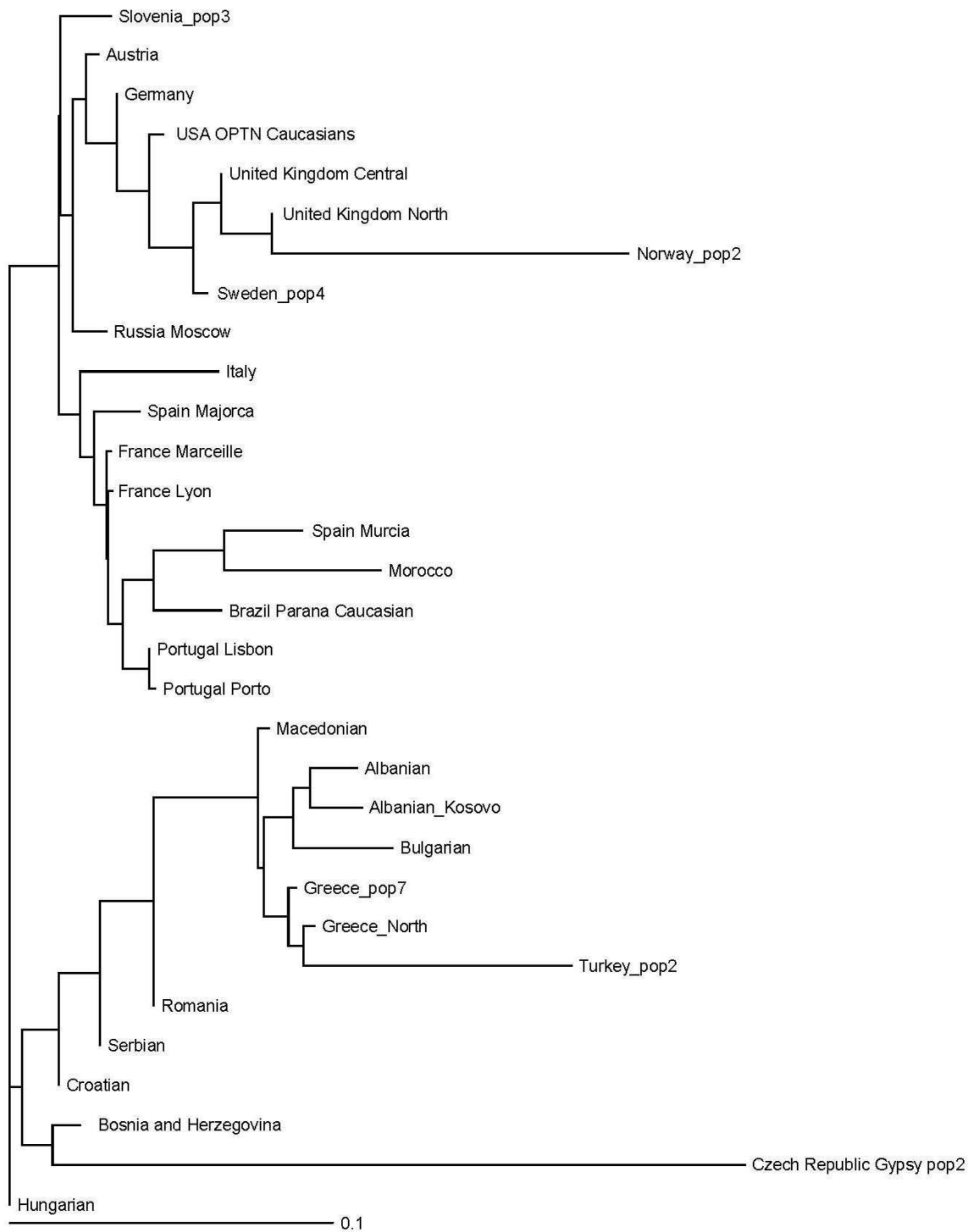
Споредбата на нашата популација со 30 светски популации е правена за алелските групи во локусите HLA-A, -B и -DRB1. На Табела 14 се прикажани вредностите за F_{ST} и p вредноста, како и Nei 's генетската дистанца. Најмала вредност за генетската дистанца е добиена за Грција-pop7 (0,013111), а највисока за Норвешка-pop2 (0,364037).

Табела 14. Споредба на македонската популација со 30 светски популации со помош на F_{ST} и Nei 's генетската дистанца пресметана за HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1.

Population	HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1		Nei's генетска дистанца пресметана за HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1
	Conventional F -statistics	F_{ST} P-values	Conventional F -statistics	F_{ST} P-values	Conventional F -statistics	F_{ST} P-values	
Macedonian	0,00000	*	0,00000	*	0,00000	*	0,000000
Serbian	-0,00048	0,60264	0,00136	0,05785	0,00561	0,00033	0,030806
Albanian	-0,00189	0,75107	-0,00193	0,86050	-0,00169	0,73488	0,021698
Bulgarian	-0,00140	0,50810	-0,00304	0,75967	-0,00327	0,69124	0,051023
Bosnia and Herzegovina	0,00143	0,25322	0,00492	0,03603	0,00509	0,04760	0,068651
Croatian	-0,00044	0,61620	0,00283	0,00264	0,00631	0,00000	0,036348
Greece pop7	0,00152	0,05851	0,00039	0,24760	-0,00145	0,99570	0,013111

Greece North	-0,00080	0,68331	0,00043	0,28364	0,00019	0,37256	0,019691
Turkey pop2	0,00930	0,00397	0,01098	0,00000	0,01847	0,00000	0,118779
Slovenia pop3	-0,00117	0,58876	0,00483	0,03372	/	/	0,087012
Austria	0,00024	0,37124	0,01416	0,00000	0,02080	0,00000	0,121797
Albanian Kosovo	-0,00372	0,95603	-0,00192	0,77686	-0,00128	0,60529	0,024401
Italy	0,00024	0,31174	0,00270	0,00231	0,01920	0,00000	0,071903
Hungarian	0,00086	0,17455	0,00702	0,00000	0,01028	0,00000	0,062782
Romania	-0,00189	0,92760	-0,00091	0,73421	/	/	0,027506
Germany	0,00231	0,02876	0,01723	0,00000	0,02323	0,00000	0,130759
France Marceille	0,00153	0,09355	0,01169	0,00000	0,01991	0,00000	0,107740
France Lyon	0,00173	0,05851	0,01175	0,00000	0,01966	0,00000	0,104972
Spain Murcia	0,00671	0,02149	0,01814	0,00000	0,02909	0,00000	0,203717
Spain Majorca	0,00060	0,28198	0,01073	0,00000	0,02381	0,00000	0,117030
USA OPTN Caucasians	0,00231	0,02446	0,02361	0,00000	0,03940	0,00000	0,193500
United Kingdom Central	0,00556	0,04562	0,01854	0,00000	0,03020	0,00000	0,196019
United Kingdom North	0,00268	0,07636	0,02276	0,00000	0,04638	0,00000	0,226808
Morocco	0,01438	0,00000	0,01907	0,00000	0,04024	0,00000	0,252563
Portugal Lisbon	0,00039	0,26248	0,01079	0,00000	0,02832	0,00000	0,122726
Portugal Porto	0,00076	0,16463	0,01177	0,00000	0,02959	0,00000	0,131813
Russia Moscow	0,00099	0,13388	0,01250	0,00000	0,02006	0,00000	0,107905
Sweden pop4	0,00349	0,02050	0,02466	0,00000	0,03902	0,00000	0,198756
Norway pop2	0,02689	0,00000	0,03125	0,00000	0,07487	0,00000	0,364037
Czech Republic Gypsy pop2	0,00417	0,19901	0,04038	0,00000	0,03414	0,00033	0,318624
Brazil Parana Caucasian	0,00097	0,12628	0,00914	0,00000	0,01796	0,00000	0,122066

Со помош на вредноста за Nei's генетската дистанца е конструирано стебло со Neighbor-Joining методот, а коешто е прикажано на Слика 5. Стеблото јасно ја покажува блиската поврзаност и групирањето меѓу македонската популација и останатите популации од Југоисточна Европа: Албанци, Албанци од Косово, Бугари, Грци и Турци, а потоа и со Романци, Срби и Хрвати. Останатите популации од Западна и од Северна Европа се подалечни од македонската популација, што е прикажано на дендрограмот.



Слика 5. Neighbor-Joining генетско стебло засновано на Nei's генетската дистанца за HLA-A, -B и -DRB1 пресметан за македонската и 30 други популации.

4.3. Анализа на ХЛА алелите и хаплотиповите кај група 2

Групата 2 ја сочинуваат 1541 испитаник, членови на МКДРКС, типизирани во локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1, а од нив во група од 566 испитаници се анализирани и локусите HLA-DQA1 и HLA-DQB1. Во оваа група, ги анализиравме Hardy-Weinberg-овата рамнотежа, фреквенцијата на алелските групи кај различните националности, како и четири и шестлокусните хаплотипови.

4.3.1. Демографски податоци за МКДРКС

Бројот на испитаници во однос на полот и возраста е прикажан на Табела 15. Примерокот го сочинуваат 757 мажи (49,13 %) и 784 жени (50,87 %), на возраст меѓу 18 и 60 години.

Табела 15. Број на испитаници во однос на полот и возраста

Возраст	Машки пол		Женски пол		Вкупно	
	N	%	N	%	N	%
18–25 години	213	13,84 %	339	22,00 %	552	35,84 %
26–35 години	221	14,34 %	173	11,22 %	394	25,56 %
36–45 години	155	10,06 %	133	8,63 %	288	18,69 %
46–55 години	105	6,8 %	79	5,13 %	184	11,93 %
>55 години	63	4,09 %	60	3,89 %	123	7,98 %
<i>Вкупно</i>	<i>757</i>	<i>49,13 %</i>	<i>784</i>	<i>50,87 %</i>	<i>1541</i>	<i>100 %</i>

На Табела 16 е прикажана распределбата на испитаниците во однос на нивната национална припадност. 83,26 % од доброволните дарители во МКДРКС се декларирале како Македонци.

Табела 16. Број на испитаници во однос на националната припадност

Национална припадност	N	%
Македонци (православни)	1.283	83,26 %
Албанци	128	8,30 %
Македонци (муслимани)	76	4,93 %
Турци	21	1,37 %
Роми	6	0,38 %
Босанци	4	0,25 %
Срби	1	0,06 %
Непознато	22	1,45 %
<i>Вкупно</i>	<i>1.541</i>	<i>100 %</i>

4.3.2. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа

Hardy-Weinberg-овата рамнотежа беше пресметана за сите шест анализирани локуси (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 и -DQB1) за: Македонците, Албанците и

Македонците муслимани (Табела 17). Сите анализирани популации се во Hardy-Weinberg-ова рамнотежа ($p > 0,05$).

Табела 17. Hardy-Weinberg-ова рамнотежа за: HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 и -DQB1 за дарителите во МКДРКС.

Националност	ХЛА локус	Бр. на индивидуи	Бр. на идентификувани алелски групи	Набљудувана хетерозиготност	Очекувана хетерозиготност	р-вредност	С.Д.
Македонци	A	1283	17	0,85191	0,85229	0,97330	0,00012
	B	1283	29	0,92518	0,91912	0,84711	0,00025
	C	1283	13	0,83944	0,86130	0,07234	0,00022
	DRB1	1283	13	0,87919	0,87652	0,74275	0,00036
	DQA1	566	6	0,62898	0,62752	0,07825	0,00022
	DQB1	566	5	0,73498	0,72413	0,83359	0,00036
Албанци	A	128	15	0,85156	0,86284	0,05979	0,00015
	B	128	24	0,88281	0,90349	0,49993	0,00020
	C	128	12	0,86719	0,86474	0,32217	0,00046
	DRB1	128	12	0,82812	0,86875	0,41308	0,00034
Македонци муслимани	A	76	13	0,89474	0,85117	0,52654	0,00053
	B	76	20	0,92105	0,91182	0,57090	0,00020
	C	76	13	0,84211	0,87382	0,43625	0,00037
	DRB1	76	12	0,85526	0,84481	0,20146	0,00035

С.Д. (стандардна девијација)

4.3.3. Фреквенција на ХЛА алелските групи

На Табела 18 се прикажани фреквенциите на HLA-A алелските групи кај Македонците, Албанците и Македонците муслимани. Во подгрупата Македонци детектирани се 17 од опишаните 21 алелска група во HLA-A локусот. Најчест е HLA-A*02 (30,0 %), следен од HLA-A*01 (13,2 %), HLA-A*24 (12,4 %) и HLA-A*03 (10,2 %). На овие четири алелски групи отпаѓаат 65,8 % од сите алели. Само три алелски групи имаа фреквенции $< 0,01$ (HLA-A*66, HLA-A*69 и HLA-A*74). Во подгрупата Албанци беа идентификувани 15, а во подгрупата Македонци муслимани 13 HLA-A алелски групи. Најчести HLA-A алелски групи кај Албанците (со фреквенција поголема од 10 %) се HLA-A*02 (26,1 %), HLA-A*24 (16,4 %), HLA-A*01 (13,6 %) и HLA-A*03 (11,3 %), додека кај Македонците муслимани најчести се HLA-A*02 (32,2 %) и HLA-A*01 (12,5 %).

Табела 18. HLA-A алелските групи во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

Алелска група	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.
	Македонци (n=1283)		Албанци (n=128)		Македонци муслимани (n=76)	
A*02	0,300468	0,009052	0,261719	0,027527	0,322368	0,038035
A*01	0,132112	0,006686	0,136719	0,021514	0,125000	0,026914
A*24	0,124318	0,006515	0,164062	0,023191	0,098684	0,024270
A*03	0,102494	0,005989	0,113281	0,019847	0,026316	0,013027
A*11	0,070148	0,005043	0,035156	0,011533	0,052632	0,018172
A*26	0,052221	0,004393	0,050781	0,013749	0,026316	0,013027
A*32	0,049104	0,004267	0,054688	0,014238	0,078947	0,021944
A*68	0,042479	0,003982	0,062500	0,015158	0,039474	0,015846
A*23	0,023772	0,003008	0,031250	0,010896	0,026316	0,013027
A*33	0,022214	0,002910	0,015625	0,007766	0,065789	0,020175
A*25	0,021824	0,002885	0,027344	0,010213	0,013158	0,009273
A*30	0,020265	0,002782	0,027344	0,010213	/	/
A*31	0,016758	0,002535	0,011719	0,006739	0,072368	0,021085
A*29	0,015588	0,002446	/	/	0,052632	0,018172
A*66	0,003507	0,001167	/	/	/	/
A*69	0,001559	0,000779	0,003906	0,003906	/	/
A*74	0,001169	0,000675	0,003906	0,003906	/	/

/, алелската група не е детектирана; С.Д. (стандардна девијација)

Во локусот HLA-B, кај Македонците забележавме 29 алелски групи и 20 од нив имаа фреквенции поголеми од 1 % (Табела 19). Најчести алелски групи се: HLA-B*35 (14,1 %), HLA-B*18 (13,3 %) и HLA-B*51 (12,9 %), следени од HLA-B*44 (8,8 %) и HLA-B*08 (6,8 %). Идентификувавме 24 HLA-B алелски групи кај Албанците и 20 кај Македонците муслимани, а HLA-B*51, HLA-B*18 и HLA-B*35 имаа фреквенција >10 % во двете групи.

Табела 19. HLA-B алелските групи во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

Алелска група	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.
	Македонци (n=1283)		Албанци (n=128)		Македонци Муслимани (n=76)	
B*35	0,141465	0,006881	0,125000	0,020710	0,118421	0,026294
B*18	0,133671	0,006719	0,144531	0,022020	0,184211	0,031547
B*51	0,129774	0,006635	0,207031	0,025373	0,118421	0,026294
B*44	0,088465	0,005607	0,078125	0,016806	0,072368	0,021085
B*08	0,068979	0,005004	0,046875	0,013237	0,026316	0,013027
B*07	0,054949	0,004500	0,042969	0,012699	0,026316	0,013027
B*27	0,047935	0,004218	0,035156	0,011533	0,026316	0,013027
B*40	0,047545	0,004202	0,046875	0,013237	0,105263	0,024975
B*38	0,037412	0,003747	0,050781	0,013749	0,006579	0,006579
B*39	0,028449	0,003283	0,011719	0,006739	0,046053	0,017057
B*13	0,026500	0,003171	0,039062	0,012133	0,006579	0,006579
B*15	0,023383	0,002984	0,019531	0,008666	0,013158	0,009273
B*55	0,022993	0,002959	0,023438	0,009474	0,032895	0,014515
B*49	0,022603	0,002935	0,015625	0,007766	0,039474	0,015846
B*52	0,019875	0,002756	0,003906	0,003906	0,026316	0,013027
B*14	0,019096	0,002702	0,003906	0,003906	0,065789	0,020175
B*57	0,017147	0,002563	0,015625	0,007766	/	/
B*37	0,016758	0,002535	0,023438	0,009474	0,006579	0,006579
B*41	0,014809	0,002385	0,007812	0,005513	0,059211	0,019207
B*58	0,012081	0,002157	0,015625	0,007766	/	/
B*56	0,009353	0,001901	0,003906	0,003906	/	/
B*50	0,006235	0,001554	0,011719	0,006739	0,006579	0,006579
B*53	0,004287	0,001290	0,015625	0,007766	/	/
B*47	0,003897	0,001230	0,011719	0,006739	/	/
B*45	0,000779	0,000551	/	/	/	/
B*48	0,000390	0,000390	/	/	/	/
B*46	0,000390	0,000390	/	/	0,013158	0,009273
B*78	0,000390	0,000390	/	/	/	/
B*73	0,000390	0,000390	/	/	/	/

/, алелската група не е детектирана; С.Д. (стандардна девијација)

Алелските фреквенции за HLA-C локусот се прикажани на Табела 20. Кај Македонците во МБМДР се идентификувани 13 алелски групи. Сите имаат фреквенции поголеми од 0,01, а најчести се HLA-C*07 (26,5 %), HLA-C*04 (15,1 %) и HLA-C*12 (14,2 %). На овие три групи отпаѓаат 55,8 % од сите откриени HLA-C алелски групи. Во оваа подгрупа не беше откриен само HLA-C*18. Кај Албанците беа детектирани 12 HLA-C алелски групи и најчести се HLA-C*07 (23,8 %), HLA-C*04 (17,1 %), HLA-C*12 (12,5 %), HLA-C*02 (11,7 %) и HLA-C*06 (10,5 %), додека кај Македонците муслимани беше детектиран различен профил на HLA-C алелските групи, со HLA-C*07 (23,0 %), HLA-C*04 (15,1 %), HLA-C*02 (15,1 %) и HLA-C*15 (10,5 %) како најчести.

Табела 20. HLA-C алелските групи во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

Алелска група	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.
	Македонци (n=1283)		Албанци (n=128)		Македонци муслимани (n=76)	
C*07	0,265783	0,008722	0,238281	0,026679	0,230263	0,034261
C*04	0,151208	0,007074	0,171875	0,023626	0,151316	0,029163
C*12	0,142245	0,006897	0,125000	0,020710	0,098684	0,024270
C*02	0,086906	0,005562	0,117188	0,020142	0,151316	0,029163
C*06	0,070148	0,005043	0,105469	0,019235	0,026316	0,013027
C*15	0,067810	0,004964	0,054688	0,014238	0,105263	0,024975
C*03	0,055729	0,004529	0,042969	0,012699	0,032895	0,014515
C*01	0,047155	0,004185	0,070312	0,016011	0,032895	0,014515
C*05	0,034295	0,003593	0,027344	0,010213	0,065789	0,020175
C*14	0,029228	0,003326	0,035156	0,011533	0,026316	0,013027
C*08	0,019875	0,002756	0,003906	0,003906	0,065789	0,020175
C*16	0,018706	0,002675	0,007812	0,005513	0,006579	0,006579
C*17	0,010912	0,002051	/	/	0,006579	0,006579

/, алелската група не е детектирана; С.Д. (стандардна девијација)

Фреквенцијата на HLA-DRB1 алелските групи кај Македонците, Албанците и Македонците муслимани во МКДРКС е прикажана на Табела 21. Детектирани се 13 алелски групи кај Македонците, од кои: HLA-DRB1*11 (23,5 %), HLA-DRB1*16 (14,6 %) и HLA-DRB1*13 (10,1 %) се најчести. Тие се следени од HLA-DRB1*03 (8,8 %) и HLA-DRB1*15 (8,7 %). Само HLA-DRB1*09 има фреквенција <0,01. Кај Албанците и Македонците муслимани детектиравме 12 HLA-DRB1 алелски групи (само HLA-DRB1*09 не беше детектиран). Кај Албанците најголема фреквенција имаат HLA-DRB1*11 (24,2 %), HLA-DRB1*13 (17,9 %) и HLA-DRB1*16 (10,9 %), додека кај Македонците муслимани најчести се HLA-DRB1*11 (28,2 %) и HLA-DRB1*16 и HLA-DRB1*14 со 17,1 % .

Табела 21. HLA-DRB1 алелските групи во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

Алелска група	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.	Фреквенција	С.Д.
	Македонци (n=1283)		Албанци (n=128)		Македонци муслимани (n=76)	
DRB1*11	0,235386	0,008377	0,242188	0,026828	0,282895	0,036653
DRB1*16	0,146921	0,006990	0,109375	0,019545	0,171053	0,030644
DRB1*13	0,101325	0,005958	0,179688	0,024042	0,039474	0,015846
DRB1*03	0,088465	0,005607	0,089844	0,017907	0,052632	0,018172
DRB1*15	0,087685	0,005585	0,089844	0,017907	0,085526	0,022759
DRB1*04	0,072876	0,005132	0,054688	0,014238	0,078947	0,021944
DRB1*01	0,072097	0,005107	0,046875	0,013237	0,052632	0,018172
DRB1*07	0,070538	0,005056	0,085938	0,017551	0,032895	0,014515
DRB1*14	0,067030	0,004938	0,042969	0,012699	0,171053	0,030644
DRB1*08	0,021824	0,002885	0,023438	0,009474	0,006579	0,006579
DRB1*12	0,017537	0,002592	0,019531	0,008666	0,019737	0,011319
DRB1*10	0,016758	0,002535	0,015625	0,007766	0,006579	0,006579
DRB1*09	0,001559	0,000779	/	/	/	/

/, алелската група не е детектирана; С.Д. (стандардна девијација)

HLA-DQA1 и HLA-DQB1 алелските групи се анализирани само во група од 566 испитаници, Македонци членови на МКДРКС (Табела 22). Шест алелски групи се идентификувани во HLA-DQA1 локусот, а најчести се HLA-DQA1*01 (49,7 %) и HLA-DQA1*05 (33,9 %) кои сочинуваат 83,5 % од сите HLA-DQA1 алелски групи. Во HLA-DQB1 локусот се најдени 5 алелски групи, а со најголема фреквенција се HLA-DQB1*05 (34,6 %) и HLA-DQB1*03 (33,5 %), следени од HLA-DQB1*06 (15,2 %) и HLA-DQB1*02 (14,1 %).

Табела 22. HLA-DQA1 и HLA-DQB1 алелските групи кај Македонците во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина.

Алелска група	Фреквенција	С.Д.	Алелска група	Фреквенција	С.Д.
DQA1*01	0,497350	0,014867	DQB1*05	0,346290	0,014148
DQA1*05	0,339223	0,014078	DQB1*03	0,335689	0,014042
DQA1*03	0,078622	0,008003	DQB1*06	0,152827	0,010699
DQA1*02	0,063604	0,007257	DQB1*02	0,141343	0,010359
DQA1*04	0,019435	0,004105	DQB1*04	0,023852	0,004537
DQA1*06	0,001767	0,001249			

С.Д. (стандардна девијација)

4.3.4. Фреквенција на ХЛА хаплотиповите

Четирилокусните хаплотипови во МКДРКС се пресметани со помош на Expectation-Maximization алгоритмот за непозната гаметска фаза. Во подгрупата Македонци, од 2.566 хаплотипови се идентификувани 907 различни HLA-A-B-C-DRB1 хаплотипови и само 7 од нив имаат фреквенции поголеми од 1 % (Табела 23). Најчести хаплотипови се: ХЛА-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 (4,0 %) и ХЛА-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (3,8 %). Во подгрупата Албанци се идентификувани 140 хаплотипови, а во подгрупата Македонци муслимани 74. Во двете подгрупи најчест четирилокусен хаплотип е HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (4,6 % и 6,8 %, соодветно), следен од HLA-A*03-B*35-C*04-DRB1*11 (3,5 %), HLA-A*02-B*08-C*07-DRB1*11 (3,5 %), HLA-A*02-B*08-C*07-DRB1*03 (3,1 %) и HLA-A*24-B*38-C*12-DRB1*13 (3,1 %) кај Албанците и HLA-A*33-B*14-C*08-DRB1*04 (5,2 %), HLA-A*29-B*41-C*04-DRB1*14 (5,2 %) и HLA-A*02-B*18-C*05-DRB1*16 (4,6 %) кај Македонците муслимани.

Табела 23. HLA-A-B-C-DRB1 четирилокусните хаплотипови во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина ($f > 0,01$).

Хаплотип	Фреквенција	Хаплотип	Фреквенција	Хаплотип	Фреквенција
Македонци		Албанци		Македонци муслимани	
A*01-B*08-C*07-DRB1*03	0,040285	A*02-B*18-C*07-DRB1*11	0,046875	A*02-B*18-C*07-DRB1*11	0,068199
A*02-B*18-C*07-DRB1*11	0,038251	A*03-B*35-C*04-DRB1*11	0,035156	A*33-B*14-C*08-DRB1*04	0,052632
A*02-B*27-C*02-DRB1*16	0,014777	A*02-B*08-C*07-DRB1*03	0,031250	A*29-B*41-C*04-DRB1*14	0,052632
A*02-B*35-C*04-DRB1*11	0,012886	A*24-B*38-C*12-DRB1*13	0,031250	A*02-B*18-C*05-DRB1*16	0,046053
A*24-B*35-C*04-DRB1*11	0,011862	A*68-B*51-C*07-DRB1*13	0,027344	A*02-B*35-C*04-DRB1*11	0,032895
A*02-B*51-C*15-DRB1*16	0,011135	A*01-B*51-C*15-DRB1*11	0,015625	A*02-B*40-C*03-DRB1*14	0,032895
A*24-B*18-C*07-DRB1*11	0,010049	A*02-B*13-C*06-DRB1*07	0,015625	A*02-B*51-C*15-DRB1*16	0,032895
		A*01-B*08-C*07-DRB1*03	0,015625	A*31-B*55-C*15-DRB1*11	0,032895
		A*02-B*51-C*15-DRB1*16	0,015625	A*32-B*40-C*02-DRB1*16	0,026316
		A*23-B*44-C*04-DRB1*07	0,015625	A*01-B*52-C*12-DRB1*15	0,026316
		A*24-B*18-C*07-DRB1*16	0,015625	A*32-B*44-C*02-DRB1*14	0,026316
		A*24-B*55-C*03-DRB1*13	0,015625	A*24-B*18-C*07-DRB1*11	0,023108
		A*25-B*18-C*12-DRB1*15	0,015625	A*24-B*07-C*07-DRB1*03	0,019737
		A*32-B*40-C*02-DRB1*11	0,015625	A*02-B*27-C*02-DRB1*16	0,019737
		A*03-B*35-C*04-DRB1*16	0,015075	A*01-B*40-C*02-DRB1*15	0,019737
		A*24-B*51-C*01-DRB1*11	0,015075	A*02-B*35-C*12-DRB1*14	0,019737
		A*01-B*49-C*07-DRB1*13	0,011719	A*01-B*49-C*07-DRB1*13	0,019737
		A*32-B*44-C*05-DRB1*15	0,011719	A*68-B*39-C*12-DRB1*11	0,019737
		A*02-B*27-C*02-DRB1*16	0,011719	A*24-B*40-C*02-DRB1*14	0,013158
		A*24-B*07-C*07-DRB1*15	0,011719	A*26-B*35-C*04-DRB1*01	0,013158
		A*02-B*27-C*01-DRB1*01	0,011719	A*11-B*35-C*04-DRB1*16	0,013158
		A*01-B*37-C*06-DRB1*16	0,011719	A*31-B*51-C*14-DRB1*16	0,013158
		A*01-B*53-C*04-DRB1*13	0,011719	A*11-B*18-C*07-DRB1*07	0,013158
		A*02-B*51-C*14-DRB1*07	0,011719	A*68-B*08-C*07-DRB1*03	0,013158
		A*03-B*07-C*07-DRB1*13	0,011719	A*01-B*44-C*02-DRB1*01	0,013158
		A*26-B*40-C*02-DRB1*16	0,011719	A*32-B*51-C*15-DRB1*11	0,013158
				A*33-B*14-C*08-DRB1*01	0,013158

На Табела 24 се прикажани најчестите ($f > 0,01$) шестлокусни хаплотипови кај Македонците во МКДРКС. Забележавме вкупно 543 HLA-A-B-C-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипови и само 8 од нив имаат фреквенција поголема од 1 %. Најчести хаплотипови се ХЛА-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 (4,2 %) и HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (3,6 %), следени од HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 (1,36 %) и HLA-A*02-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (1,33 %).

Табела 24. HLA-A-B-C-DRB1-DQA1-DQB1 шестлокусните хаплотипови кај Македонците во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина ($f > 0,01$).

Хаплотип	Фреквенција
A*02 B*18 C*07 DRB1*11 DQA1*05 DQB1*03	0,042262
A*01 B*08 C*07 DRB1*03 DQA1*05 DQB1*02	0,036074
A*24 B*35 C*04 DRB1*11 DQA1*05 DQB1*03	0,013652
A*02 B*08 C*07 DRB1*03 DQA1*05 DQB1*02	0,013358
A*02 B*35 C*04 DRB1*11 DQA1*05 DQB1*03	0,012591
A*02 B*27 C*02 DRB1*16 DQA1*01 DQB1*05	0,012629
A*02 B*51 C*15 DRB1*16 DQA1*01 DQB1*05	0,012367
A*03 B*18 C*12 DRB1*16 DQA1*01 DQB1*05	0,011448

4.4. Споредба на ХЛА алелите и хаплотиповите меѓу група 1 и група 2

Една од дополнителните цели на оваа докторска дисертација е да се направи споредба на ХЛА алелите и хаплотиповите меѓу македонската популација од фамилијарно дефинираниот примерок (група 1) и Македонците зачленети во МКДРКС (група 2). Од Табелата 25 се гледа дека вредностите за фреквенцијата на HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелските групи кај Македонците од фамилијарно дефинираниот примерок и Македонците од МКДРКС се многу слични. Ние забележавме $p < 0,05$ само за три алелски групи: HLA-A*32, HLA-A*37 и HLA-C*04. HLA-A*32 е почест во МКДРКС, додека HLA-C*04 има повисока фреквенција во фамилијарната студија. HLA-A*37 е детектиран само кај една индивидуа во група 1. Алелските групи HLA-B*45, HLA-B*46 и HLA-B*73 се забележани само во група 2.

Табела 25. Споредба на HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелските групи помеѓу Македонците во МКДРКС и фамилијарно дефинираниот примерок. За статистички значајна се смета вредноста за $p < 0,05$.

ХЛА алелска група	МКДРКС, f	Фамилијарна студија, f	P вредност	ХЛА алелска група	МКДРКС, f	Фамилијарна студија, f	P вредност
HLA-A*02	0,300468	0,290210	0,6408	HLA-B*35	0,141465	0,160839	0,2340
HLA-A*24	0,124318	0,138112	0,3700	HLA-B*18	0,133671	0,146853	0,4056
HLA-A*01	0,132112	0,125874	0,6892	HLA-B*51	0,129774	0,146853	0,2881
HLA-A*03	0,102494	0,101399	0,9376	HLA-B*44	0,088465	0,078671	0,4690
HLA-A*11	0,070148	0,080420	0,4093	HLA-B*08	0,068979	0,059441	0,4101
HLA-A*26	0,052221	0,050699	0,8820	HLA-B*07	0,054949	0,062937	0,4539
HLA-A*32	0,049104	0,029720	0,0444*	HLA-B*27	0,047935	0,040210	0,4276
HLA-A*68	0,042479	0,043706	0,9288	HLA-B*40	0,047545	0,045455	0,8008
HLA-A*23	0,023772	0,027972	0,5185	HLA-B*38	0,037412	0,033217	0,6291
HLA-A*33	0,022214	0,024476	0,7421	HLA-B*39	0,028449	0,020979	0,3196
HLA-A*25	0,021824	0,012238	0,1393	HLA-B*13	0,026500	0,031469	0,5104
HLA-A*30	0,020265	0,029720	0,1631	HLA-B*15	0,023383	0,012238	0,0954
HLA-A*31	0,016758	0,019231	0,6808	HLA-B*55	0,022993	0,017483	0,4164
HLA-A*29	0,015588	0,019231	0,5332	HLA-B*49	0,022603	0,020979	0,8119
HLA-A*66	0,003507	0,001748	0,4996	HLA-B*52	0,019875	0,017483	0,7077
HLA-A*69	0,001559	0,001748	0,9181	HLA-B*14	0,019096	0,024476	0,4068
HLA-A*74	0,001169	0,001748	0,7255	HLA-B*57	0,017147	0,013986	0,6354
HLA-A*37	/	0,001748	0,0341*	HLA-B*37	0,016758	0,013986	0,6354
				HLA-B*41	0,014809	0,012238	0,6399
				HLA-B*58	0,012081	0,012238	0,9752
				HLA-B*56	0,009353	0,010490	0,8005
				HLA-B*50	0,006235	0,003497	0,4328
				HLA-B*53	0,004287	0,008741	0,1761
				HLA-B*47	0,003897	0,001748	0,4316
				HLA-B*45	0,000779	/	0,5041
				HLA-B*48	0,000390	0,001748	0,2443
				HLA-B*46	0,000390	/	0,6367
				HLA-B*78	0,000390	0,001748	0,2443
				HLA-B*73	0,000390	/	0,6367
HLA-C*07	0,265783	0,279720	0,508615	HLA-DRB1*11	0,235386	0,255245	0,3139
HLA-C*04	0,151208	0,183566	0,048531*	HLA-DRB1*16	0,146921	0,146853	1
HLA-C*12	0,142245	0,127622	0,361485	HLA-DRB1*13	0,101325	0,085664	0,234082
HLA-C*02	0,086906	0,068182	0,143229	HLA-DRB1*03	0,088465	0,078671	0,451596
HLA-C*06	0,070148	0,061189	0,443085	HLA-DRB1*15	0,087685	0,090909	0,782594
HLA-C*15	0,067810	0,068182	1	HLA-DRB1*04	0,072876	0,080420	0,533768
HLA-C*03	0,055729	0,045455	0,308271	HLA-DRB1*01	0,072097	0,075175	0,79759
HLA-C*01	0,047155	0,043706	0,72324	HLA-DRB1*07	0,070538	0,078671	0,496234
HLA-C*05	0,034295	0,038462	0,624136	HLA-DRB1*14	0,067030	0,059441	0,507471
HLA-C*14	0,029228	0,034965	0,469003	HLA-DRB1*08	0,021824	0,013986	0,230434
HLA-C*08	0,019875	0,027972	0,225744	HLA-DRB1*12	0,017537	0,013986	0,551182
HLA-C*16	0,018706	0,017483	0,844235	HLA-DRB1*10	0,016758	0,019231	0,680857
HLA-C*17	0,010912	0,003497	0,099329	HLA-DRB1*09	0,001559	0,001748	1

f, фреквенција.

Рангирањето на четирилокусните хаплотипови кај Македонците од фамилијарната студија и Македонците од МКДРКС се прикажани во Табела 26. Првите два хаплотипа се исти во двете групи. Третиот хаплотип во МКДРКС, HLA-A*02-B*27-C*02-DRB1*16, се наоѓа на 13-тата позиција во група 1. Шестиот хаплотип во МКДРКС, HLA-A*02-B*51-C*15-DRB1*16, не е присутен во група 1, додека осмиот хаплотип во група 1, HLA-A*03-B*35-C*04-DRB1*01, се наоѓа на 67-мата позиција во група 2. 549 хаплотипови (21,3 %) се забележани само еднаш во група 2, додека 282 (49,3 %) хаплотипа во група 1.

Табела 26. Рангирање на четирилокусните хаплотипови во фамилијарната студија (група 1) и во МКДРКС (група 2).

Хаплотип	Фамилијарна студија, ранг	МКДРКС, ранг
A*01 B*08 C*07 DRB1*03	1	1
A*02 B*18 C*07 DRB1*11	2	2
A*02 B*27 C*02 DRB1*16	13	3
A*02 B*35 C*04 DRB1*11	6	4
A*24 B*35 C*04 DRB1*11	3	5
A*02 B*51 C*15 DRB1*16	/	6
A*24 B*18 C*07 DRB1*11	4	7
A*33 B*14 C*08 DRB1*01	5	9
A*03 B*07 C*07 DRB1*15	7	13
A*03 B*35 C*04 DRB1*01	8	67

5. ДИСКУСИЈА

Анализата на ХЛА полиморфизмот и врзаната нерамнотежа на алелите, како и разликите во честотата на ХЛА алелите и хаплотиповите меѓу популациите, има примена при изборот на дарители за трансплантација на хематопоетски матични клетки, солидни органи и исто така е важно при испитувањето на асоцијацијата на ХЛА со етиопатогенезата на одредени болести. Резултатите од оваа студија ги прикажуваат фреквенциите на HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелите, а за првпат и четирилокусните хаплотипови кај примерок од македонската популација со дефинирани хаплотипови (врз основа на фамилијарни податоци). Покрај тоа, одредени се фреквенциите на ХЛА алелите и хаплотиповите кај доброволните дарители на коскена срцевина зачленети во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина. Одредувањето на ХЛА полиморфизмот во една популација е основа за понатамошни испитувања на значењето на ХЛА алелите кај различни групи болни во нашата популација.

Ретроспективните анализи на податоците за ХЛА-типизацијата на дарителите во регистрите на матични клетки се користат како извор на податоци за ХЛА полиморфизмот за одредена популација (40, 54, 55) заради големиот број на испитаници. Не е јасно утврдено колку голем треба да биде примерокот за да се процени значајноста на појавување на одреден алел. Препорачан, најмал, број на испитаници е 100 (47), а Sanchez-Mazas и соработниците (54) дале препорака фреквенцијата на ХЛА алелот од 1 % да може да се смета за значајна доколку популацијата има повеќе од 200 испитаници. Меѓутоа, авторите укажуваат дека испитуваниот примерок треба да биде што е можно поголем независно од бројот на населението. Оваа студија е работена на група од 286 несродни индивидуи, родители на пациенти испратени на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје (група 1) за ХЛА-типизација за HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1 локусите. Според фамилијарните податоци, во оваа група се дефинирани ХЛА хаплотиповите.

Минималните критериуми за одбирање на соодветен дарител на ХМК опфаќаат 8/8 идентичност во ХЛА алелите (96). Затоа и фамилиите и пациентите на кои им беше потребна трансплантација на ХМК беа типизирани за локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1. Современите сознанија за значењето на ХЛА совпадливоста при трансплантацијата на ХМК, наметнаа нови критериуми 10/10, односно идентичност во HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 алелите (76, 81, 123). Познато е дека несовпадливоста помеѓу дарителот и примателот во локусите HLA-A, -B и -DRB1 е здружена со неповолен исход од трансплантацијата на ХМК (76, 83, 84, 86). Исто така, несовпадливоста во HLA-C локусот води кон почеста појава на компликации (83, 84, 86, 102), а во HLA-DQ локусот до зголемен морталитет по трансплантацијата (76, 83, 96, 109). Заради тоа, од 2014 година на Институтот за имунобиологија и хумана генетика сите пациенти се типизираат за HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 локусите. Исто така, и доброволните дарители во МКДРКС се типизираат за сите пет локуси. Бројот на испитаници со типизирани пет локуси и дефинирани хаплотипови е недоволен за статистичка

обработка, па заради тоа во оваа студија се прикажани резултатите за фреквенцијата на ХЛА алелите и хаплотиповите во 4 испитувани локуси (HLA-A, -B, -C и -DRB1).

Неопходен предуслов за да можат податоците за фреквенцијата на ХЛА алелите да се користат за споредба со други популации е да се процени дали испитуваната популација се наоѓа во Hardy-Weinberg-ова рамнотежа за сите испитувани локуси (46, 54). Со тестирање на претпоставката за Hardy-Weinberg-ова рамнотежа на ХЛА локусите во сите испитувани групи, покажано е дека испитуваните групи се наоѓаат во рамнотежа за сите испитувани локуси, односно очекуваните и добиените вредности за фреквенцијата на гените за секој локус не се разликувале значајно статистички ($p > 0,05$).

Една од основните карактеристики на ХЛА-системот е високиот степен на полиморфизам (35, 38), односно постоењето на два или повеќе алела за еден ген во популацијата со фреквенција поголема од 1 %. Во група 1, се докажани 57 алелски групи во ХЛА класа 1 и 13 во ХЛА класа 2. Во ХЛА класа 1, во повеќе од 1 % се застапени 47 алелски групи, а 12 во класа 2.

Во групата од 286 испитаници, беше докажано присуството на 18 HLA-A алелски групи (14 имаат фреквенција >1 %), 26 HLA-B алелски групи (21 имаат фреквенција >1 %), 13 HLA-C алелски групи (12 имаат фреквенција >1 %) и 13 HLA-DRB1 алелски групи (12 имаат фреквенција >1 %). Претходното испитување на HLA-A и HLA-B локусите во македонската популација е работено на 172 испитаници со помош на методот на реверзна хибридизација (145). Димитровски и соработниците во оваа студија детектирале 14 HLA-A алелски групи и 24 HLA-B алелски групи, а со најголема фреквенција биле HLA-A*02 (25,6 %), A*24 (16,3 %) и A*01 (13,7 %) во HLA-A локусот и HLA-B*18 (16,6 %), B*35 и B*51 со 14,8 % во HLA-B локусот. Помалиот број испитаници во студијата, не влијаел на добиената фреквенција за најчестите алелски групи, но поголемиот број на испитаници во оваа студија даваат подобар увид во распределбата на останатите алелски групи во овие локуси. Понатамошните студии на поголем број испитаници и со висока резолуција би требало да ја покажат честотата на појавувањето на досега неоткриени алели кај македонската популација.

Анализата на добиените резултати за HLA-A, HLA-B и HLA-C локусите покажа дека 10 алелски групи имаат фреквенција поголема од 10 %: HLA-A*02 (29,0 %), HLA-C*07 (27,9 %), HLA-C*04 (18,3 %), HLA-B*35 (16,1 %), HLA-B*18 (14,7 %), HLA-B*51 (14,7 %), HLA-A*24 (13,8 %), HLA-C*12 (12,8 %), HLA-A*01 (12,6 %) и HLA-A*03 (10,1 %). HLA-A*02 е доминантна алелска група кај сите европски популации (51). Вториот најчест алел во HLA-A локусот беше HLA-A*24, каков што е случајот кај Албанците, Грците и Турците (51, 127, 146), додека кај Србите, Хрватите, Босанците и други земји од Централна и Западна Европа, втори најчести алелски групи се HLA-A*01 и/или HLA-A*03 (51, 57, 128, 131). Вторите најчести HLA-A алели кај Бугарите се HLA-A*24:02 и HLA-A*32:01 (126). HLA-B*35, B*51 и B*18 се исто така најчести алелски групи во HLA-B локусот кај соседните балкански популации (51, 126 – 128, 131, 146). Исклучок се Босанците каде што најчеста алелска група е HLA-B*44, додека

кај Турците и Ерменците, HLA-B*35 и B*51 се следени од HLA-B*44 (51, 147, 148). Во земјите од Западна Европа и Русија најчести HLA-B алелски групи се HLA-B*07, B*44 и B*35, додека во Северна Европа најчести се HLA-B*07, B*44 и B*08 (51, 149, 150). Кај нашата популација HLA-B*44 и HLA-B*07 се на четврто и петто место по честотата. Што се однесува на HLA-C локусот, најчести во нашата популација беа HLA-C*07, HLA-C*04 и HLA-C*12 што е слично на податоците за честотата на HLA-C алелските групи објавени за останатите европски популации (51, 151).

Анализата на HLA-DRB1 генскиот локус покажа дека најчест во македонската популација беше HLA-DRB1*11 (25,5 %), следен од HLA-DRB1*16 (14,6 %), DRB1*15 (9,0 %) и DRB1*13 (8,5 %). Само HLA-DRB1*09 има фреквенција помала од 1 %. HLA-DRB1*11 е исто така најчест во останатите земји од Балканскиот Полуостров, Италија и Турција (51, 126, 128, 130, 131, 146, 152, 153). Вториот најчест HLA-DRB1 алел кај македонската популација е HLA-DRB1*16, како кај Албанците (127, 154), додека кај Србите, Хрватите, Грците, Италијаните и Турците втора најчеста алелска група е HLA-DRB1*13 (51, 128, 131, 146, 155). Популациите од Западна и од Северна Европа имаат различен профил во HLA-DRB1 алелските фамилии, со тоа што најчести се: HLA-DRB1*07, DRB1*15, DRB1*04 и DRB1*13 (51, 56, 132, 156 – 162).

За ХЛА-системот е карактеристична врзаната нерамнотежа (linkage disequilibrium). Алелите од два локуса се појавуваат заедно во истиот хаплотип многу почесто или поретко отколку што би се очекувало со оглед на фреквенцијата на алелите во популацијата (35, 46, 47). Врзаната нерамнотежа на алелите од различни локуси укажува на можна еволутивна поврзаност на ХЛА алелите (42), а исто така познавањето на врзната нерамнотежа за алелите од различни локуси има практично значење при пронаоѓањето на дарител за трансплантација на ХМК. Во испитуваната група, меѓу дволокусните хаплотипови со фреквенција поголема од 1 %, значајна вредност за врзаната нерамнотежа ($D' \geq 0,05$) беше добиена за 67,85 % (19/28) од HLA-A-B хаплотиповите, 38,7 % (12/31) од HLA-A-DRB1 хаплотиповите, 65,62 % (21/32) од HLA-A-C хаплотиповите, 70,96 % (22/31) од HLA-B-DRB1 хаплотиповите и 85,18 % (23/27) од HLA-B-C хаплотиповите. Највисока вредност за D' ($D'=1$) беше забележана за следниве хаплотипови: HLA-B*08-C*07, HLA-B*51-C*14, HLA-B*14-C*08, HLA-B*49-C*07 и HLA-B*56-C*01. Најчести HLA-A-B хаплотипови во македонската популација беа HLA-A*02-B*51, HLA-A*02-B*18, HLA-A*02-B*44 и HLA-A*02-B*35, што е слично како кај Србите и Хрватите (128, 131). Ако ги споредиме нашите податоци со оние за Источноевропските Американци (Американци кои имаат потекло од Источна Европа), објавени од Маск и соработниците, (163) можеме да видиме дека четири хаплотипови од првите пет се во првите 10 во оваа студија, со исклучок на HLA-A*02-B*35 која е на 20-тата позиција во оваа студија. Трите најчести HLA-B-DRB1 хаплотипови во нашиот примерок беа HLA-B*18-DRB1*11 (7,6 %), B*35-DRB1*11 (5,4 %) и B*08-DRB1*03 (5,4 %). Кај останатите европски популации, како и кај Србите и Хрватите најчест хаплотип е HLA-B*08-DRB1*03 (51, 128, 131). Во однос на примерокот кај Американци по потекло од Источна Европа, HLA-B*08:01-DRB1*03:01 е следен од HLA-B*07-DRB1*15:01 и HLA-B*44:03-DRB1*07:01, кои се на 5-тата и на 11-тата позиција во нашиот примерок.

Во однос на трилокусните хаплотипови, во македонската популација детектиравме 204 HLA-A-B-C хаплотипови, но само 22 имаа фреквенции повисоки од 1 %. Најчести хаплотипови беа: HLA-A*02-B*18-C*07 (4,0 %), HLA-A*01-B*08-C*07 (3,3 %) и HLA-A*02-B*35-C*04 (2,4 %). Во Западна Европа и во Италија, најчест хаплотип е HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01 (51, 155), додека кај Албанците најчест е HLA-A*24-B*35-C*04 (127). Со анализа на HLA-A-B-DRB1 хаплотиповите беше утврдено дека кај македонската популација најчести се: HLA-A*02-B*18-DRB1*11 (2,9 %) и HLA-A*01-B*08-DRB1*03 (2,7 %). HLA-A*02-B*18-DRB1*11 е исто така најчест хаплотип кај: Грците, Албанците и Бугарите (126, 127, 146), додека кај Србите, Хрватите, Русите, популациите од Западна и од Јужна Европа, најчест е хаплотипот HLA-A*01-B*08-DRB1*03 (51, 128, 131, 155). Овој хаплотип е доминантен кај европските популации, па затоа многу автори го нарекуваат хаплотип карактеристичен за белата раса (51, 145, 164 – 166).

Силната врзана нерамнотежа помеѓу HLA-B*08 и HLA-C*07 го прави хаплотипот HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 (2,7 %) најчест во нашата популација. Тој е следен од HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 (2,6 %) и HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11 (1,5 %). HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 е, исто така, најзастапен хаплотип кај повеќето европски и соседни популации (48, 51, 131, 154, 163, 167), со исклучок на Финска каде што најчест хаплотип е HLA-A*03-B*35-DRB1*01:01 (156). Само 8 од вкупно 373 четирилокусни хаплотипови имаа фреквенција повисока од 1 % во нашиот примерок, при што кумулативната честота изнесуваше 12,76 % .

Добиените податоци за фреквенцијата на ХЛА алелите и хаплотиповите се користат за одредување на степенот на генетска сличност преку споредба со други популации (40, 53). Middleton и соработниците (43, 51) ги обединиле сите објавени податоци за фреквенцијата на алелите и хаплотиповите, како и податоците за потеклото на испитуваната популација, бројот на испитаници и техниките на типизација. Оваа база е достапна на www.allelefrequencies.net и претставува основен извор на информации за географската дистрибуција на алелите и хаплотиповите и за споредба на сопствените со други популации (40, 51, 54). Во неа се содржани податоци за ХЛА полиморфизмот на 1.100 популации од целиот свет (www.allelefrequencies.net, февруари 2018). Испитувањето на степенот на сличност на нашата популација беше направено со 239.879 испитаници од 30 популации за коишто беше достапна фреквенцијата за HLA-A, -B и -DRB1 локусите (51). На овој начин, врз основа на достапни податоци, филогенетска анализа била правена и од други автори (155, 168, 169). Одбрани се популации од Европа и од светот каде што има бело население. Врз основа на вредностите за генетската дистанца, македонската популација има најголем степен на генетска сличност со соседните популации, како и со популациите кои живеат во Централен Балкан. На дендрограмот е прикажано дека Македонците се блиски со: Албанците, Грците, Бугарите и Турците, а потоа и со: Романците, Србите, Хрватите и Босанците со кои формираат еден поголем кластер. Популациите од Западна и од Северна Европа се групирани во друг кластер подалеку од популациите од Југоисточна Европа. Слична позиција за Македонците, според фреквенциите достапни на www.allelefrequencies.net, е добиена и од други автори (128, 154). Популациите кои имаат многу слични алели имаат помали генетски дистанци, што

укажува дека се блиску поврзани и имаат заеднички претходник. Најмалата вредност за Nei's генетската дистанца за локусите HLA-A, -B и -DRB1 е пресметана за македонската популација со Грција (0,013111) и Албанците (0,021698). Тоа се должи на фактот што трите најчести хаплотипови кај македонската популација се исто така најчести и кај овие две популации.

Во оваа студија, покрај податоците кои се изнесени досега, ХЛА-типизација е направена и на група 2. Таа ги опфаќа доброволните дарители, здрави лица, кои се зачлениле во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина. МКДРКС е оформен во 2010 година со цел да им се овозможи лечење на пациентите на кои им е неопходна трансплантација на ХМК, а кои немаат соодветен сроден дарител. Во МКДРКС може да се зачлени секое здраво лице на возраст од 18 до 50 години, а пријавувањето и дарувањето ХМК е доброволно и не се плаќа. Пријавувањето во Регистарот се одвива на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, со пополнување и потпишување на информирана согласност и давање примерок крв за ХЛА-типизација. Станува збор за хетероген примерок, каде што испитаниците потекнуваат од целата територија на Република Македонија, а според националната припадност 83,25 % се изјасниле како Македонци, 8,30 % Албанци и 4,93 % како Македонци муслимани.

Во МКДРКС беа анализирани HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелските и хаплотипските фреквенции за Македонците, Албанците и Македонците муслимани, а во група од 566 Македонци беше одредена и фреквенцијата на HLA-DQA1 и HLA-DQB1 алелските групи и шестлокусните хаплотипови. Вредностите за фреквенциите на HLA-A, -B, -C и -DRB1 алелските групи кај трите популации беа слични со претходнообјавените резултати (154, 170). Позначајна разлика беше забележана во фреквенцијата на неколку алелски групи. Во HLA-A локусот, HLA-A*31 алелската група имала фреквенција од 7,2 % кај групата на Македонци муслимани и се наоѓала на 5-тата позиција, за разлика од Македонците и Албанците кај коишто фреквенцијата била многу пониска (1,6 % и 1,1 %, соодветно) и HLA-A*29, која кај Македонците муслимани имала фреквенција од 5,2 %, кај Македонците само 1,5 %, а не е забележана кај Албанците. Фреквенција поголема од 5 % за HLA-A*29 е забележана во Бразил и во други земји од Јужна Америка, Шпанија, Португалија, Велика Британија и Норвешка (51, 171). Кај Македонците муслимани, алелската група HLA-DRB1*14 имала фреквенција од 17,1 %, за разлика од Албанците (4,2 %) и Македонците (6,7 %). Не е забележана фреквенција за HLA-DRB1*14 поголема од 10 % во друга популација (51). Во однос на четирилокусните хаплотипови, најчест хаплотип кај Албанците и кај Македонците муслимани беше HLA-A*02-B*18-C*07-DRB11, кој е истовремено најчест и кај Грците и кај Албанците од Косово и од Албанија (127, 146, 154). Интересен за спомнување е хаплотипот HLA-A*33-B*14-C*08-DRB1*04 кој е втор по честота кај Македонците муслимани со 5,2 %, а не е детектиран во групата на Македонци и Албанци во МКДРКС. Според податоците на www.allelefrequency.net, овој хаплотип е присутен кај: Грците, Турците, Хрватите, Романците, шпанското и португалското малцинство во Германскиот регистар и Израел со фреквенција под 0,2 % (51).

Фреквенцијата на HLA-DQA1 и HLA-DQB1 алелските групи е испитана само во групата на 566 Македонци од МКДРКС. Најчести HLA-DQA1 алелски групи беа HLA-DQA1*01 и HLA-DQA1*05, додека во HLA-DQB1 генскиот локус најзастапени беа HLA-DQB1*05, HLA-DQB1*03 и HLA-DQB1*06. Слична фреквенција на HLA-DQ алелските групи е детектирана и кај останатите европски популации (51, 128, 130).

Добиени се вкупно 543 шестлокусни хаплотипови (HLA-A-B-C-DRB1-DQA1-DQB1), од кои само 8 имаат фреквенција повисока од 1 % и кумулативно, на нив отпаѓаат 15,39 % од сите хаплотипови. Слична кумулативна вредност за најчестите петлокусни хаплотипови е добиена кај 338 испитаници од популацијата на Италија, каде што 8 хаплотипови со фреквенција над 1 % имаат кумулативна вредност од 13,92 % (155). Кај 200 испитаници од популацијата во Полска (172) 10 хаплотипови со фреквенција над 1 % имале кумулативна честота од 17,64 % . Помала хетерогеност е добиена за популацијата на Финска, каде што во група од 504 испитаници, 14 хаплотипови со фреквенција поголема од 1 % имале кумулативна честота од 31,12 % (173).

Најчести хаплотипови кои ги опфаќаат сите 6 локуси кај македонската популација беа: HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 (4,2 %) и HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (3,6 %), следени од HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 (1,36 %) и HLA-A*02-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (1,33 %). Хаплотипот HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 е најзастапен хаплотип кај популациите на Албанци од Албанија и од Косово, Италија и турското малцинство од DKMS (51, 127, 154, 155). Хаплотипот HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 е најчест кај Србите, Хрватите и останатите популации од Западна Европа (51, 128, 131). Хаплотипот HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 во фреквенција повисока од 1 % е детектиран кај Албанците, Шпанците и италијанското и турското малцинство во DKMS (51, 127, 174). Хаплотипот A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 е присутен кај македонската популација во првите 10 хаплотипови по честота (фреквенција 0,88 %), а втор по честота кај Србите и Италијанците (128, 155). Исто така, овој хаплотип е забележан со висока фреквенција (>1 %) и кај популацијата од Ерменија, Тунис, Португалија и кај Латиноамериканците кои живеат во Америка (51, 122, 148, 175). Во студиите објавени за популациите од: Хрватска, Бугарија, Полска, Германија, Франција, Финска и Ирска (48, 131, 169, 172, 173, 176, 177) не е забележан овој хаплотип. Заради тоа, во многу студии, овој хаплотип е означен како медитерански хаплотип (175, 178, 179).

Со оглед на фактот дека на фреквенцијата на ХЛА алелите и хаплотиповите влијае и бројот на испитаници (54), направивме споредба помеѓу ХЛА алелските и хаплотипските фреквенции меѓу двете групи на испитаници со македонско потекло. Во однос на ХЛА алелските групи, фреквенцијата не покажа значајна разлика помеѓу двете групи. Статистички значајна разлика ($p < 0,05$) беше забележана само за 3 алелски групи. HLA-A*32 беше детектиран почесто во МКДРКС ($p = 0,0444$), додека HLA-C*04 беше почест во фамилијарно дефинираниот примерок ($p = 0,048531$). Присуството на HLA-A*37 беше детектирано само во еден примерок од фамилијарно дефинираната

група. Хаплотиповите HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03 и HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 се на прво и второ место во двете групи (4,0 % и 3,8 % во МКДРКС и 2,7 % и 2,6 % во фамилијарно дефинираниот примерок). Хаплотипот HLA-A*02-B*27-C*02-DRB1*16 беше рангиран на позиција број 3 во МКДРКС (1,4 %), додека во групата 1 беше на позиција 13 според честотата (0,38 %). Хаплотипот A*03-B*35-C*04-DRB1*01 има фреквенција од 1,04 % во групата 1, а во примерокот од МКДРКС се наоѓа на 67-та позиција со фреквенција од 0,28 % . Хаплотипот HLA-A*02-B*51-C*15-DRB1*16 е на шестата позиција во МКДРКС со фреквенција од 1,11 %, а не е воопшто детектиран кај фамилијарно дефинираниот примерок. Разликите кои се детектирани меѓу двете групи, делумно може да се должат на различниот број испитаници (1.283 во МКДРКС наспроти 286 во фамилијарно дефинираниот примерок) и заради фактот што е можно да постојат членови од иста фамилија меѓу дарителите во МКДРКС.

Познавањето на алелската и хаплотипската фреквенција кај одредена популација има практично значење во планирањето на стратегиите за регрутирање на нови дарители на ХМК, како и на пристапот при барањето на совпадлив дарител за одреден пациент. Бројни фактори влијаат на брзината и на успешноста во пронаоѓањето на соодветен дарител за одреден пациент. Еден од тие фактори е големината на Регистарот. Muller и соработниците (56) заклучиле дека веројатноста за пронаоѓање на HLA-A-B-DR фенотипски совпадлив дарител изнесува околу 66 % ако во Регистарот има 150.000 дарители, но и дека се потребни околу 10 000 нови дарители за таа веројатност се зголеми за 1 % . Ако се земе предвид нивниот регистар, 100 000 нови дарители на Регистар со милион ја зголемуваат веројатноста од 85 % на 86 % . Авторите заклучуваат дека со зголемувањето на бројот на дарители во Регистарот, се зголемува и шансата за наоѓање на совпадлив дарител, но дека не е можно да се достигне веројатност од 100 % . Причина за тоа е екстремниот ХЛА полиморфизам, како и повторувањето на исти хаплотипови. Поефикасната стратегија за зголемување на бројот на дарители би требало да биде насочена кон популациите на дарители со ретки хаплотипови, како што наведуваат и други автори (167). Schmidt и соработниците (167), врз основа на пресметаните можни хаплотипови, кај 8.862 дарители во Германскиот регистар, направиле проценка за наоѓањето на дарител со различен степен на совпадливост во однос на пациентот. За пронаоѓање на дарител совпадлив во локусите HLA-A, -B, -C и -DRB1 добиле веројатност од 67,8 % во Регистар со милион дарители, а 85,9 % во Регистар со 7 милиони дарители. Големината на Регистарот не е единствениот параметар кој укажува на ефикасноста на пронаоѓањето на соодветен дарител (123). Современите стратегии се насочени кон регрутирање на млади дарители од машки пол, како и на малцинствата со цел да се обезбеди разноликост на хаплотиповите во Регистарот (56, 167).

За скусување на времето потребно за барање на дарител, значајно е нивото на резолуција на типизацијата на дарителите, а на тоа влијаат и економските можности на Регистарот. Типизацијата на сите локуси релевантни за исходот од трансплантацијата се покажала како ефикасен пристап во стратегијата за типизирање во Регистрите со голем број на дарители (180). Исто така, од главниот Регистар во Велика Британија (The Antony Nolan Trust) во 2011 година, со намера се регрутирани 10 000 дарители од машки пол на кои им е направена типизација со висока резолуција за сите пет локуси

(123). Според стандардите на WMDA (120), дарителот се исклучува од Регистарот со наполнети 60 години, па затоа една од задачите на МКДРКС треба да биде типизација со висока резолуција на помладите, потенцијални дарители зачленети во Регистарот, со што ќе се овозможи наоѓање на соодветен дарител за што поголем број на пациенти кај нашата популација, а кои ќе бидат достапни за пребарување во текот на повеќе години.

Furst и соработниците (83) при ретроспективна анализа на 2.646 германски пациенти покажале дека на исходот од трансплантацијата негативно влијаело и непостоењето на дарител во Националниот регистар, односно дека пациентите трансплантирани од дарител од Националниот регистар имале подобро преживување од болните кои добиле ХМК од интернационален дарител. На тоа влијае брзината на пронаоѓање на дарител, односно правремената трансплантација. Исто така, авторите наведуваат дека и разликите кај другите имунолошки важни локуси на хромозомот 6, како и нон-ХЛА полиморфизмите, кои можат да влијаат врз исходот на трансплантацијата, можат да бидат многу почести кај болните со ретки фенотипови и доколку дарителот е со различно етничко потекло од пациентот (96).

Добиените податоци за честотата на ХЛА алелските групи и хаплотиповите кај македонската популација и дарителите во МКДРКС придонесуваат за донесување на стратегии за регрутирање на нови дарители во МКДРКС и типизирање на дарителите со висока резолуција.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

- Врз основа на фреквенцијата на алелските групи во локусите HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1 кај македонската популација, утврдено е дека 47 од вкупно 57 (82,45 %) во ХЛА класа 1 и 12 од вкупно 13 (92,13 %) во ХЛА класа 2 имаат фреквенција над 1 % .
- Алелски групи кои имаат фреквенција над 10 % кај македонската популација се: A*02, A*24, A*01, A*03, B*35, B*18, B*51, C*07, C*04, C*12, DRB1*11 и DRB1*16.
- Значајно здружување помеѓу алелските групи ($D' \geq 0,05$) меѓу хаплотиповите кои имаат фреквенција >1 % е добиено за 67,85 % од HLA-A-B хаплотиповите, 38,7 % од HLA-A-DRB1 хаплотиповите, 65,62 % од HLA-A-C хаплотиповите, 70,96 % од HLA-B-DRB1 хаплотиповите и 85,18 % од HLA-B-C хаплотиповите. Највисока вредност ($D'=1$) беше забележана во 5 HLA-B-C хаплотипови.
- Најчести четирилокусни хаплотипови кај македонската популација се: HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03, HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11 и HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11.
- Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина има 1.541 доброволни дарители, а според националната припадност најзастапени се: Македонците (83,25 %), Албанците (8,30 %) и Македонците муслимани (4,93 %).
- Најчест хаплотип кај Македонците во МКДРКС е HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03, додека кај Албанците и Македонците муслимани најзастапен е HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11.
- Најчест проширен хаплотип кај Македонците во МКДРКС е HLA-A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 со фреквенција од 4,22 % .
- Македонската популација има најголем степен на сличност со соседните популации, популациите кои живеат во Централен Балкан, а поголема генетска дистанца е пресметана за популациите од Западна и од Северна Европа.
- Стратегијата за развој на МКДРКС треба да биде насочена кон зголемување на бројот на млади доброволни дарители од различни националности со цел зголемување на шансите за несродна трансплантација од национален дарител за пациентите на кои истата им е потребна.

7. БИБЛИОГРАФИЈА

1. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* 1958; Jul-Oct:20(1-4):156 – 66.
2. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature.* 1958 Jun 21;181(4625):1735 – 6.
3. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest.* 1958 Dec; 37(12):1756 – 63.
4. Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F. The HL-A system: evidence of a third sub-locus. *Scand J Haematol.* 1970;7(3):195 – 200.
5. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens.* 2009;74(5):101 – 16.
6. Kissmeyer-Nielsen F, Thorsby E. Human transplantation antigens. *Transpl Rev.* 1970;4:1 – 176.
7. Vredevoe D, Terasaki P, Mickey M, Glassock R, Merrill J, Murray J. Serotyping of human lymphocyte antigens. III. Long term kidney homograft survivors. In: Amos DB, van Rood JJ, eds. *Histocompat Test.* 1965;(Copenhagen: Munksgaard):25 – 35.
8. Brent L. A history of transplantation immunology. San Diego: Academic Press; 1997.
9. Amiel J. Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM, eds. *Histocompat Test.* 1967;(Copenhagen: Munksgaard):79 – 81.
10. McDevitt HO, Tyan ML. Genetic control of the antibody response in inbred mice. Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatibility (H-2) locus. *J Exp Med.* 1968;Jul 1;128:1 – 11.
11. Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett W, Strominger J, Wiley D. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 1987;329:506 – 12.
12. Erlich H. HLA DNA typing: Past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012;80(1):1 – 11.
13. Kindt J., Thomas; Goldsby A., Richard; Osborne A. B. *Immunology.* Sixth edit. W.H. Freeman and Company; 2007.
14. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 2009 Jan;54(1):15 – 39.
15. Travers P. Immune recognition and the MHC, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.). *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; 2000. 11 – 38 p.
16. Klein J. Evolution and function of the major histocompatibility complex: facts and speculations. In: Gotze D, ed. *The Major Histocompatibility System in Man and Animals.* New York: Springer-Verlag; 1976. 339 – 378 p.
17. Undlien DE, Lie B a, Thorsby E. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genet.* 2001;17(2):93 – 100.
18. Robinson J, Halliwell J a., Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2014;43(D1):D423 – 31.

19. Gebel H, Pollack M, Bray R. The HLA System, In: Roback, J.D., Grossman, B.J., Harris, T., Hillyer, C.D. (Eds.). Technical Manual. American Association of Blood Banks, Bethesda; 2011.
20. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 2004 Dec;5(12):889 – 99.
21. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular Immunology. 6th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 2010.
22. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;Sep 7:343 (10):702 – 9.
23. Sullivan L, Hoare H, McCluskey J, Rossjohn J, Brooks A. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2006;27:413 – 20.
24. Kalotra V, Lall M, Verma I, Kaur A, A K. The HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism and its association with soluble HLA-G levels in women with recurrent miscarriages. *HLA.* 2017;Dec 2017.
25. Manvailer LFS, Wowk PF, Mattar SB, da Siva JS, da Graca Bicalho M, Roxo VMMS. HLA-F polymorphisms in a Euro-Brazilian population from Southern Brazil. *Tissue Antigens.* 2014;84(6):554 – 9.
26. Hosseini E, Schwarer A, Jalali A, Ghasemzadeh M. The impact of HLA-E polymorphisms on relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2013;37:516 – 9.
27. Tait B. HLA class I expression on human cancer cells. Implications for effective immunotherapy. *Hum Immunol.* 2000;61:158 – 65.
28. Sanchez-Fueyo A, Strom T. Immunologic Basis of Graft Rejection and Tolerance Following Transplantation of Liver or Other Solid Organs. *Gastroenterology.* 2011;Jan; 140-1.
29. Clarkson M, Sayegh M. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation.* 2005;Sep 15:80(5):555 – 63.
30. Afzal i B, Lechler R, Hernandez-Fuentes M. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens.* 2007;69:545 – 56.
31. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med.* 1998 Oct 22;339(17):1177 – 85.
32. Ceppellini R, Curtoni E, Mattiuz P, Miggiano C, Scudeller G, Serra A. Genetics of leukocyte antigens: a family study of segregation and linkage., In: Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., Tosi, R.M. (Eds.). *Histocompatibility Testing.* Munksgaard, Copenhagen; 1967. 149 – 187 p.

33. Carrington M. Recombination within the human MHC. *Immunol Rev.* 1999;167:245 – 56.
34. Muro M, Moya-Quiles M, Marin L, Torio A, Vallejo C, Moraleda J, et al. Report of recombinations between HLA loci within two families: utility of high resolution typing. *Clin Transpl.* 2002;16:329 – 33.
35. Bodmer J. HLA nomenclature, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.). *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; 2000. 40 – 44 p.
36. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert D, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for Factors of the HLA System, 1996. *Hum Immunol.* 1997;128(17):98 – 128.
37. Hurley C, Setterholm M, Lau M, Pollack M, Noreen H, Howard A, et al. Hematopoietic stem cell donor registry strategies for assigning search determinants and matching relationships. *Bone Marrow Transpl.* 2004;33:443 – 50.
38. Tiercy J. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transpl Immunol.* 2002;9:173 – 80.
39. Spurgin L, Richardson D. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proc Biol Sci.* 2010;277:979 – 88.
40. Solberg O, Mack S, Lancaster A, Single R, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol.* 2008;69:443 – 64.
41. Riccio M, Buhler S, Nunes J, Vangenot C, Cuenod M, Currat M, et al. 16(th) IHIW: analysis of HLA population data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). *Int J Immunogenet.* 2013;40:21 – 30.
42. Fernandez Vina M, Hollenbach J, Lyke K, Szein M, Maiers M, Klitz W, et al. Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci.* 2012;367:820 – 9.
43. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens.* 2003;61:403 – 7.
44. Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, He J, Hurley CK, Middleton D, et al. Common and Well-Documented HLA Alleles: 2012 Update to the CWD Catalogue. *Tissue Antigens.* 2013;81(4):194 – 203.
45. Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Middleton D, Sauter J, Buhler S, McCabe A, et al. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *Hla.* 2017;89(2):104 – 13.
46. Gourraud P, Barnette T, Vidan-Jeras B, Cambon-Thomsen A. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transpl Immunol.* 2005;14:245 – 53.
47. Sanchez-Mazas A, Nunes J. *HLA data analysis in anthropology: basic theory and practice.* 2006;

48. Schmidt AH, Solloch U V, Pingel J, Baier D, Böhme I, Dubicka K, et al. High-resolution human leukocyte antigen allele and haplotype frequencies of the Polish population based on 20, 653 stem cell donors. *Hum Immunol.* 2011 Jul;72(7):558 – 65.
49. Rao X, De Boer R, van Baarle D, Maiers M, Kesmir C. Complementarity of Binding Motifs is a General Property of HLA-A and HLA-B Molecules and Does Not Seem to Effect HLA Haplotype Composition. *Front Immunol.* 2013;4:374.
50. Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):477 – 85.
51. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D784-8.
52. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens.* 2014 May;83(5):307 – 23.
53. Schipper R, D'Amato J. Population genetics of the human major histocompatibility complex, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.). *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London, ; 2000. 395 – 415 p.
54. Sanchez-Mazas a., Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little a. M, Bekmane U, et al. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet.* 2012;39:459 – 76.
55. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan 1;39(Database issue):D913-9.
56. Müller CR, Ehninger G, Goldmann SF. Gene and haplotype frequencies for the loci hLA-A, hLA-B, and hLA-DR based on over 13, 000 german blood donors. *Hum Immunol.* 2003;64(1):137 – 51.
57. Pingel J, Solloch U V., Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: How can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol.* 2013 Mar;74(3):330 – 40.
58. Howell W. HLA and disease: guilt by association. *Int J Immunogenet.* 2014;41:1 – 12.
59. Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens.* 2009;73:1 – 8.
60. Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet.* 2008 Apr 25;4(4):e1000024.
61. Barrett J, Thomson W, Ollier W. HLA and disease association: statistical consideration, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.). *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; 2000. 410 – 415 p.

62. Van Heemst J, Van Der Woude D, Huizinga TW, Toes RE. HLA and rheumatoid arthritis: How do they connect? *Ann Med.* 2014;46(5):304 – 10.
63. Berka N, Gill J, Liacini A, O'Bryan T, Khan F. Human leukocyte antigen (HLA) and pharmacogenetics: screening for HLA-B*57:01 among human immunodeficiency virus-positive patients from southern Alberta. *Hum Immunol.* 2012;73:164 – 7.
64. Nelson K. HLA typing, In: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Sheare, W.T., Kotzin, B.L., Schroeder, H.W. (Eds.). In: *Clinical Immunology - principle and practice.* Mosby International Limited; 2001. p. 121 – 9.
65. Schreuder G. HLA typing by alloantibodies and monoclonal antibodies. In: Bidwell, JL, Navarrete, C (Eds) *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; p. 49 – 63.
66. Lebedeva T, Ohashi M, Huang A, Vasconcellos S, Flesch S, Yu N. Emerging new alleles suggest high diversity of HLA-C locus. *Tissue Antigens.* 2005;65:101 – 6.
67. Mytilineos J, Christ U, Lempert M, Opelz G. Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens.* 1997;50:395 – 400.
68. Lazaro A, Xiao Y, Cao K, Masaberg C, Nichol L, Ng J, et al. Twenty-three novel alleles increase diversity at the HLA-C locus. *Tissue Antigens.* 2008;71:560 – 3.
69. Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens.* 2001;58:299 – 307.
70. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, et al. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens.* 2012;80:305 – 16.
71. Bunce M. PCR-SSP typing. In: Bidwell, JL, Navarrete, C (Eds) *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; 2000. p. 149 – 86.
72. Middleton D. PCR-SSOP typing. In: Bidwell, JL, Navarrete, C (Eds) *Histocompatibility testing.* Imperial College Press, London; 2000. p. 187 – 212.
73. Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Heron S, Rogers M, Slavich L, et al. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Hum Immunol.* 2010;71:1033 – 42.
74. Marsh S, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Dupont B, Erlich H, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.* 2010;75:291 – 455.
75. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D1222-7.
76. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008 Oct;20(5):588 – 93.
77. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007 Dec 15;110(13):4576 – 83.

78. Yang K, Chen M, Lee S, Lin C, Tsai M, Chiu H, et al. New allele name of some HLA-DRB1*1401: HLA-DRB1*1454. *Int J Immunogenet.* 2009;36:119 – 20.
79. Bettens F, Schanz U, Tiercy J. Lack of recognition of HLA class I mismatches outside alpha1/alpha2 domains by CD8+ alloreactive T lymphocytes: the HLA-B44 paradigm. *Tissue Antigens.* 2013;81:414 – 8.
80. Gratwohl A, Baldomero H, Sureda A. Indications for and current practice of allogeneic and autologous HSCT. In: Apperley, J, Carreras, E, Gluckman, E, Masszi, T (Eds) *Handbook on Haemopoietic Stem Cell Transplantation.* EBMT-ESH; 2012. p. 302 – 15.
81. Bray R, Hurley C, Kamani N, Woolfrey A, Muller C, Spellman S, et al. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2008;14:45 – 53.
82. Spellman S, Eapen M, Logan B, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm M, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood.* 2012;120:259 – 65.
83. Furst D, Muller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood.* 2013;122:3220 – 9.
84. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood.* 2002;99:4200 – 6.
85. Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2004;104:2976 – 80.
86. Flomenberg N, Baxter-Lowe L, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood.* 2004;104:1923 – 30.
87. Oudshoorn M, Horn P, Tilanus M, Yu N. Typing of potential and selected donors for transplant: methodology and resolution. *Tissue Antigens.* 2007;69(suppl 1):10 – 2.
88. Showel M, Fuchs EJ. Recent developments in HLA-haploidentical transplantations. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015;28(2 – 3):141 – 6.
89. Chen D, Zhou D, Guo D, Xu P, Chen B. Comparison of outcomes in hematological malignancies treated with haploidentical or HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation following myeloablative conditioning: A meta-analysis. Palaniyandi S, editor. *PLoS One.* 2018 Jan 30;13(1):e0191955.
90. Velardi A. Haplo-BMT: which approach? *Blood.* 2013;121:719 – 20.
91. Ciurea S, Champlin R. Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2013;19:180 – 4.

92. Fernandez Vina M, Heslop H, Barker J. New approaches in alternative donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2013;19:S91-96.
93. Ciurea SO, Cao K, Fernadez-Vina M, Kongtim P, Malki M Al, Fuchs E, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018 Jan 15 DOI:10.1038/s41409-017-0062-8
94. Brand A, Doxiadis I, Roelen D. On the role of HLA antibodies in hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens.* 2013;81:1 – 11.
95. Tiercy J-M, Villard J, Roosnek E. Selection of unrelated bone marrow donors by serology, molecular typing and cellular assays. *Transpl Immunol.* 2002 Aug;10 (2 – 3):215 – 21.
96. Tiercy J-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica.* 2016;101(6):680 – 7.
97. Spellman S, Setterholm M, Maiers M, Noreen H, Oudshoorn M, Fernandez-Vina M, et al. Advances in the selection of HLA-compatible donors: refinements in HLA typing and matching over the first 20 years of the National Marrow Donor Program Registry. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2008;14:37 – 44.
98. Horowitz M. How important is high resolution typing for unrelated allogeneic transplantation? How far do we go? *Best Pr Res Clin Haematol.* 2009;22:537 – 41.
99. Dehn J, Buck K, Maiers M, Confer D, Hartzman R, Kollman C, et al. 8/8 and 10/10 high-resolution match rate for the be the match unrelated donor registry. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):137 – 41.
100. Baxter-Lowe L, Maiers M, Spellman S, Haagensohn M, Wang T, Fernandez-Vina M, et al. HLA-A disparities illustrate challenges for ranking the impact of HLA mismatches on bone marrow transplant outcomes in the United States. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2009;15:971 – 81.
101. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood.* 2007;110:2235 – 41.
102. Woolfrey A, Klein J, Haagensohn M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2011;17:885 – 92.
103. Ruggeri L, Aversa F, Martelli M, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev.* 2006;214:202 – 18.
104. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:626 – 33.
105. Dupont B, Hsu K. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:634 – 43.

106. Venstrom J, Pittari G, Gooley T, Chewning J, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med.* 2012;367:805 – 16.
107. Fischer J, Kobbe G, Enczmann J, Haas R, Uhrberg M. The impact of HLA-C matching depends on the C1/C2 KIR ligand status in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics.* 2012;64:879 – 85.
108. Tiercy JM. HLA-C incompatibilities in allogeneic unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2014;5(MAY 19):5:216.
109. Weisdorf D, Spellman S, Haagenson M, Horowitz M, Lee S, Anasetti C, et al. Classification of HLA-matching for retrospective analysis of unrelated donor transplantation: revised definitions to predict survival. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2008;14:748 – 58.
110. Shaw B, Gooley T, Malkki M, Madrigal J, Begovich A, Horowitz M, et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2007;110:4560 – 6.
111. Fleischhauer K, Shaw B, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon J, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2012;13:366 – 74.
112. Zino E, Frumento G, Markt S, Sormani M, Ficara F, Di Terlizzi S, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood.* 2004;103:1417 – 24.
113. Gluckman E. Choice of the donor according to HLA typing and stem cell source. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T (Eds) *Handbook on Haemopoietic Stem Cell Transplantation.* EBMT-ESH; 2012. p. 91 – 107.
114. Scaradavou A. HLA-mismatched, noninherited maternal antigen-matched unrelated cord blood transplantations have superior survival: how HLA typing the cord blood donor's mother can move the field forward. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2012;18:1773 – 5.
115. van Rood J, Oudshoorn M. When selecting an HLA mismatched stem cell donor consider donor immune status. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:538 – 43.
116. Hurley C, Maiers M, Marsh S, Oudshoorn M. Overview of registries, HLA typing and diversity, and search algorithms. *Tissue Antigens.* 2007;69 Suppl 1:3 – 5.
117. Petersdorf E. The World Marrow Donor Association: 20 years of international collaboration for the support of unrelated donor and cord blood hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2010;45:807 – 10.
118. Shaw B, Ball L, Beksac M, Bengtsson M, Confer D, Diler S, et al. Donor safety: the role of the WMDA in ensuring the safety of volunteer unrelated donors: clinical and ethical considerations. *Bone Marrow Transpl.* 2010;45:832 – 8.
119. Hurley C, Raffoux C, World Marrow Donor A. World Marrow Donor Association: international standards for unrelated hematopoietic stem cell donor registries. *Bone Marrow Transpl.* 2004;34:103 – 10.

120. WMDA. International Standards for Unrelated Haematopoietic Stem Cell Donor Registries. www.wmda.info. 2017.
121. Tiercy J, Nicoloso G, Passweg J, Schanz U, Seger R, Chalandon Y, et al. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transpl.* 2007;40:515 – 22.
122. Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol.* 2007;68:779 – 88.
123. Lown R, Shaw B. Beating the odds: factors implicated in the speed and availability of unrelated haematopoietic cell donor provision. *Bone Marrow Transpl.* 2013;48:210 – 9.
124. Eberhard H, Madbouly A, Gourraud P, Balere M, Feldmann U, Gragert L, et al. Comparative validation of computer programs for haplotype frequency estimation from donor registry data. *Tissue Antigens.* 2013;82:93 – 105.
125. Schmidt A, Sauter J, Pingel J, Ehninger G. Toward an optimal global stem cell donor recruitment strategy. *PLoS One.* 2014;9:e86605.
126. Ivanova M, Rozemuller E, Tyufekchiev N, Michailova A, Tilanus M, Naumova E. HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations. *Tissue Antigens.* 2002 Dec;60(6):496 – 504.
127. Sulcebe G, Sanchez-Mazas a., Tiercy JM, Shyti E, Mone I, Ylli Z, et al. HLA allele and haplotype frequencies in the Albanian population and their relationship with the other European populations. *Int J Immunogenet.* 2009 Dec;36(6):337 – 43.
128. Andric Z, Popadic D, Jovanovic B, Jaglicic I, Bojic S. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. *Hum Immunol.* 2014 Mar;75(3):218-26.
129. Andrien M, Dupont E. HLA-A, -B, -Cw, -DPB1, -DQB1 and -DRB1 allele frequencies in a population from Belgium. *Hum Immunol.* 2004 Sep;65(9 – 10):865 – 6.
130. Vojvodić S, Ademović-Sazdanić D. Distribution of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 families of alleles and haplotypes in Vojvodina population. *Int J Immunogenet.* 2012 Dec;39(6):480 – 5.
131. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *Int J Immunogenet.* 2014 Jun;41(3):211 – 21.
132. Zahlavova L, Bendukidze N, Ivaskova E. HLA-A, -B, -Cw, -DPB1, -DQA1, -DQB1 and -DRB1 allele frequencies in a population from the Czech Republic. *Hum Immunol.* 2004 Sep;65(9 – 10):925 – 30.
133. Buhler S, Sanchez-Mazas A. HLA DNA sequence variation among human populations: Molecular signatures of demographic and selective events. *PLoS One.* 2011;6(2).
134. Riccio ME, Buhler S, Nunes JM, Vangenot C, Cuénod M, Currat M, et al. 16th IHIW: Analysis of HLA Population Data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). *Int J Immunogenet.* 2013;40(1):21 – 30.

135. Hristova-Dimcheva A. Molekularno definiranje na antigenite od klasa 2 (DR, DQ, DP) i nivna asociranost so odredeni zaboluvanja. 2004.
136. Petlichkovski A, Efinska-Mladenovska O, Trajkov D, Arsov T, Strezova A, Spiroski M. High-resolution typing of HLA-DRB1 locus in the Macedonian population. *Tissue Antigens*. 2004 Oct;64(4):486 – 91.
137. Hristova-Dimcheva A, Verduijn W, Schipper RF, Schreuder GM tH. HLA-DRB and -DQB1 polymorphism in the Macedonian population. *Tissue Antigens*. 2000 Jan; 55(1):53 – 6.
138. Djulejic E, Senev A, Kirijas M, Hristomanova S, Petlichkovski A, Trajkov D, et al. Allele frequency of HLA-DQB1 locus in Macedonian population. *Maced J Med Sci*. 2012;5:67 – 71.
139. Towner P. *Essential Molecular Biology*. Brown TA, . Oxford: Oxford University Press; 1995. 47 – 54 p.
140. Spiroski, Mirko; Arsov, Todor; Petlichkovski, Aleksandar; Strezova, Ana; Trajkov, Dejan; Efinska-Mladenovska O. Case Study: Macedonian Human DNA Bank (hDNAMKD) as a source for public health Genetics. *Heal Determ Scope New Public Heal*. 2005;33 – 44.
141. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005 Jan;1:47 – 50.
142. Klitz W, Stephens JC, Grote M, Carrington M. Discordant patterns of linkage disequilibrium of the peptide-transporter loci within the HLA class II region. *Am J Hum Genet*. 1995 Dec;57(6):1436 – 44.
143. Nei M. Genetic Distance between Populations. *Am Nat*. 1972;106:283 – 92.
144. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406 – 25.
145. Arnaiz-Villena a, Dimitroski K, Pacho a, Moscoso J, Gómez-Casado E, Silvera-Redondo C, et al. HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of the Greeks. *Tissue Antigens*. 2001;57(2):118 – 27.
146. Papassavas EC, Spyropoulou-Vlachou M, Papassavas AC, Schipper RF, Doxiadis IN, Stavropoulos-Giokas C. MHC class I and class II phenotype, gene, and haplotype frequencies in Greeks using molecular typing data. *Hum Immunol*. 2000 Jun;61(6):615 – 23.
147. Uyar FA, Dorak MT, Saruhan-Direskeneli G. Human leukocyte antigen-A, -B and -C alleles and human leukocyte antigen haplotypes in Turkey: relationship to other populations. *Tissue Antigens*. 2004 Aug;64(2):180 – 7.
148. Matevosyan L, Chattopadhyay S, Madelian V, Avagyan S, Nazaretyan M, Hyussian A, et al. HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 allele distribution in a large Armenian population sample. *Tissue Antigens*. 2011;78(1):21 – 30.
149. Crespi C, Mila J, Martinez-Pomar N, Etxagibel A, Munoz-Saa I, Priego D, et al. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens*.

- 2002;60:282 – 91.
150. Harbo HF, Riccio ME, Lorentzen AR, Utsi E, Myhr K-M, Mellgren SI, et al. Norwegian Sami differs significantly from other Norwegians according to their HLA profile. *Tissue Antigens*. 2010 Mar;75(3):207 – 17.
 151. Buhler S, Megarbane A, Lefranc G, Tiercy J-M, Sanchez-Mazas A. HLA-C molecular characterization of a Lebanese population and genetic structure of 39 populations from Europe to India-Pakistan. *Tissue Antigens*. 2006 Jul;68(1):44 – 57.
 152. Arnaiz-Villena A, Karin M, Bendikuze N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C, et al. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens*. 2001 Apr;57(4):308 – 17.
 153. Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Curtioni ES. HLA-A, -B and -DRB1 alleles in a population from Italy. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):973 – 4.
 154. Sulcebe G, Cuenod M, Sanchez-Mazas A, Tiercy J-M, Zhubi B, Shyti E, et al. Human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in an Albanian population from Kosovo. *Int J Immunogenet*. 2013;40(2):104 – 7.
 155. Rendine S, Ferrero NM, Sacchi N, Costa C, Pollichieni S, Amoroso A. Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high-resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Hum Immunol*. 2012;73(4):399 – 404.
 156. Wennerström A, Vlachopoulou E, Lahtela LE, Paakkanen R, Eronen KT, Seppänen M, et al. Diversity of extended HLA-DRB1 haplotypes in the Finnish population. *PLoS One*. 2013 Jan 21;8(11):e79690.
 157. Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, et al. HLA-A, -B, -DQA1, -DQB1 and -DRB1 alleles in a Basque population from Spain. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):1093 – 4.
 158. Shawkatova I. HLA-DPB1, -DQB1 and DRB1 alleles in a population from Slovakia. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):1076.
 159. Tonks S, Bodmer JG, Bodmer W. HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 allele frequencies in a population from Orkney, Scotland. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):1069 – 71.
 160. Kapustin S, Lyshchov A, Alexrova J, Imyanitov E, Blinov M. HLA-DPB1, -DQA1, -DQB1 and -DRB1 in a Slavic population from Northwest Russia. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):1067 – 8.
 161. Ferencik S, Gross-Wilde H. HLA-A, -B, -Cw, -DPB1, -DQA1, -DQB1 and -DRB1 allele frequencies in a population from Essen, Germany. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):945 – 7.
 162. Dubois V, Gebuhrer L. HLA-A, -B, -Cw, -DPB1, -DQB1 and -DRB1 alleles and KIR gene frequencies in a population from South East France. *Hum Immunol*. 2004 Sep;65(9 – 10):937 – 9.

163. Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, Ng J, Hurley CK. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens*. 2008;73:17-32.
164. Bortolotto A, Petry M, da Silveira J, Raya A, Fernandes S, Neumann J, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol*. 2012;73:180 – 5.
165. Leffell MS, Cherikh WS, Land G, Zachary AA. Improved Definition of Human Leukocyte Antigen Frequencies Among Minorities and Applicability to Estimates of Transplant Compatibility. *Transplantation*. 2007 Apr 15;83(7):964 – 72.
166. Ruiz TM, da Costa SMCM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graça Bicalho M. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. *Transplant Proc*. 2005 Jun;37(5):2293 – 6.
167. Schmidt AH, Baier D, Solloch U V, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, et al. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol*. 2009 Nov;70(11):895 – 902.
168. Arrieta-Bolanos E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott M, Fowles F, Shah A, et al. HLA-A, -B, -C, -DQB1, and -DRB1, 3, 4, 5 allele and haplotype frequencies in the Costa Rica Central Valley Population and its relationship to worldwide populations. *Hum Immunol*. 2011;72:80 – 6.
169. Dunne C, Crowley J, Hagan R, Rooney G, Lawlor E. HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 and DPB1 alleles and haplotypes in the genetically homogenous Irish population. *Int J Immunogenet*. 2008;35:295 – 302.
170. Kirijas M, Genadieva Stavrik S, Senev A, Efinanska-Mladenovska O, Petlichkovski A. HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele and haplotype frequencies in the Macedonian population based on a family study. *Hum Immunol*. 2017;
171. Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RBOG, Carneiro FP, Gelinski JR, et al. HLA-A, B and DRB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from the north of Parana State. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;34(1):25 – 30.