

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Zorana P. Andrić

**Određivanje polimorfizma lokusa humanih
leukocitnih antigena u populaciji potencijalnih
davalaca matičnih ćelija hematopoeze u Srbiji**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Zorana P. Andrić

**Determination of human leukocyte antigen
locus polymorphisms in a population of
potential stem cell donors in Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Dušan Popadić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. **Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Ivana Novaković**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Bela Balint**, Vojnomedicinska akademija

Datum odbrane: _____

Određivanje polimorfizma lokusa humanih leukocitnih antigena u populaciji potencijalnih davalaca matičnih ćelija hematopoeze u Srbiji

Zorana P. Andrić

Sažetak

Uvod: Kompleks gena koji kodira sistema humanih leukocitnih antigen (HLA) je najpolimorfiji deo humanog genoma. Složenost polimorfizma HLA je posledica postojanja više genskih lokusa, velikog broja alela za većinu gena i kombinacija produkata ovih alela. Analize polimorfizma HLA i neravnoteže udruživanja alela, kao i razlike učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, imaju primenu prilikom izbora davaoca za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze i značaj u ispitivanju udruženosti HLA sa etiopatogenezom nekih bolesti. Do sada nije bilo podataka o učestalosti alela i haplotipova alela HLA u populaciji Srbije. Za potrebe transplantacije pacijenata sa ovih prostora, korišćene su dostupne učestalosti alela drugih populacija koje ne moraju nužno da budu identične našoj populaciji. Poznavanje polimorfizma HLA sopstvene populacije bi omogućilo skraćivanje vremena traženja davaoca i pravovremenu transplantaciju MČH. Takođe, ispitivanje polimorfizma HLA zdrave populacije Srbije je neophodan preduslov da bi se omogućilo dokazivanje relativnog rizika određenih alela HLA kod bolesnika u našoj zemlji.

Ciljevi istraživanja: Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ustanovi učestalost alela i haplotipova HLA u populaciji Srbije, da se ustanovi stepen genetske sličnosti sa drugim populacijama, kao i da se proceni optimalan broj davalaca u Registru davalaca kostne srži Srbije.

Ispitanici i metode: Ispitivanje je rađeno kod zdravih, nesrodnih osoba koje su se prijavile u Registar davalaca kostne srži Srbije. Kod 1992 ispitanika je retrospektivnom analizom određena učestalost alelskih grupa za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1, kao i učestalost haplotipova HLA-A-B, HLA-A-DRB1, HLA-B-DRB1 i HLA-A-B-DRB1. U podgrupi od 159 slučajno odabranih ispitanika su dodatno određene grupe alela za lokuse HLA-C i HLA-DQ i dobijena je učestalost grupa alela za ove lokuse, kao i učestalost haplotipova HLA-C-B, HLA-DRB1-DQB1 i HLA-A-B-C-DRB1-DQB1. Dodatno, kod 112 ispitanika kojima

su prethodno definisane grupe alela, urađena je tipizacija HLA testovima visoke rezolucije, a potom je određena učestalost alela za svih pet lokusa, kao i učestalost haplotipova dva, tri i pet lokusa. Izolacija DNK je rađena upotrebom QIAamptm DNA Blood Mini Kit-a, kao i na aparatu Maxwell 16 uz upotrebu Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit-a. Određivanje grupa alela ispitivanih lokusa je rađeno testovima niske/srednje rezolucije, a potom su testovima visoke rezolucije određivani aleli. HLA tipizacija metodom PCR-SSO je rađena upotrebom Dynal RELItm SSO HLA Typing Kit-a, a za HLA tipizaciju metodom PCR-SSP korišćeni su komercijalni kitovi Olerup SSPTM za nisku i visoku rezoluciju tipizacije. Za dobijanje učestalosti alela i haplotipova, kao i za testiranje održivosti pretpostavke o Hardy–Weinbergovoj ravnoteži lokusa HLA korišćen je program ARLEQUIN, verzija 3. 11. Populacija naših ispitanika je poređena sa 284222 osoba iz 46 populacija. Korišćenjem Ward-ove metode klasterizacije i Nei-ove distance za grupe alela HLA-A i HLA-B konstruisan je dendrogram za poređenje populacije Srbije sa drugim populacijama. Za racunanje D, D', Nei-ovih distanci i klasterizaciju korišćen je softverski paket R, verzija 3. 0. 1. Dendrogram je konstruisan pomoću rutina implementiranih u R paket ade4.

Rezultati: 86,14% ispitanika je rođeno u Srbiji, 98,89% živi na teritoriji Srbije, a 88,3% ispitanika se izjasnilo da su po nacionalnoj pripadnosti Srbi. Najučestalije grupe alela za lokus HLA-A su A*02 (29,5%), A*01 (14,2%), A*03 (11,3%) i A*24 (11,1%); za lokus HLA-B su B*35 (13,1%) i B*51 (12,8%); za lokus HLA-C su C*07 (24,8%), C*04 (13,5%), C*12 (13,5%) i C*06 (10%); za lokus HLA-DRB1 su DRB1*11 (16,9%), DRB1*13 (13,2%), DRB1*03 (10,9%) i DRB1*16 (10,9%); a za lokus HLA-DQB1 su DQB1*03 (33,3%) i DQB1*05 (33%). Najčešći haplotipovi koji čine lokusi HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 su A*01-B*08-DRB1*03 (5,91%), A*02-B*18-DRB1*11 (1,91%) i A*33-B*14-DRB1*01 (1,45%). Najučestaliji haplotip pet lokusa je A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (6,6%), zatim slede A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (2,5%), A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 (2,2%) i A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05 (2,2%). Najčešći aleli lokusa HLA-A su A*02:01 (27,23%), A*01:01 (12,05%), A*11:01 (8,93%), A*03:01 (8,48%) i A*24:02 (8,04%). Najčešći aleli lokusa HLA-B su B*51:01 (12,95%), B*18:01 (8,93%), B*35:01 (8,48%), B*08:01 (8,04%) i B*35:03 (6,25%). Najčešći aleli lokusa HLA-C su C*04:01 (15,18%), C*07:01 (15,18%), C*12:03 (12,50%), C*06:02 (10,71%), C*01:02 (8,04%) i C*02:02 (6,25%). Najučestaliji aleli lokusa HLA-DRB1 su DRB1*03:01

(11,16%), DRB1*16:01 (10,71%), DRB1*01:01 (8,93%), DRB1*13:02 (7,14%), DRB1*07:01 (7,14%), DRB1*11:01 (6,70%), DRB1*15:01 (5,80%), DRB1*11:04 (5,36%) i DRB1*14:54 (5,36%). Najučestaliji aleli lokusa HLA-DQB1 su DQB1*03:01 (16,52%), DQB1*05:01 (13,39%), DQB1*05:02 (12,05%), DQB1*02:01 (11,16%), DQB1*03:02 (9,82%), DQB1*05:03 (8,48%) i DQB1*06:04 (6,70%). Najučestaliji haplotipovi pet lokusa su A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (4,4%) i A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 (2,2%). Populacija Srbije ima najveći stepen genetske sličnosti sa susjednim populacijama, kao i populacijama koje žive na području centralnog Balkana, a potvrđena je veća genetska distanca u odnosu na populacije Zapadne Evrope. Verovatnoća pronalaženja nacionalnog davaoca podudarnog u HLA-A-B-DRB1 je 65% ukoliko bi Registar davalaca kostne srži Srbije imao 100 000 tipiziranih davalaca, a 90% ukoliko bi u Registru davalaca kostne srži Srbije bilo milion davalaca.

Zaključak: Rezultati ovog rada predstavljaju prvi put prikazane učestalosti alela i učestalosti očekivanih haplotipova za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u populaciji Srbije. Na osnovu dobijenog polimorfizma HLA, ustanovljen je stepen genetske sličnosti sa drugim populacijama. Takođe, na osnovu podataka o učestalosti alela napravljena je procena optimalnog broja davalaca u Registru davalaca kostne srži Srbije. Ovako dobijeni podaci predstavljaju osnov za dalja ispitivanja značaja alela HLA kod različitih grupa pacijenata u našoj populaciji.

KLJUČNE REČI: Humani leukocitni antigeni, polimorfizam, populacija Srbije, registar davalaca matičnih ćelija hematopoeze

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Transfuziologija

Determination of human leukocyte antigen locus polymorphisms in a population of potential stem cell donors in Serbia

Zorana P. Andric

Abstract

Introduction: The human leukocyte antigen (HLA) system proteins are products of the most polymorphic genetic system in humans. The complexity of HLA polymorphism is a consequence of multiple gene loci, a large number of alleles for most genes and combinations of these alleles. Analysis of HLA polymorphism and linkage disequilibrium of alleles, as well as analysis of differences in allele frequency and HLA haplotypes among populations, are applied in the selection of donors for hematopoietic stem cell (HSC) transplantation and have the importance in examining the association of HLA with etiopathogenesis of some diseases. There have been no data on the frequency of alleles and haplotypes of HLA alleles in the population of Serbia. For transplantation of patients from these region were used available allele frequencies of other populations that may not necessarily be identical to our population. Knowledge of HLA polymorphism in own population would allow reducing the search period and timely transplantation of HSCs. Also, knowledge of HLA polymorphism in healthy population of Serbia is a necessary prerequisite to enable the detection of the relative risk of certain HLA alleles for patients in our country.

Aims of the investigation: The aims of this study were to determine the frequency of HLA alleles and haplotypes in the population of Serbia, to determine the degree of genetic similarity to other populations, and to estimate the optimal number of donors in the Serbian Bone Marrow Donor Registry.

Individuals and methods: The study included healthy, unrelated, randomly selected individuals who were recruited as volunteer donors for Serbian Bone Marrow Donor Registry. Frequency of allelic groups of loci HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1, as well as the frequency of HLA-A-B, HLA-A-DRB1, HLA-B-DRB1 and HLA-A-B-DRB1 haplotypes were retrospective analyzed in 1992 individuals. In a subgroup of 159 randomly selected individuals were further defined allele groups for loci HLA-C and HLA-DQ, and

estimated the allele group frequencies and the frequency of HLA-C-B, HLA-DRB1-DQB1 and HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 haplotypes. In addition, for 112 individuals which were previously defined allele groups, were performed high resolution HLA typing and estimated frequency of alleles for all five loci and the frequency of two, three and five loci haplotypes. Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit or Maxwell 16 Purification Kit. Determining the allele groups are done with low/intermediate resolution, and then alleles defined by high-resolution typing. HLA typing by PCR-SSO was performed using Dynal RELItm SSO HLA Typing Kit, and for PCR-SSP low and high resolution HLA typing were used Olerup SSPTM. ARLEQUIN software package, version 3.11, applied for estimated allele and haplotype frequencies, as well as for testing Hardy–Weinberg equilibrium. The sample of our population was compared with 284,222 individuals from 46 different populations. Using Ward's method for clusterization and Nei's distances for HLA-A and HLA-B allele group frequencies, a dendrogram was constructed to compare the Serbian sample with other populations. For the calculation of D, D', Nei's distance and clustering has been used software package R, version 3.0.1. The dendrogram was produced with the routines implemented in R package ade4

Results: 86.14% of individuals were born and 98.89% live in Serbia. 88.3% of individuals are self-identified as Serbian nationality. The most common group of alleles of locus HLA-A are A*02 (29.5%), A*01 (14.2%), A*03 (11.3%) and A*24 (11.1%); for locus HLA-B are B*35 (13.1%) and B*51 (12.8%); for locus HLA-C are C*07 (24.8%), C*04 (13.5%), C*12 (13.5%) and C*06 (10%); for locus HLA-DRB1 were DRB1*11 (16.9%), DRB1*13 (13.2%), DRB1*03 (10.9%) and DRB1*16 (10.9%); and the HLA-DQB1 locus of the DQB1*03 (33.3%), and DQB1*05 (33%). The most common haplotypes formed by loci of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 are A*01-B*08-DRB1*03 (5.91%), A*02-B*18-DRB1*11 (1.91%) and A*33-B*14-DRB1*01 (1.45%). The most common haplotypes formed by all five loci is A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (6.6%), followed by A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (2.5%), A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 (2.2%) and A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05 (2.2%). The most common alleles for HLA-A are A*02:01 (27.23%), A*01:01 (12.05%), A*11:01 (8.93%), A*03:01 (8.48%) and A*24:02 (8.04%). The most common alleles for HLA-B are B*51:01 (12.95%), B*18:01 (8.93%), B*35:01 (8.48%), B*08:01 (8.04%) and B*35:03 (6.25%).

The most common alleles for HLA-C are C*04:01 (15.18%), C*07:01 (15.18%), C*12:03 (12.50%), C*06:02 (10.71%), C*01:02 (8.04%) and C*02:02 (6.25%). The most common alleles for HLA-DRB1 are DRB1*03:01 (11.16%), DRB1*16:01 (10.71%), DRB1*01:01 (8.93%), DRB1*13:02 (7.14%), DRB1*07:01 (7.14%), DRB1*11:01 (6.70%), DRB1*15:01 (5.80%), DRB1*11:04 (5.36%) and DRB1*14:54 (5.36%). The most common alleles for HLA-DQB1 are DQB1*03:01 (16.52%), DQB1*05:01 (13.39%), DQB1*05:02 (12.05%), DQB1*02:01 (11.16%), DQB1*03:02 (9.82%), DQB1*05:03 (8.48%) and DQB1*06:04 (6.70%). The most common haplotypes of alleles formed by all five loci are A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (4.4%) and A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 (2.2%). The Serbian population is closely related to the neighboring populations, as well as to the populations living in the central Balkan. The greater genetic distance in relation to the population of Western Europe was confirmed. The probability of finding a HLA-A-B-DRB1 matched national donor is 65% if the Serbian Bone Marrow Donor Registry had 100 000 typed donors, and 90% if the Serbian Bone Marrow Donor Registry had million donors.

Conclusions: The results of this work are shown for the first time alleles frequency and frequency of expected haplotypes of alleles for the loci of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 in Serbian population. Based on the obtained HLA polymorphism, degree of genetic similarity to other populations is established. Also, based on allele frequency data, the optimal number of donors in Serbian Bone Marrow Donor Registry was estimated. These results will be useful in the future disease association study in our population.

KEY WORDS: Human leukocyte antigens, polymorphism, Serbian population, bone marrow donor registry

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Transfusion Medicine

SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
1.1	ISTORIJAT OTKRIĆA HUMANIH LEUKOCITNIH ANTIGENA	2
1.2	GENSKA ORGANIZACIJA LOKUSA HLA	3
1.3	ANTIGENI HLA.....	5
1.3.1	BIOHEMIJSKA STRUKTURA HLA.....	5
1.3.1.1	Biohemijska struktura antigena klase I.....	5
1.3.1.2	Biohemijska struktura antigena klase II.....	6
1.3.2	TKIVNA DISTRIBUCIJA HLA	7
1.3.3	BIOLOŠKA ULOGA HLA.....	8
1.3.3.1	Uloga HLA u prezentaciji peptida	9
1.3.3.2	Uloga HLA u imunologiji transplantacije	11
1.4	NASLEĐIVANJE HLA.....	12
1.5	NOMENKLATURA HLA.....	13
1.5.1	NOMENKLATURA ANTIGENA	13
1.5.2	NOMENKLATURA ALELA	14
1.6	POLIMORFIZAM HLA	15
1.6.1	POREKLO POLIMORFIZMA HLA	16
1.6.2	POLIMORFIZAM ALELA HLA.....	18
1.6.3	NERAVNOTEŽA UDRUŽIVANJA ALELA HLA	20
1.6.4	POPULACIONE STUDIJE POLIMORFIZMA HLA.....	21
1.6.5	UDRUŽENOST HLA SA BOLESTIMA	22
1.6.5.1	Udruženost HLA i celijakije	23
1.6.5.2	Udruženost HLA i ankilozirajućeg spondilitisa.....	24
1.6.5.3	Udruženost HLA i reumatoidnog artritisa.....	25
1.6.5.4	Udruženost HLA i dijabetesa tip 1	25
1.6.5.5	Udruženost HLA sa reakcijom na lekove	26
1.6.5.6	Udruženost HLA i narkolepsije.....	26

1.7 HLA TIPIZACIJA	27
1.7.1 SEROLOŠKI TESTOVI TIPIZACIJE HLA	27
1.7.2 MOLEKULARNI TESTOVI TIPIZACIJE HLA	28
1.8 ZNAČAJ HLA U TRANSPLANTACIJI MČH	30
1.8.1 HLA U IZBORU DAVAOCA MČH	31
1.8.1.1 Srodni davalac MČH.....	31
1.8.1.2 Nesrodni davalac MČH	32
1.8.1.3 Umbilikalna krv	34
1.8.2 REGISTAR DAVALACA MČH.....	34
1.8.2.1 Procena verovatnoće pronalaženja davaoca u Registru	35
1.9 DOSADAŠNJA SAZNAJNA O POLIMORFIZMU HLA U POPULACIJI SRBIJE	36
2 CILJEVI	38
3 MATERIJAL I METODE.....	40
3.1 ISPITANICI	41
3.2 ANALIZIRANE POPULACIJE.....	41
3.3 UZORCI	42
3.3.1 UZORCI KRVI	42
3.3.2 UZORCI DNK	42
3.4 METODE.....	43
3.4.1 IZOLACIJA DNK	43
3.4.2 HLA TIPIZACIJA.....	43
3.4.2.1 HLA tipizacija metodom PCR-SSO.....	44
3.4.2.2 HLA tipizacija metodom PCR-SSP.....	44
3.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	46
4 REZULTATI	48
4.1 DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA.....	49
4.2 ANALIZA GRUPA ALELA HLA.....	50
4.2.1 HARDY-WEINBERGOVA RAVNOTEŽA ZA ISPITIVANU GRUPU 1	50

4.2.2	UČESTALOST GRUPA ALELA HLA.....	52
4.2.3	UČESTALOST HAPLOTIPOVA GRUPA ALELA HLA	56
4.3	ANALIZA ALELA HLA	61
4.3.1	HARDY-WEINBERGOVA RAVNOTEŽA ZA ISPITIVANU GRUPU 2	61
4.3.2	UČESTALOST ALELA HLA.....	62
4.3.3	UČESTALOST HAPLOTIPOVA ALELA HLA	67
4.4	GENETSKA SLIČNOST SA DRUGIM POPULACIJAMA	79
4.5	PROCENA OPTIMALNOG BROJA DAVALACA U REGISTRU DAVALACA KOSTNE SRŽI SRBIJE	81
5	DISKUSIJA	82
6	ZAKLJUČCI.....	101
7	LITERATURA.....	104

1.1 Istorijat otkrića humanih leukocitnih antigena

Otkriće humanih leukocitnih antigena (HLA) se vezuje za 1958. godinu i ime francuskog naučnika Jean Dausset-a. Ispitivanjem seruma multitransfundovanih bolesnika pokazao je da neki serumi mogu dovesti do aglutinacije leukocita slučajno odabranih davalaca, a dokazani aloantigen leukocita je nazvao MAC (danas HLA-A2) (Dausset, 1958). Iste godine, Jan van Rood i Rose Payne su ukazali na postojanje leukoaglutinina i u serumu višerotki (Payne i Rolfs, 1958; Van Rood i sar., 1958). Daljom analizom leukoaglutinina koji su se javljali posle transfuzije ili trudnoće, definisana su dva lokusa sa više alela koja su nazvana lokus 4 (danas HLA-B) i LA (danas HLA-A), što je opisano u revijalnom radu (Thorsby, 2009). Familijarnim ispitivanjima je pokazano da se ova dva lokusa nalaze na istom hromozomu, a Ceppellini je 1967. godine uveo pojam HLA haplotip (Ceppellini i sar., 1967). Postojanje i trećeg lokusa, koji je nazvan AJ (danas HLA-C), dokazala je grupa skandinavskih autora 1970. godine (Thorsby i sar., 1970).

Različite tehnike su korišćene za dokazivanje leukocitnih antigena, a Terasaki je 1964. godine razvio mikrolimfocitotoksični test (Terasaki i McClelland, 1964) koji je i danas u osnovi svih seroloških ispitivanja sistema HLA. Iste godine razvijen je i test mešane kulture limfocita (Bach i Hirschhorn, 1964) koji je tokom naredne decenije omogućio istraživanja limfocitne determinante kompleksa HLA nazvane HLA-D, što je opisano u revijalnom radu (Thorsby, 2009). Ranih sedamdesetih uočeno je da reaktivnost u mešanoj kulturi limfocita može biti inhibirana serumima koja sadrže anti-HLA antitela i da ta antitela prepoznaju antigene na površini B-limfocita, ali ne i T-limfocita. Korišćenjem seruma koji detektuju antigene na B-limfocitima, na internacionalnoj radnoj grupi 1977. godine, definisani su antigeni koji su nazvani HLA-DRw1-7 (DR engl. *D-related*, w engl. *workshop*). Iste godine uveden je termin klasa I koji opisuje antigene A, B i C i klasa II za antigene DR, DQ i DP, što je opisano u revijalnom radu (Thorsby, 2009).

Eksperimentima sa kožnim kalemima šezdesetih godina, a potom i dokazanom značaju HLA kod transplantacije bubrega, potvrđeno je da sistem HLA predstavlja glavni kompleks histokompatibilnosti kod ljudi, što je opisano u revijalnom radu

(Thorsby, 2009). Godine 1967. je prvi put ukazano i na povezanost HLA sa bolestima, izučavanjem fenotipa leukocita kod Hodgkin-ove bolesti (Amiel, 1967).

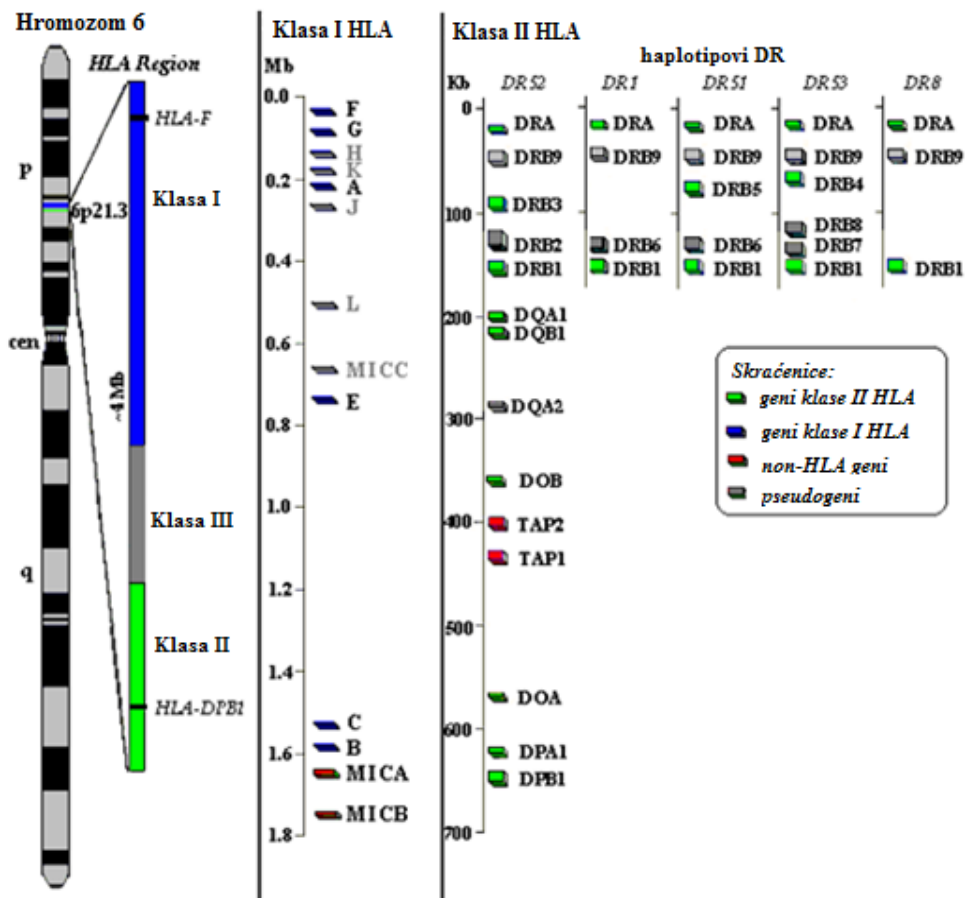
Ranih 1980-ih godina je ustanovljeno da se molekul HLA sastoji od dva glikoproteinska lanca, a prvi molekul HLA čija je struktura potpuno pokazana je bio takođe HLA-A2 (Thorsby, 2009).

Prvi gen HLA je kloniran 1980. godine (cDNK klon za gen HLA-B7), a prvobitne studije polimorfizma gena HLA su bile zasnovane na analizi polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism* - RFLP) (Erlich, 2012). Uvođenje tehnika tipizacije koje su zasnovane na reakciji lančanog umnožavanja DNK (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) 1985. godine, zatim pojava prvih komercijalnih kitova devedesetih, kao dalji razvoj i pristupačnost molekularnih tehnika tipizacije značajno su uticali na sadašnje poznavanje značaja razlika u redosledu aminokiselina HLA epitopa (Tiercy, 2002; Erlich, 2012).

1.2 Genska organizacija lokusa HLA

Geni HLA su deo kompleksa glavnih gena tkivne podudarnosti (MHC), koji se nalaze u 6p21 regionu kratkog kraka hromozoma 6. Na segmentu DNK sa oko 4000 kb, što čini 0,13% humanog genoma, nalazi se preko 250 gena čiji su produkti većinom uključeni u procese imunskog i inflamatornog odgovora (Travers, 2000; Shiina i sar., 2009).

Unutar kompleksa gena MHC nalaze se odvojeni regioni koji kodiraju molekule HLA klase I i klase II. Geni regiona klase I HLA se nalaze na telomernom kraju MHC-a i obuhvataju oko 1800 kb, dok se geni regiona klase II HLA nalaze na centromernom kraju MHC-a i obuhvataju oko 800 kb (Slika 1). Region klase I HLA i region klase II HLA su razdvojeni segmentom DNK od oko 1100 kb gde su smešteni geni koji ne kodiraju HLA molekule (non-HLA geni) (Travers, 2000; Shiina i sar., 2009).



Slika 1. Genska organizacija regiona MHC

(preuzeto iz: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc>)

U regionu klase I HLA se nalaze tri visoko polimorfna klasična gena HLA-A, HLA-B i HLA-C, čiji produkti su α lanci glavnih antigena tkivne podudarnosti. Neklasične gene regiona klase I (HLA-G, HLA-E i HLA-F) karakteriše ograničeni polimorfizam, nizak nivo ekspresije njihovih proteinskih produkata na ćelijama i ograničena tkivna distribucija. U regionu klase I se nalazi i 10 pseudogena (HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L, HLA-P, HLA-T, HLA-U, HLA-V, HLA-W, HLA-X) koji ne kodiraju proteinske produkte (Shiina i sar., 2009; Gebel i sar., 2011).

Region klase II (nekada nazivan i HLA-D region) sadrži tri subregiona - HLA-DR, HLA-DP i HLA-DQ. Svaki subregion ima više genskih lokusa (Slika 1) sa različitim brojem alela koji kodiraju α i β lanac antigena HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP (Shiina i sar., 2009;

Gebel i sar., 2011). Najvažniji iz regiona klase II je visoko varijabilni lokus HLA-DRB1 (za β lanac antigena HLA-DR) koji u kombinaciji sa HLA-DRA (za α lanac antigena HLA-DR) kodira serološki definisane specifičnosti HLA-DR1 do HLA-DR18. Kada su prisutni, geni HLA-DRB3, HLA-DRB4 i HLA-DRB5 u kombinaciji sa HLA-DRA kodiraju antigene HLA-DR52, HLA-DR53 i HLA-DR51. HLA-DRB2, HLA-DRB7 i HLA-DRB9 su pseudogeni. U subregionu HLA-DQ nalaze se polimorfni geni HLA-DQA1 i HLA-DQB1 koji kodiraju α i β lanac antigena HLA-DQ1 do HLA-DQ9. Geni HLA-DPA1 i HLA-DPB1 kodiraju antigene HLA-DP i udaljeni su oko 400 bp od gena za HLA-DQ (Muro i sar., 2002; Tiercy, 2002; Shiina i sar., 2009; Gebel i sar., 2011).

1.3 Antigeni HLA

Antigeni sistema HLA se, osim po genima koji ih kodiraju, razlikuju i po biohemijskoj strukturi, tkivnoj distribuciji i biološkoj funkciji. Na osnovu toga, postoje dve osnovne grupe antigena sistema HLA - antigeni klase I i antigeni klase II.

1.3.1 Biohemijska struktura HLA

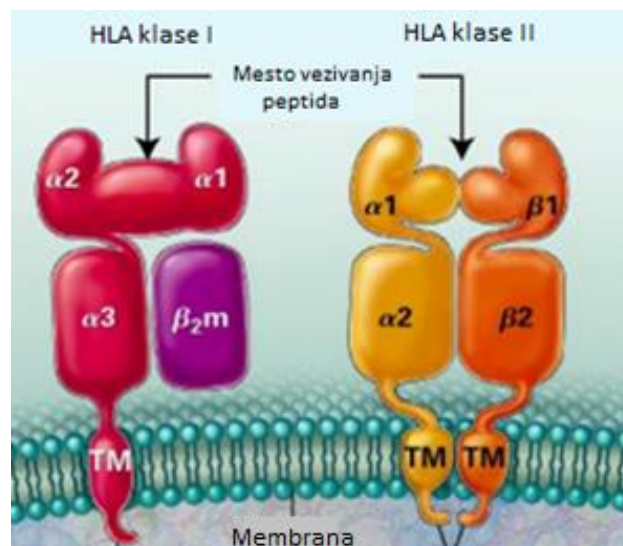
1.3.1.1 Biohemijska struktura antigena klase I

Antigeni klase I su glikoproteini molekulske težine oko 57 kD koji se sastoje od dva lanca: polimorfni teški ili α lanac (45 kD), koji je produkt gena klase I HLA, i nepolimorfni laki lanac ili β 2-mikroglobulin (12 kD) koji je produkt gena lokalizovanog na hromozomu 15 tj. nezavisno od kompleksa gena HLA (Abbas i sar., 2010; Gebel i sar., 2011).

Lanac α ima tri dela (Slika 2): ekstracelularni (najveći deo celokupnog lanca α se nalazi na spoljašnjem delu ćelije i sastoji se od 270 aminokiselina), transmembranski (25 aminokiselina) i citoplazmatski (30 aminokiselina). Ekstracelularni deo lanca ima tri globularna domena od kojih domeni α 1 i α 2 sadrže visoko varijabilne regione koji određuju specifičnost antigena klase I HLA. Redosled aminokiselina svih molekula klase I u domenu α 3 je isti nezavisno od alela koji ih kodira. Na tom segmentu se nalazi mesto vezivanja CD8 molekula T-limfocita (Abbas i sar., 2010).

Polimorfni domeni $\alpha 1$ i $\alpha 2$ formiraju mesto vezivanja peptida. Mesto vezivanja peptida je žleb veličine $25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ u koji se može smestiti peptid veličine 8-11 aminokiselina (Abbas i sar., 2010). Žleb mesta vezivanja peptida čine upravo one aminokiseline koje se razlikuju kod produkata različitih alela klase I. Ivice žleba su dva α -heliksa dok je pod sačinjen od β -nabrane ploče sa 6 džepova (od A do F) u koje se usidruju bočni lanci peptida (Klein i Sato, 2000; Abbas i sar., 2010).

$\beta 2$ -mikroglobulin (oko 100 aminokiselina) je nekovalentno vezan za domen $\alpha 3$ teškog lanca. Iako nije neposredno uključen u biološke funkcije molekula klase I, važan je za očuvanje konformacije molekula klase I. Kao i domen $\alpha 3$, on je identičan u svim molekulima klase I (Abbas i sar., 2010).



Slika 2. Struktura molekula HLA klase I i klase II (Klein i Sato, 2000)

1.3.1.2 Biohemijska struktura antigena klase II

Antigeni klase II su glikoproteini molekulske težine oko 63 kD i sastoje se od dva nekovalentno povezana polipeptidna lanca: lanac α (32-34 kD) i lanac β (29-32 kD). Za razliku od HLA klase I, oba lanca su kodirana genima regiona klase II MHC-a (Abbas i sar., 2010).

Oba lanca molekula klase II imaju ekstracelularni (180 aminokiselina), transmembranski (25 aminokiselina) i intracelularni deo (varijabilne dužine) (Slika 2). Ekstracelularni deo lanaca ima po dva domena: $\alpha 1$ i $\alpha 2$ odnosno $\beta 1$ i $\beta 2$. N-terminalni segmenti domena $\alpha 1$ i $\beta 1$ formiraju mesto vezivanja peptida, slično kao kod antigena klase I. Međutim krajevi žlebova su otvoreni, tako da u mesto za vezivanje peptida molekula klase II može da stane peptid i sa više od 30 aminokiselina (Travers, 2000; Abbas i sar., 2010).

Domeni $\alpha 2$ i $\beta 2$ su nepolimorfni tj. redosled aminokiselina ovih domena je isti kod svih molekula klase II. Na domenu $\beta 2$ se nalazi mesto za vezivanje molekula CD4 limfocita T (Abbas i sar., 2010).

1.3.2 Tkivna distribucija HLA

Klasični antigeni klase I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) su prisutni na skoro svim ćelijama u organizmu. Ne iskazuju ih jedino neuroni, ćelije epitela kornee, ćelije trofoblasta i germinalne ćelije. Nivo ekspresije se razlikuje kod različitih somatskih ćelija. Tako na primer, visok nivo ekspresija HLA klase I imaju limfociti T i B, ali i makrofagi i epitelijalne ćelije timusa, dok nizak nivo ekspresije imaju ćelije jetre (Travers, 2000; Gebel i sar., 2011). Trombociti ispoljavaju sličnu gustinu antigena kao i limfociti, s tim što je HLA-C veoma malo eksprimiran. Postoje i individualne razlike u jačini ekspresije HLA na trombocitima, a broj antigena opada tokom skladištenja jedinica trombocita (Gebel i sar., 2011). Na zrelih eritrocitima se molekuli HLA klase I nalaze samo u tragu, s tim što su neki alotipovi bolje eksprimirani od drugih. Nezavisno od sistema HLA, označavaju se i kao eritrocitni Bennett-Goodspeed (Bg) antigeni. Ovi antigeni se adsorbuju na površinu eritrocita iz plazme, ali ima i mišljenja da su antigeni HLA na eritrocitima ostaci antigena koji su bili prisutni na prekursorima koji su imali jedro. Specifična antitela uglavnom ne dovode do pojave hemolizne bolesti novorođenčadi niti hemolizne transfuzijske reakcije (Gebel i sar., 2011).

Neklasični antigeni klase I (HLA-E, HLA-G, HLA-F) imaju pretežnu ulogu u prirodnom imunitetu, a karakteriše ih ograničena tkivna distribucija i nizak nivo ekspresije (Sullivan i sar., 2006). HLA-G je ligand za inhibitorne receptora ćelija NK i značajnije je

ekspimiran samo na placentalnim ćelijama poreklom od fetusa, tako da je uključen u zaštitu fetalnog trofoblasta od lize posredovane majčnim ćelijama NK (Hviid i sar., 2002). HLA-F (HFE) je ekspimiran na ćelijama digestivnog sistema gde učestvuje u regulaciji preuzimanja i metabolizma gvožđa vezivanjem za transferin receptor preko domene $\alpha 1$. Kod osoba sa defektom gena koji kodira HFE razvija se hemohromatoza. HLA-E je prisutan na većini ćelija, a biološka uloga nije dovoljno jasna (Sullivan i sar., 2006). Polimorfizam HLA-E može imati uticaja na incidencu relapsa leukemije i ishod alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (MČH) (Hosseini i sar., 2013).

Antigeni klase II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) su, za razliku od klase I, prisutni na ograničenom broju tipova ćelija (Gebel i sar., 2011). To su pre svega antigen prezentujuće ćelije (APĆ) imunološkog sistema (dendritične ćelije, monociti i makrofagi, limfociti B) koje imaju i kostimulatorne molekule i mogu da indukuju specifičan T ćelijski odgovor. Konstitutivno se ekspimiraju na epitelijalnim ćelijama timusa gde imaju značajnu ulogu u stvaranju T ćelijskog repertoara kroz pozitivnu i negativnu selekciju limfocita T u timusu. Takođe, prisutni su i na aktiviranim limfocitima T, intestinalnom epitelu i na ranim hematopoetskim ćelijama. Mogu biti ekspimirani i na nekim endotelnim ćelijama, naročito malih krvnih sudova (Gebel i sar., 2011).

Ekspresija HLA molekula se povećava delovanjem citokina koji se stvaraju u imunskom odgovoru. Neke tumorske ćelije ne ekspimiraju antigene klase I i tako mogu da izbegnu imuni odgovor (Tait, 2000). Takođe, neuobičajena ekspresija HLA klase II je prisutna kod autoimunskih bolesti (Gebel i sar., 2011).

1.3.3 Biološka uloga HLA

Osnovna uloga HLA je prezentacija antigena limfocitima T. Svaki strani ili sopstveni antigen koji aktivira ćelijski imunski odgovor mora biti prikazan u sklopu sopstvenih molekula HLA. Pored prirodne biološke uloge u imunskim procesima razlikovanja sopstvenog i stranog, antigeni I i II klase HLA imaju važnu ulogu u alogenoj transplantaciji. Podudarnost u HLA između davaoca i primaoca utiče na ishod alogene transplantacije tkiva i organa.

1.3.3.1 Uloga HLA u prezentaciji peptida

Molekuli HLA se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu, a intracelularni proces nastanka kompleksa peptid-HLA je različit za molekule klase I i klase II HLA. U obradi antigena i vezivanju dobijenih peptida sa novonastalim molekulima HLA učestvuju brojni molekuli i enzimi koji nisu deo sistema HLA, ali su neki kodirani genima koji su smešteni u okviru kompleksa gena MHC.

Peptidi koji se prezentuju u sklopu molekula klase I HLA su poreklom od endogenih proteina kao što su proteini virusa, produkti onkogena ali i proteini citosola normalne ćelije.

Endogeni proteini u citosolu se prvo odmotavaju vezivanjem mnoštva molekula nazvanih ubikvitin, zatim se dalje razgrađuju u šupljini velikog multiproteinskog enzimskog kompleksa. Za nastanak peptida koji se prezentuju u sklopu klase I, značajna je degradaciona aktivnost proteaza LMP-2 i LMP-7. Nastali peptidi ulaze u lumen endoplazmatskog retikuluma kroz tzv. transportere udružene sa preradom antigena (engl. *transporter associated with antigen processing* - TAP), gde se vezuju za peptid-vezujuće mesto α lanca molekula klase I. LMP i TAP su kodirani genima koji se nalaze u regionu MHC. Kompleks peptid-HLA klase I izlazi na površinu ćelije preko Goldži kompleksa. Na površini ćelije, peptid u sklopu molekula HLA klase I prepoznaju CD8⁺ limfociti T, a njihovom aktivacijom uklanjaju se ćelije inficirane virusom i tumorske ćelije (Abbas i sar., 2010; Gebel i sar., 2011).

Peptidi koji se prezentuju imunskom sistemu u sklopu molekula HLA klase II nastaju preradom pretežno ekstracelularnih antigena (Abbas i sar., 2010; Gebel i sar., 2011). Tako, mikroorganizmi i njihovi produkti se internalizuju od strane APĆ, dospevaju u vezikule gde dolazi do enzimske razgradnje (najviše katepsinom) do peptida. Lanac α i lanac β molekula klase II se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu, a njihovo međusobno povezivanje omogućavaju šaperoni (Abbas i sar., 2010). Takođe, za novosintetisani molekul klase II vezuje se nepolimorfni glikoprotein nazvan invarijabilni lanac (Ii) koji se smešta tako da zatvara peptid-vezujuće mesto. To sprečava vezivanje malih peptida iz endoplazmatskog retikuluma koji se uklanjaju molekulom klase I

(Abbas i sar., 2010). Invarijabilni lanac je trimer, tako da može istovremeno da veže tri molekula klase II. Nastali kompleks molekula klase II i invarijabilnog lanca izlazi iz endoplazmatskog retikuluma kao vezikula i spaja se sa endozomom gde se nalaze prerađeni peptidi. Novoformirana endozomalna vezikula se naziva MIIC (engl. *MHC class II compartment*) i sadrži sve komponente potrebne za udruživanje peptida sa molekulom klase II. Najpre dolazi do proteolitičke degradacije invarijabilnog lanca, pri čemu u peptid-vezujućem mestu ostaje deo invarijabilnog lanca (engl. *class II associated invariant chain peptide* - CLIP). CLIP se uklanja molekulom HLA-DM, koji je kodiran MHC-om ali nije polimorfan, ne vezuje invarijabilni lanac i ne izlazi na površinu ćelijske membrane (Abbas i sar., 2010). Tada se za molekul HLA klase II vezuje prerađeni peptid, a kompleks peptid-molekul klase II HLA je stabilna struktura i transportuje se na površinu APC gde ga prepoznaje CD4⁺ T-limfocit (Abbas i sar., 2010; Gebel i sar., 2011).

Svaki molekul HLA ima jedno mesto za vezivanje peptida, ali može vezati mnogo različitih peptida, tako da se u sklopu ograničenog broja specifičnih HLA koje ima jedna osoba može prezentovati veliki broj različitih egzogenih i endogenih peptida (Abbas i sar., 2010).

Obradom jednog antigena nastaje veliki broj peptida koji se eksprimiraju na površini ćelijske membrane u sklopu molekula HLA, ali značajni su oni peptidi koji mogu da pokrenu imunski odgovor odnosno aktivaciju limfocita T. Odgovor limfocita T se javlja na peptide prerađenog antigena koji imaju aminokiseline sa bočnim lancima koji ulaze u džepove žlebova peptid-vezujućeg mesta molekula HLA i, sa prostorno druge strane, imaju aminokiseline čiji bočni lanci se vezuju za receptor T-ćelija (Klein i Sato, 2000; Abbas i sar., 2010). Kompleks peptid-HLA je stabilna struktura na površini ćelije, a peptid može ostati vezan nekoliko sati ili dana (Abbas i sar., 2010). Dugotrajno perzistiranje kompleksa peptid-HLA na APC je bitno za prepoznavanje stranog peptida od strane limfocita T i pokretanje specifičnog imunskog odgovora, a za aktivaciju T-limfocita dovoljno je oko 100 kompleksa stranog peptida sa klasom II na APC (oko 0,1% ukupnog broja ovih kompleksa koji se pojavljuje na membrani) (Abbas i sar., 2010).

Vezivanje peptida za molekul HLA nije specifično tj. molekul HLA ne pravi razliku između sopstvenih i stranih peptida. Veliki broj kompleksa sa sopstvenim peptidima

normalno ne izaziva imuni odgovor na sopstveno zato što postoji tolerancija na sopstveno, što je svojstvo T-limfocita a ne sistema HLA. Odnosno, kompleksi sopstvenih peptida sa HLA se stvaraju ali normalno ne indukuju autoimunost zbog uklanjanja i inaktivacije autoreaktivnih limfocita T tokom negativne selekcije u timusu (Abbas i sar., 2010).

1.3.3.2 Uloga HLA u imunologiji transplantacije

Kada se organ ili tkivo jedne osobe transplantira drugoj, genetički neidentičnoj, pokreće se serija ćelijskih i molekularnih reakcija koje dovode do odbacivanja kalema. Alogeni odgovor uključuje različite imunske mehanizme za razlikovanje sopstvenog od stranog koje dovode do odbacivanja kalema. Za snažnu i brzu reakciju odbacivanja odgovorni su molekuli HLA primaoca i davaoca. Odnosno, kod alogenih transplantacija, glavni aloantigeni su molekuli HLA. Drugi polimorfni aloantigeni, koji nisu molekuli HLA, uglavnom dovode do slabije ili sporije reakcije odbacivanja i takvi aloantigeni se nazivaju minorni histokompatibilni antigeni (Abbas i sar., 2010).

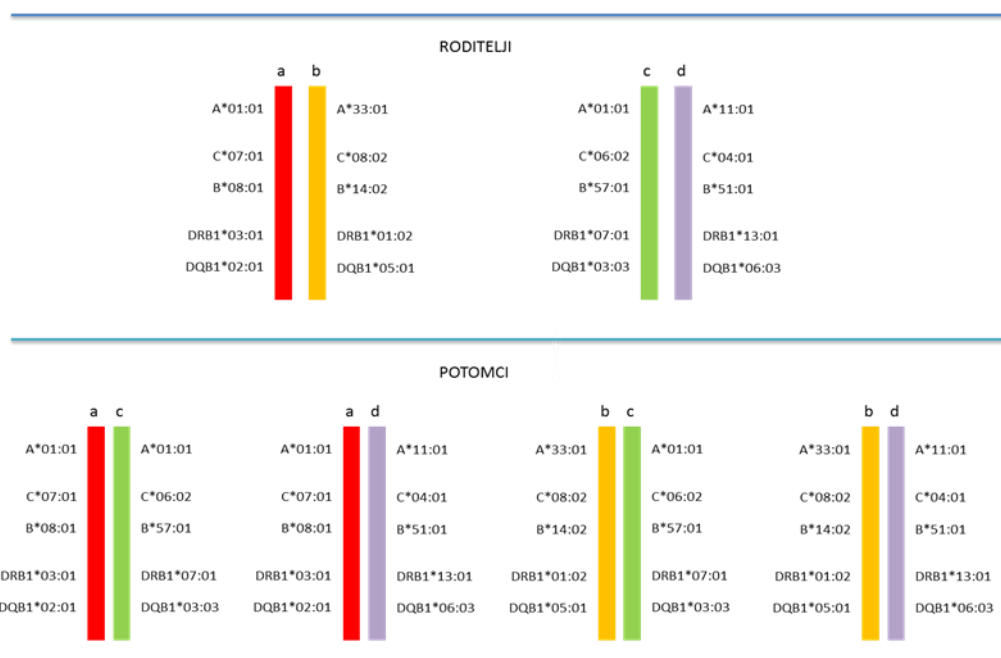
Aloantigeni tj. molekuli HLA davaoca mogu biti prezentovani limfocitima T primaoca na dva različita načina. Direktno alogeno prepoznavanje podrazumeva da T-limfociti primaoca prepoznaju antigenske determinante u sklopu molekula HLA koji su eksprimirani na površini transplantiranih ćelija. Odnosno, u direktnoj prezentaciji, T-ćelijski receptor primaoca prepoznaje polimorfne rezidue molekula HLA davaoca kao strane (HLA-dominantno vezivanje) ili prepoznaje peptid koji se nalazi u sklopu molekula HLA davaoca (peptid-dominantno vezivanje). Kod indirektnog alogenog prepoznavanja, HLA molekuli davaoca se prerađuju u APC primaoca i prezentuju kao peptidi u sklopu molekula HLA primaoca (Afzali i sar., 2007; Abbas i sar., 2010).

Prevenција odbacivanja alokalema se postiže imunosupresivnom terapijom, a redukuje izborom davaoca sa odgovarajućim stepenom podudarnosti HLA. Kod transplantacije MČH, uspešno prihvatanje kalema je omogućeno primenom hemoterapije ili zračenja u sklopu pretransplantacione pripreme. Međutim, kalem sadrži dovoljno imunološki kompetentnih ćelija tako da će davaočevi T-limfociti prepoznati aloantigene na primaočevim APC (direktno prepoznavanje) i u sklopu

sopstvenih APC (indirektno prepoznavanje) što dovodi do reakcije “kalem protiv domaćina” (Afzali i sar., 2007; Abbas i sar., 2010). Razlika u samo jednoj aminokiselini između HLA davaoca i primaoca MČH može biti dovoljna za pokretanje reakcije “kalem protiv domaćina”. I pored razvijenih tehnika HLA tipizacije, izbora podudarnih davaoca i imunosupresivne terapije, bolest “kalem protiv domaćina” ostaje značajan uzrok smrtnosti posle transplantacije MČH (Erlich i sar., 2001; Afzali i sar., 2007; Abbas i sar., 2010).

1.4 Nasleđivanje HLA

Zbog bliske povezanosti, geni sistema HLA se nasleđuju kao haplotip (Ceppellini i sar., 1967; Gebel i sar., 2011). Svaka osoba ima dva haplotipa HLA - jedan nasleđen od oca i drugi od majke. Roditelji svojim potomcima prenose četiri moguće kombinacije haplotipova (Slika 3) odnosno, postoji 25% verovatnoće da deca od istih roditelja budu haplotipski identična ili potpuno različita, a 50% da imaju jedan isti haplotip. S obzirom da su geni HLA autozomni a ekspresija alela kodominantna, fenotip jedne osobe predstavlja kombinaciju iskazanih antigena sa oba haplotipa (Gebel i sar., 2011).



Slika 3. Nasleđivanje HLA

Tokom mejoze može doći do razmene genetičkog materijala između dva hromozoma, a rekombinacija (engl. *crossing over*) se prenosi potomcima kao novi haplotip. Učestalost rekombinacija je povezana sa fizičkom razdaljinom između gena, tako da je očekivana učestalost rekombinacija na kratkom segmentu humanog MHC mala (Gebel i sar., 2011). Familijarne studije zasnovane na serološkoj tipizaciji lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DR su pokazale da učestalost rekombinacija u regionu između lokusa HLA-A i lokusa HLA-DRB1 iznosi oko 2,5% (Carrington, 1999), dok učestalost rekombinacija između lokusa HLA-A i HLA-B iznosi 0,8%, a između lokusa HLA-B i HLA-DR je 0,5% (Gebel i sar., 2011). Rekombinacije između lokusa HLA-B i HLA-C, kao i između HLA-DQ i HLA-DR su veoma retke, što je posledica male udaljenosti između ovih lokusa (Carrington, 1999), dok su rekombinacije između lokusa HLA-DQ i HLA-DP relativno česte (Gebel i sar., 2011).

Poznavanje načina nasleđivanja HLA i uočavanje postojanja rekombinacija unutar familije je važno u evolutivnim studijama, kao i kod ispitivanja stepena podudarnosti članova familije za potrebe transplantacija (Muro i sar., 2002; Gebel i sar., 2011).

1.5 Nomenklatura HLA

S obzirom na veliki polimorfizam HLA, bilo je neophodno uvesti jedinstvenu sistematizaciju u obeležavanju najpre antigena, a potom gena i alela HLA. Za nomenklaturu sistema HLA odgovoran je Odbor za nomenklaturu Svetske zdravstvene organizacije za faktore HLA sistema (Bodmer, 2000), ustanovljen 1968. godine, koji potvrđuje novootkrivene alele i radi periodičnu reviziju specifičnosti HLA. Podaci o nomenklaturi, sekvencama alela i informacije o novim alelima dostupni su na www.ebi.ac.uk/imgt/hla (Marsh i sar., 2010; Robinson i sar., 2013).

1.5.1 Nomenklatura antigena

Antigeni sistema HLA obeležavaju se slovom genskog lokusa (za antigene klase I), odnosno subregiona gena (za antigene klase II), i brojem (npr. HLA-A1, HLA-B5, HLA-DR3, itd.). Za antigene lokusa C zadržana je i oznaka 'w' (npr. HLA-Cw2) da bi se

razlikovali od oznake za komponente sistema komplementa (Bodmer, 2000; Gebel i sar., 2011). Sa poboljšanjem kvaliteta seruma za tipizaciju, nađeno je da neki epitopi HLA mogu biti zajednički za dva ili više antigena. Zato se prethodno otkriveni antigeni mogu odrediti kao individualne specifičnosti - podtipovi. Podtipovi već postojećih antigena su dobijali i novi broj ali se u zagradi naznačava i antigen kome pripadaju. Tako na primer: HLA-A23(9) i HLA-A24(9) su zasebni antigeni, ali ujedno i podtipovi antigena HLA-A9. Pored podtipova, antigeni HLA mogu imati i druge zajedničke epitope. Antitela na te zajedničke determinante često uzrokuju unakrsnu reaktivnost u serološkim testiranjima. Antigeni koji imaju ovakve zajedničke epitope svrstavaju se u grupe tzv. unakrsno-reaktivne grupe antigena (engl. *cross-reactive groups* - CREGs). Na antigenima klase I HLA nalazi se i epitop koji je zajednički za većinu antigena HLA i taj epitop se naziva 'javni antigen'. Zapravo, to je niz aminokiselina koji nema veliku varijabilnost u molekulu HLA. Dva dobro okarakterisana 'javna antigena' su HLA-Bw4 i HLA-Bw6. Svi antigeni lokusa HLA-B mogu da se svrstaju u grupu Bw4 ili Bw6 (Bodmer, 2000; Gebel i sar., 2011; Kosmoliaptsis i sar., 2011).

1.5.2 Nomenklatura alela

S obzirom na veliki broj otkrivenih alela, od aprila 2010. godine uvedena je nova nomenklatura koja je zamenila sistem koji je korišćen od 1990. godine (Marsh i sar., 2010). Aleli se obeležavaju na taj način što imaju oznaku genskog lokusa, zatim zvezdicu koja naglašava da cifre koje slede označavaju alel. U zavisnosti od nivoa determinisanosti sekvence, oznaka za alel se može sastojati od četiri grupe cifara razdvojenih dvotačkama. Prva grupa cifara (engl. *2-digits*) određuju grupu (familiju) alela i često odgovara serološkoj specifičnosti (na primer HLA-DRB1*13). Drugom grupom cifara (engl. *4-digits*) se prikazuje alel (na primer HLA-DRB1*13:01). Razlike u brojevima druge grupe cifara u oznaci alela ujedno označavaju i razlike u jednom ili više nukleotida koji menjaju niz aminokiselina u kodiranom proteinu. Ostale cifre se naznačavaju kada je potrebno prikazati razlike u sinonimnim, nekodirajućim, supstitucijama nukleotida (na primer HLA-DRB1*13:01:02) ili razlike u intronskim regionima (na primer HLA-DRB1*13:01:01:02).

Pored jedinstvenog broja, alel može imati i sufiks N, L, S ili Q, koji označava status njegove ekspresije. Aleli koji se ne ekspimiraju (*null* aleli) imaju oznaku N (na primer HLA-A*24:09N). Aleli sa niskom ekspresijom na površini ćelije imaju oznaku 'L', prisustvo samo solubilnog produkta se označava sa 'S', a aleli sa novonastalim nepotvrđenim mutacijama koje utiču na ekspresiju imaju oznaku 'Q'. Od aprila 2012. godine nisu u upotrebi sufiksi 'C' (citoplazmatski) i 'A' (nejasan) (Robinson i sar., 2013).

Rečnik HLA (Holdsworth i sar., 2009), koji je dostupan na www.ebi.ac.uk/imgt/hla (Robinson i sar., 2013), omogućava da se pronađu serološki ekvivalenti alela lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, i -DQB1, što ima primenu prilikom izbora parova za transplantaciju MČH. Takođe, radi lakše razmene informacija o rezultatima tipizacija, pre svega za potrebe traženja odgovarajućeg nesrodnog davaoca MČH, u upotrebi je i sistem slovnih šifara koji je ustanovila i koji ažurira bioinformatička grupa Nacionalnog američkog registra (National Marrow Donor Program / Be The Match,) i naziva se NMDP alelski kod (Hurley i sar., 2004). NMDP kod podrazumeva da su određene kombinacije alela dobijene testovima srednje/niske rezolucije unutar alelske grupe obeležene određenom kombinacijom dva do 4 slova. Na osnovu slovnog koda moguće je iz velikog skupa davalaca isključiti nepodudarne iz dalje pretrage, a testovima visoke rezolucije se dokazuje koji alel je prisutan od alela NMDP koda.

1.6 Polimorfizam HLA

Jedna od osnovnih karakteristika sistema HLA je visok stepen polimorfizma (Bodmer, 2000; Tiercy, 2002). Polimorfizam je reč grčkog porekla (πολυμορφισμός) koja označava postojanje više oblika, a po definiciji je pojava postojanja dva ili više alela jednog gena u populaciji sa učestalošću većom od 1%. Analize polimorfizma HLA i neravnoteže udruživanja alela, kao i razlike učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, imaju praktičnu primenu prilikom izbora davaoca za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze i značaj u ispitivanju udruženosti HLA sa etiopatogenezi nekih bolesti (Tiercy, 2002; Fernando i sar., 2008; Howell, 2014).

1.6.1 Poreklo polimorfizma HLA

Ekstremni polimorfizam MHC-a je posledica selekcije posredovane patogenima i predstavlja prednost u evolutivnoj borbi za preživljavanje i opstanak vrste (Bodmer, 2000; Spurgin i Richardson, 2010). Naime, skoro sve varijacije na nivou DNK regiona MHC se dešavaju na pozicijama koje dovode do supstitucije aminokiselina u N-terminalnom regionu molekula HLA gde se nalazi mesto vezivanja peptida. To omogućava funkcionalnu različitost molekula HLA i dovodi do individualnih razlika u imunskom odgovoru.

Spurgin (Spurgin i Richardson, 2010) u revijalnom radu opisuje tri predložena mehanizma koji, odvojeno ili u kombinaciji, dovode do selekcije posredovane patogenima i održavanja visokog polimorfizma MHC-a: prednost heterozigota, prednost retkih alela i fluktuirajuća selekcija. Mehanizam zasnovan na prednosti heterozigota pretpostavlja da su jedinke heterozigoti za lokuse MHC u stanju da odgovore na veći opseg patogenih peptida nego homozigoti i zbog toga imaju veću rezistenciju na patogene. Tako su heterozigoti u selektivnoj prednosti u odnosu na homozigote i održavaju veći broj alela u populaciji (balansna selekcija). S druge strane postoji i selekcija patogena, odnosno prilagođavanje patogena, koja nastaje da bi se prevazišla otpornost domaćina. Hipoteza o prednosti retkih alela podrazumeva da će novi aleli koji se pojavljuju u populaciji verovatno omogućiti veću zaštitu od patogena u odnosu na učestale alele i tako imati selektivnu prednost. Variranjem učestalosti alela i otpornosti patogena održava se raznovrsnost MHC-a. To ne isključuje hipotezu selekcije heterozigota jer heterozigot može biti u selektivnoj prednosti upravo zato što sadrži i redak alel. Hipoteza fluktuirajuće selekcije pretpostavlja da se raznolikost MHC održava zbog vremenske i prostorne raznovrsnosti u vrsti i obilju patogena. Na funkcionalnom nivou, polimorfizam HLA je verovatno manji, s obzirom na to da je dokazano da postoji preklapanje repertoara peptida za peptid vezujuća mesta molekula HLA (Rao i sar., 2013).

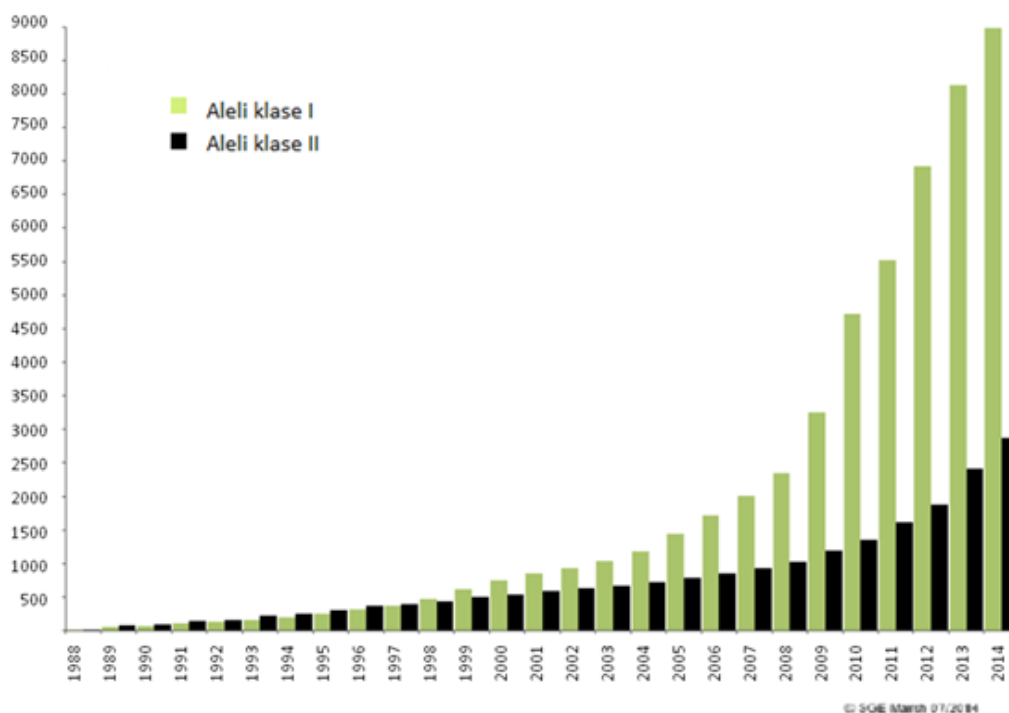
Izučavanje mehanizma raznolikosti MHC-a se u početku zasnivalo na evolutivnim teorijama selekcije, a potom na izučavanju selekcije unutar jedne generacije ili jednog ekološkog perioda. U mikro-evolucionoj vremenskoj skali, migracije bi mogle biti važnije u oblikovanju raznolikosti MHC-a nego selekcije patogenima. Zbog velike

raznovrsnosti, populacione studije alela HLA su korišćene za izučavanje humane demografije i omogućavaju uvid u istorijske i evolucione veze među savremenim populacijama. Meta analize alelskih raznolikosti populacija dokazuju da je održavanje novih i niskofrekventnih alela mnogo češće nego što bi se očekivalo u modelu neutralne evolucije (Solberg i sar., 2008). Analizom polimorfizma HLA je moguće pratiti migracije ljudskih populacija s obzirom na to da je pokazano da genetska distanca između populacija na osnovu učestalosti HLA korelira sa njihovim geografskim poreklom (Fernandez Vina i sar., 2012; Riccio i sar., 2013).

U širem smislu, složenost polimorfizma HLA je posledica postojanja više genskih lokusa, velikog broja alela za većinu gena i kombinacija produkata ovih alela (Bodmer, 2000; Tiercy, 2002).

1.6.2 Polimorfizam alela HLA

HLA je najpolimorfniji deo humanog genoma. Sa razvojem tehnika molekularne tipizacije i ispitivanjem sve većeg broja populacija, broj alela se stalno povećava (Slika 4).



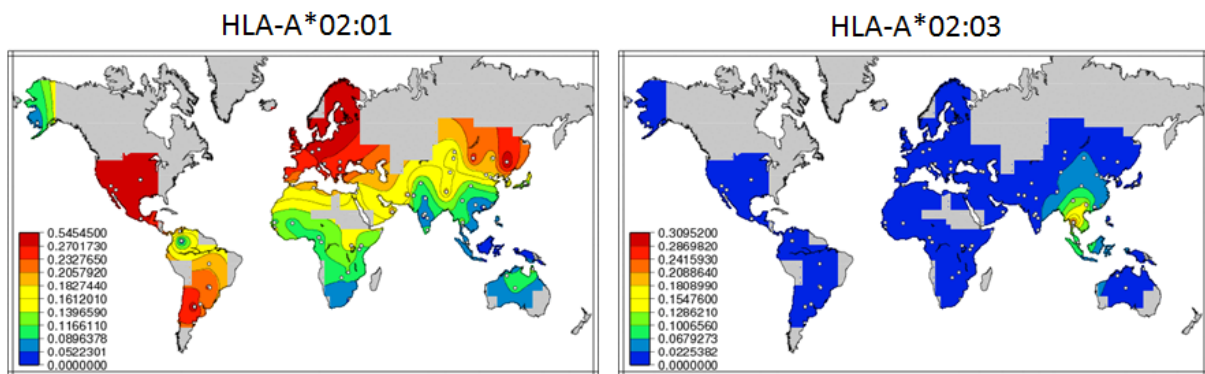
Slika 4. Porast broja alela HLA po godinama
(preuzeto iz: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/intro.html>)

U bazi podataka IMGT/HLA (Robinson i sar., 2013), ima preko 10533 dokazanih alela HLA (verzija izveštaja 3. 15. 0, januar 2014), od toga je 8124 alela klase I HLA i 2409 alela klase II HLA. Najpolimorfniji lokus klase I je HLA-B sa 3285 alela, a klase II je HLA-DRB1 sa 1411 alela (tabela 1).

Tabela 1. Broj alela, proteina i *null* alela HLA

	Lokus	Broj alela	Broj proteina	Broj <i>null</i> alela
Klasa I	HLA-A	2579	1833	121
	HLA-B	3285	2459	109
	HLA-C	2133	1507	63
	HLA-E	15	6	0
	HLA-F	22	4	0
	HLA-G	50	16	2
Klasa II	HLA-DRA	7	2	0
	HLA-DRB1	1411	1047	33
	HLA-DRB2	1	0	0
	HLA-DRB3	58	46	1
	HLA-DRB4	15	8	3
	HLA-DRB5	20	17	2
	HLA-DRB6	3	0	0
	HLA-DRB7	2	0	0
	HLA-DRB8	1	0	0
	HLA-DRB9	1	0	0
	HLA-DQA1	51	32	1
	HLA-DQB1	509	337	13
	HLA-DPA1	37	19	0
	HLA-DPB1	248	205	6
	HLA-DMA	7	4	0
	HLA-DMB	13	7	0
	HLA-DOA	12	3	1
	HLA-DOB	13	5	0

Analiza distribucije alela u populacijama je pokazala da su neki aleli globalno rasprostranjeni, kao npr. HLA-A*02:01 koji je ujedno i najčešći alel u evropskim populacijama, dok je npr. HLA-A*02:03 prisutan samo u populacijama jugoistočne Azije (Slika 5). Takođe, polimorfizam HLA se ogleda i u činjenici da je za neke grupe alela dokazan veći broj alela učestalih u brojnim populacijama, dok kod nekih učestalih grupa alela postoji dominantan alel u većini populacija (Middleton i sar., 2003; Solberg i sar., 2008; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Fernandez Vina i sar., 2012).



Slika 5. Globalna distribucija učestalosti alela HLA-A*02:01 i HLA-A*02:03 (preuzeto iz <http://www.pypop.org/popdata>, Solberg 2008)

Na osnovu Liste opštih i dobro dokumentovanih alela (engl. *List of Common and Well-Documented Allels - CWD*) (Mack i sar., 2013), aleli su svrstani u dve kategorije. Kategorija opštih alela HLA obuhvata alele čija je učestalost poznata, a postoji i dovoljno podataka koji ukazuju na njihovo prisustvo i učestalost. Konsenzusom je prihvaćeno da su u ovoj kategoriji aleli koji imaju učestalost $>0,1\%$ u populacijama sa najmanje 1500 ispitanika. U dobro dokumentovane alele HLA se svrstavaju aleli koji nisu globalno rasprostranjeni, ali se njihovo prisustvo dokazuje u više studija. Nekada se označavaju i kao retki aleli. Aleli se svrstavaju u kategoriju dobro dokumentovanih ako su dokazani metodom sekvenciranja kod pet nesrodnih osoba ili u tri haplotipa nesrodnih osoba. U verziji 2. 0. 0 CWD kataloga je dokazano 415 opštih alela i 707 dobro dokumentovanih alela za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1 (Mack i sar., 2013).

1.6.3 Neravnoteža udruživanja alela HLA

Za sistem HLA je karakteristična neravnoteža udruživanja alela (engl. *linkage disequilibrium - LD*) tj. pojava da se određeni aleli dva lokusa pojavljuju zajedno u istom haplotipu mnogo češće ili ređe nego što bi se očekivalo s obzirom na učestalost tih alela u populaciji (Bodmer, 2000; Gourraud i sar., 2005; Sanchez-Mazas i Nunes, 2006). Najpre je pokazano da najčešće kombinovani antigeni u evropskoj populaciji HLA-A1 i HLA-B8 imaju učestalost haplotipa HLA-A1-B8 u populaciji belaca 7-8% iako bi se, na

osnovu učestalosti gena koji kodira HLA-A1 (koja iznosi 0,15) i učestalosti gena koji kodira HLA-B8 (koja iznosi 0,10), očekivalo da je učestalost ovog haplotipa 1,5% (0,15 x 0,10) (Bodmer, 2000; Gebel i sar., 2011). Populacione studije su takođe pokazale da postoji udruženost pojavljivanja alela lokusa HLA-DRB1 sa alelima lokusa HLA-DQB1 i HLA-DQA1, kao i alela lokusa HLA-B i HLA-C (Fernandez Vina i sar., 2012). Neravnoteža udruživanja alela različitih lokusa ukazuje na moguću evolutivnu povezanost alela HLA (Fernandez Vina i sar., 2012), a poznavanje udruženosti alela HLA u haplotipu dva i više lokusa ima praktičan značaj prilikom pronalaženja davaoca za transplantaciju MČH.

Neravnoteža udruživanja alela se izražava numerički kao vrednost D, koji predstavlja razliku između dobijene i očekivane učestalosti haplotipa, i standardizovana vrednost D' (Bodmer, 2000; Sanchez-Mazas i Nunes, 2006). S obzirom na to da na učestalost haplotipova utiče i veličina ispitivane populacije, prihvatljivo je da se D' prikazuje za haplotipove koje čine aleli sa učestalošću većom od 0,05% (Schmidt i sar., 2011).

Broj haplotipova HLA u humanoj populaciji je manji nego što bi se moglo očekivati s obzirom na broj alela i pojavu rekombinacija unutar regiona HLA (Carrington, 1999; Rao i sar., 2013), a haplotipovi imaju različitu učestalost u različitim etničkim grupama. Haplotipovi koji nose protektivne HLA za određenu bolest očekivano su učestaliji u endemskim područjima (Rao i sar., 2013). Rangiranjem haplotipova po učestalosti, dobija se uvid u globalnu distribuciju učestalosti haplotipova više lokusa među populacijama (Maiers i sar., 2007; Klitz i sar., 2009; Pingel i sar., 2013).

1.6.4 Populacione studije polimorfizma HLA

Podaci o učestalosti alela i haplotipova u različitim populacijama i etničkim grupama su prikazani u brojnim radovima, a Middleton i saradnici (Middleton i sar., 2003; Gonzalez-Galarza i sar., 2011) objedinjuju publikovane podatke u jedinstvenu bazu podataka, koja je dostupna na www.allelefrequencies.net i osnovni je izvor informacija geografske distribucije alela i haplotipova HLA (Solberg i sar., 2008; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Sanchez-Mazas i sar., 2012).

Populacija može biti definisana po etničkoj pripadnosti kod geografski i/ili sociološki izolovanih ispitanika. Međutim, zbog migracija, većina savremenih populacija se sastoji

od mešavine različitih populacija (Schipper i D’Amaro, 2000). Prilikom ispitivanja učestalosti alela i haplotipova u određenoj populaciji, važno je definisati ispitivanu grupu u pogledu geografskog porekla, načina uzorkovanja i broja ispitanika (Sanchez-Mazas i sar., 2012). Procena da li je ispitivana populacija u Hardy–Weinbergovoj ravnoteži za ispitivane lokuse je neophodan preduslov da bi se podaci o učestalosti HLA mogli koristiti za poređenje sa drugim populacijama (Gourraud i sar., 2005; Sanchez-Mazas i sar., 2012).

Nije jasno utvrđena veličina uzorka koja bi bila dovoljna za procenu značajnosti pojavljivanja alela HLA (Sanchez-Mazas i sar., 2012). S obzirom na veliki broj ispitanika, retrospektivne analize podataka HLA tipizacija davalaca u registrima davalaca MČH se najčešće koriste kao izvor podataka o polimorfizmu HLA za određenu populaciju (Solberg i sar., 2008; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Sanchez-Mazas i sar., 2012; Maiers i sar., 2013). Učestalosti haplotipova u ovakvim studijama se dobijaju statističkim metodama procene verodostojnosti pojavljivanja haplotipova (engl. *maximum-likelihood estimation* - MLE) na osnovu učestalosti dobijenih alela u ispitivanoj populaciji (Sanchez-Mazas i Nunes, 2006).

Poznavanje učestalosti alela i haplotipova u određenoj populaciji ima praktičan značaj prilikom pronalaženja davaoca za transplantaciju MČH, kao i za strategiju planiranja nacionalnih registara davalaca MČH (Muller i sar., 2003; Pingel i sar., 2013). Takođe, razlike u alelskim i haplotipskim frekvencijama među populacijama različitih etničkih grupa se koriste za bolje razumevanje udruženosti alela HLA i nekih bolesti (Caillat-Zucman, 2009; Howell, 2014).

1.6.5 Udruženost HLA sa bolestima

HLA su udruženi sa nekoliko stotina bolesti, uključujući i većinu autoimunskih bolesti, što je opisano u revijalnim radovima (Fernando i sar., 2008; Shiina i sar., 2009; Howell, 2014). Međutim, zbog velikog polimorfizma HLA i izražene neravnoteže udruživanja vezanih gena u regionu HLA, kao i činjenica da na etiopatogenezu ovih bolesti utiču i druge genetske varijante, nije moguće u potpunosti ustanoviti molekularni mehanizam koji je u osnovi udruženosti bolesti sa sistemom HLA.

U osnovi autoimunskih bolesti je aktivacija limfocita T od strane tkivno specifičnih autopeptida prezentovanih u sklopu molekula HLA. Međutim, u većini autoimunskih bolesti nije poznat autoantigen koji je relevantan za pojavu bolesti (Fernando i sar., 2008; Caillat-Zucman, 2009). Takođe, zbog heterogenosti autoimunskih bolesti, verovatno je da različiti aleli, kao i kombinacije alela različitih lokusa mogu uticati na pojavu određenih formi bolesti.

Stepen udruženosti bolesti sa HLA se izražava kao relativni rizik (RR) a izračunava se primenom modifikacija formule $a \times d / b \times c$ gde je a broj obolelih osoba koje imaju ispitivani alel, b broj obolelih osoba koje nemaju ispitivani alel, c broj zdravih osoba koje imaju ispitivani alel i d broj zdravih osoba koje nemaju ispitivani alel (Barrett i sar., 2000; Bunce, 2000).

Poznavanje relativnog rizika udruženosti HLA i analiza polimorfizma HLA kao protektivnog ili predisponirajućeg faktora u etiopatogenezi, ima primenu u dijagnostici nekih bolesti.

1.6.5.1 Udruženost HLA i celijakije

Najveći relativni rizik za pojavu bolesti je dokazan kod celijakije. Više od 90% bolesnika sa celijakijom eksprimira HLA-DQ kodiran od strane HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (antigen HLA-DQ2), kao i HLA-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (antigen HLA-DQ8) (Caillat-Zucman, 2009). Pokazalo se da je postojanje antigena HLA-DQ2 i HLA-DQ8 jedan od preduslova za nastanak bolesti. Antigeni HLA-DQ2 i HLA-DQ8 mogu da vežu glijadinske peptide samo ukoliko su ovi peptidi izmenjeni tkivnom transglutaminazom (TG2). TG2 dovodi do deaminacije glutaminskih rezidua u oštećenom tkivu tankog creva. Izmenjeni peptid, u sklopu HLA, aktivira specifične CD4+ T-limfocite i dovodi do inflamacije i razvoja bolesti (Caillat-Zucman, 2009; Howell, 2014). Odsustvo HLA-DQ2 i HLA-DQ8 isključuje postojanje celijakije kod klinički netipičnih simptoma, odsustva anti-glijadinskih antitela i nejasnih histoloških lezija. Savremeni vodiči sugerišu da kod dece sa kliničkom slikom celijakije uz prisustvo IgA antitela na TG2 i dokazanim HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 nije neophodna biopsija za postavljanje dijagnoze, čime se izbegavaju potencijalne komplikacije biopsije creva (Howell, 2014).

1.6.5.2 Udruženost HLA i ankilozirajućeg spondilitisa

Udruženost HLA-B27 i ankilozirajućeg spondilitisa (AS) je jedna od najjačih udruženosti HLA klase I i bolesti, sa visokim relativnim rizikom. Preko 95% bolesnika sa AS ima HLA-B27 u poređenju sa zdravom populacijom u kojoj je HLA-B27 prisutan kod manje od 10% osoba (Caillat-Zucman, 2009). Na postojanje direktne povezanost HLA-B27 i patogeneze AS ukazuje i podatak da je visok relativni rizik ove asocijacija prisutan u svim populacijama i etničkim grupama, a bolest nije povezana sa određenim haplotipom (Caillat-Zucman, 2009). Ustanovljeno je da su sa pojavom AS udruženi aleli koji su učestali i u zdravoj populaciji, kao što su B*27:05, B*27:02, B*27:04 i B*27:07. Međutim, pokazano je i da alel B*27:06 (učestao u populacijama jugoistočne Azije) i B*27:09 (prisutan u populaciji Sardinije i južne Italije) nisu udruženi sa AS. Molekularna osnova udruženosti nije sasvim razjašnjena. Za sada su aktuelne tri hipoteze. Jedna je hipoteza o postojanju artrogenog peptida koji je unakrsno reaktivan sa bakterijskim peptidom. Odnosno, pretpostavka je da u zglobovima postoji peptid koji se prezentuje u sklopu molekula HLA-B27, što prepoznaju autoreaktivni limfociti T koji su bili aktivirani bakterijskom infekcijom odnosno bakterijskim peptidom u sklopu HLA. Međutim, zbog velikog repertoara peptida koji se mogu vezati za molekul HLA-B27, nije dokazan specifičan peptid. Druga je hipoteza o postojanju HLA-B27 homodimera kao imunomodulatornog molekula. Naime, pretpostavka je da teški lanac molekula HLA-B27 (bez β 2-mikroglobulina) na površini ćelija pokreće odgovor T-limfocita i inflamaciju. Nema eksperimentalnih dokaza za ovu hipotezu, ali biohemijski je dokazana ekspresija HLA-B27 koji imaju samo lanac α , kao i njihovo mesto vezivanja peptida. Međutim, ne bi se moglo očekivati da oni ispoljavaju istu specifičnost kao i HLA-B27. Prema trećoj hipotezi, inflamacija udružena sa HLA-B27 ne zavisi od prezentovanog peptida već je indukovana nagomilavanjem pogrešno savijenih teških lanaca α HLA-27 u endoplazmatskom retikulumu, što indukuje stvaranje proinflamatornih citokina. U prilog ove hipoteze je činjenica da pravilno savijanje lanca α zavisi od aminokiseline na poziciji 116, a upravo je to rezidua po kojoj se aleli HLA-B27 koji su udruženi sa AS razlikuju od drugih alela HLA-B27. Ni jedna od ovih teorija ne može da objasni tkivnu specifičnost bolesti (Ramos i Lopez de Castro, 2002; Caillat-Zucman, 2009; Howell, 2014). Iako je udruženost AS i HLA-B27 izuzetno velika,

prisustvo HLA-27 u fenotipu zdravih osoba ne ukazuje na mogućnost obolevanja jer će manje od 20% osoba sa HLA-B27 razviti bolest (Ramos i Lopez de Castro, 2002).

1.6.5.3 Udruženost HLA i reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis (RA) je autoimunska bolest sa multifaktorijalnom patogenezi uz učestće brojnih gena. Približno 70% evropskih belaca sa RA imaju neki od alela HLA-DRB1*04. Danas se zna da nekoliko alela doprinose sklonosti ka RA, pre svega HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05, a u manjem obimu i HLA-DRB1*01:01 i HLA-DRB1*14:02. Ovi aleli imaju zajednički niz aminokiselina (QKRAA, QRRAA ili RRRAA) na pozicijama 70-74 trećeg hipervarijabilnog regiona β lanca molekula HLA-DR. Ove zajedničke sekvence su u osnovi hipoteze 'zajedničkih epitopa' za HLA-posredovanu predispoziciju nastanka RA. S obzirom na to da su zajednički epitopi smešteni u α heliksu žljeba peptid-vezujućeg mesta HLA-DR molekula, pretpostavlja se da su ovi nizovi aminokiselina direktno uključeni u patogenezu RA vezivanjem 'artrogenog' peptida i prezentacijom u sklopu HLA T-limfocita. Međutim, nije identifikovan poseban artrogeni peptid. HLA tipizacija nije od praktičnog značaja za dijagnozu RA, s obzirom na to da je relativni rizik mali. Dokazivanje alela može biti od koristi da se u ranoj fazi identifikuju oblici RA sa lošom prognozom (Howell, 2014).

1.6.5.4 Udruženost HLA i dijabetesa tip 1

U ranijim studijama je pokazano da preko 95% bolesnika evropske populacije sa dijabetesom tip 1 ima antigen HLA-DR3 i/ili HLA-DR4 (Howell, 2014). Međutim, pokazano je da su za sklonost ka nastajanju bolesti ili za rezistenciju na bolest odgovorni produkti alela lokusa HLA-DQ. Sa dijabetesom je udružen alel HLA-DQB1*03:02, kao i HLA-DQB1*02:01 i HLA-DQB1*03:03. Protektivan alel je HLA-DQB1*06:02. Predisponirajući i protektivni alelski produkti se razlikuju u aminokiselini na poziciji 57 β lanca molekula DQB1. Smatra se da prisustvo ili odsustvo asparaginske kiseline na poziciji 57 utiče na stabilnost molekula DQ i potencijal za vezivanje autoantigena, a tako i na repertoar peptida koji se može vezati i prezentovati limfocitima T. Tipizacija HLA-DQ nema značaja za postavljanje dijagnoze, ali može biti informativna za otkrivanje članova sa velikim rizikom u porodicama sa dijabetesom (Howell, 2014).

1.6.5.5 Udruženost HLA sa reakcijom na lekove

HLA je udružen sa brojnim teškim, ponekad i fatalnim, reakcijama preosetljivosti na lekove. Tako na primer, pokazano je da kod bolesnika koji imaju HLA-B*57:01 postoji visok relativni rizik ($RR > 500$) pojave hiper-reaktivnosti na lek abacavir, antiretrovirusni lek koji se koristi u terapiji infekcije HIV-1, što je opisano u revijalnom radu (Howell, 2014). Abacavir prezentovan u sklopu HLA-B57 aktivira specifične CD8 limfocite T i ranije se smatralo da je lek samo haptent koji menja autopeptide. Danas se zna da se abacavir nekovalentno vezuje za produkt alela HLA-B*57:01, smeštajući se u džep F na β ploči žleba peptid vezujućeg mesta. Tako menja repertoar endogenih peptida koji se vezuju za molekul HLA-B57 i aktivira poliklonski odgovor T-ćelija, koji se manifestuje hipersenzitivnom reakcijom. Vodiči za terapiju AIDS-a preporučuju HLA tipizaciju kod svih bolesnika pre početka primene abacavira. Preporuka je da bolesnici koji imaju HLA-B*57:01 ne bi trebalo da koriste ovaj lek (Berka i sar., 2012; Howell, 2014).

Dokazana je i slična patogeneza hipersenzitivnosti u populaciji Azije kod bolesnika sa HLA-B*15:02 koji su dobijali antiepileptik karbamazepin, kao i kod bolesnika populacije Japana i populacije Belaca sa HLA-A*31:01. Visok relativni rizik hipersenzitivnosti na lek alopurinol, koji se koristi u lečenju gihta, postoji kod bolesnika koji imaju alel HLA-B*58:01 ali ne i kod bolesnika koji imaju alel HLA-B*58:02 (Howell, 2014).

1.6.5.6 Udruženost HLA i narkolepsije

Narkolepsija je udružena sa alelom HLA-DQB1*06:02 i 90-100% bolesnika sa katapleksijom ima ovaj alel. S druge strane, alel HLA-DQB1*06:01, koji se razlikuje samo u 9 rezidua, je protektivan. Bolest nastaje usled nedostatka neurotransmitera hipokretina, što je posledica odsustva neurona u hipotalamusu koji sekretuju hipokretin. Pored evidentnog značaja alela HLA, još uvek nema dokaza za pretpostavku da je odsustvo hipokretin-sekretujućih neurona posledica autoimunosti posredovane alelima HLA-DQB1*06:02 (Caillat-Zucman, 2009).

1.7 HLA tipizacija

Određivanje antigena i alela sistema HLA, odnosno HLA tipizacija, se radi serološkim i molekularnim testovima. Serološkim testovima se određuje fenotip, odnosno antigeni na površini ćelija, upotrebom odgovarajućih test seruma. Molekularnim testovima se određuje genotip, odnosno dokazuju aleli HLA (Nelson, 2001). U zavisnosti od raspoloživih tehnika i kliničkih potreba, uobičajeno se prvo određuju antigeni ili grupe alela za svaki lokus, a zatim se definišu pojedinačni aleli (Tiercy, 2002; Elsner i Blasczyk, 2004; Oudshoorn i sar., 2007; Erlich, 2012).

1.7.1 Serološki testovi tipizacije HLA

Za određivanje antigena sistema HLA koristi se mikrolimfocitotoksični test (engl. *complement dependent cytotoxicity assay* - CDC) koji je zasnovan na lizi ispitivanih limfocita nakon vezivanja specifičnog anti-HLA antitela u prisustvu komplementa (Schreuder 2000; Nelson, 2001). Za ispitivanje se koriste limfociti periferne krvi, ali i limfociti dobijeni iz limfnog čvora i slezine. Test serumi se dobijaju od imunizovanih osoba, prvenstveno višerotki, ili se koriste monoklonska antitela. Suspenzija limfocita se dodaje u mikroploče sa test serumima, a posle inkubacije sa komplementom i dodavanja vitalne boje procenjuje se intenzitet reakcija iz odnosa vijabilnih i nevijabilnih ćelija (Schreuder 2000). Na rezultat tipizacije serološkim testovima utiče vijabilnost ćelija i ekspresija antigena na površini ćelija, kao i specifičnost antitela koja se koriste. Poređenjem testova molekularne i serološke tipizacije pokazano je da greške serološke tipizacije iznose i preko 20% kao posledica nemogućnosti da se definiše antigen ('blank') ili da se odredi podtip antigena u serološkoj tipizaciji zbog nedostatka test seruma za retke specifičnosti. Razlog tome je da su polimorfizmi molekula HLA najvećim delom lokalizovani u peptid-vezujućem mestu molekula HLA koji nije dostupan antitelu. Tako je na primer, visok nivo neslaganja rezultata serološke i molekularne tipizacije nađen za lokus HLA-C jer serološkim testovima nije moguće dokazati prisustvo većine antigena HLA-C (Mytilineos i sar., 1997; Lebedeva i sar., 2005; Lazaro i sar., 2008). Najviše neslaganja rezultata je dobijano prilikom serološke tipizacije uzoraka hematoloških bolesnika i nekada je tačna serološka tipizacija moguća

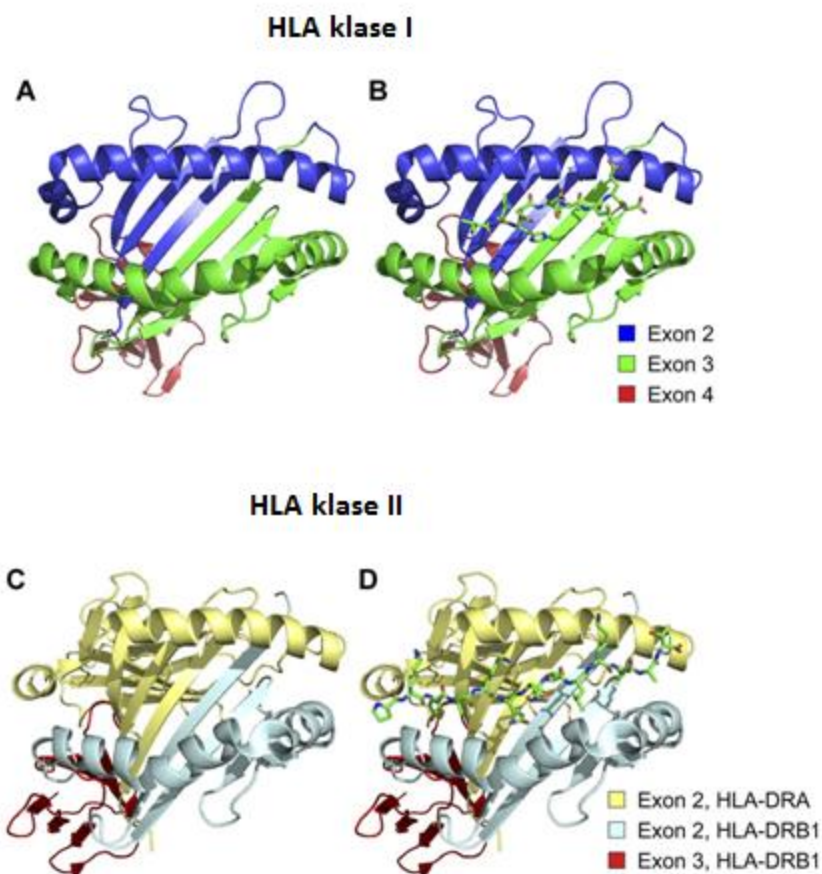
samo na osnovu tipizacije članova porodice. Zbog nedovoljnog broja ili lošeg kvaliteta ćelija kod ovih bolesnika u nekim slučajevima nije moguće uraditi HLA tipizaciju serološkim testovima. To ukazuje na prednost metoda molekularne tipizacije (Mytilineos i sar., 1997; Nelson, 2001; Schaffer i Olerup, 2001).

1.7.2 Molekularni testovi tipizacije HLA

Razvijeno je više tehnika HLA tipizacije koje su zasnovane na reakciji lančanog umnožavanja DNK (PCR), a najčešće korišćene u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi su hibridizacija umnožene DNK sekvence sa specifičnim oligonukleotidnim probama (engl. *sequence-specific oligonucleotide probes* - SSO), upotreba prajmera specifičnih za sekvencu (engl. *sequence-specific primers* - SSP) uz detekciju na osnovu različite elektroforetske pokretljivosti PCR produkta na gelu i sekvenciranje nukleotida (engl. *sequence-based typing* - SBT) (Bunce, 2000; Middleton, 2000; Nelson, 2001; Lind i sar., 2010; Erlich, 2012; Shiina i sar., 2012). Iako ove metode koriste različite pristupe da identifikuju odgovarajuće polimorfizme neophodne za dokazivanje alela HLA, sve su ograničene postojanjem nejasnih ili dvosmislenih rezultata (engl. *ambiguity*). Dvosmisleni rezultati nastaju kada metoda ne može da detektuje sve nukleotide relevantne za definisanje alela (kod SSO i SSP) ili kada je polimorfizam lokalizovan izvan regiona koji se sekvencira (kod SBT).

Rezultat HLA tipizacija može biti niske, visoke i alelske rezolucije (Nunes i sar., 2011). Niska rezolucija (engl. *low resolution*) podrazumeva rezultat DNK tipizacije na nivou prve dve cifre nomenklature alela (engl. *2-digits*) tj. podrazumeva određivanje grupe alela (npr. HLA-A*02). Takođe, niska rezolucija tipizacije je i rezultat tipizacije serološkim tehnikama. Alelska rezolucija (engl. *allelic resolution*) tipizacije podrazumeva određivanje jedinstvene nukleotidne sekvence alela u skladu sa važećom nomenklaturom (npr. HLA-A*02:01:01) (Marsh i sar., 2010; Robinson i sar., 2013). Visoka rezolucija (engl. *high resolution*) tipizacije je određivanje alela koji kodiraju istu proteinsku sekvencu peptid vezujućeg mesta molekula HLA. Peptid vezujuća mesta čine domeni $\alpha 1$ i $\alpha 2$ polipeptida klase I i domeni $\alpha 1$ i $\beta 1$ polipeptida klase II, tako da testovi visoke rezolucije moraju da omoguće definisanje egzona 2 i egzona 3 za region

klase I, odnosno egzona 2 za region klase II HLA (Slika 6). Rezultat tipizacije visokom rezolucijom podrazumeva prikazivanje prve dve grupe cifara alela, odnosno četiri cifre u nomenklaturi alela (engl. *4-digits*) (npr. HLA-A*02:01).



Slika 6. Kodiranje peptid-vezujućeg mesta (A i C bez peptida, B i D sa peptidom) molekula HLA klase I i HLA klase II
(preuzeto iz: doi: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-04-347286>)

Zbog stalno rastućeg broja alela, uspostavljen je i termin srednja rezolucija (engl. *intermediate resolution*) tipizacije koji naročito ima praktičnu primenu prilikom izbora davaoca za transplantaciju MČH. Rezultat srednje rezolucije sadrži više mogućih alela u definisanoj alelskoj grupi (npr. HLA-A*02:01/02:02/02:05). Takođe, rezultati tipizacije alelskom rezolucijom se mogu prikazivati i kao grupa P i grupa G alela. Aleli koji imaju

istu nukleotidnu sekvencu u egzonima koji kodiraju peptid vezujuće mesto se svrstavaju u grupe G. Aleli koji imaju identičnu polipeptidnu sekvencu u domenima koji čine peptid vezujuće mesto svrstavaju se u grupe P (Marsh i sar., 2010; Mack i sar., 2013; Robinson i sar., 2013). Poznavanje pripadnosti alela određenoj grupi ima praktičan značaj prilikom izbora podudarnih parova za transplantaciju MČH. Naime, s obzirom na to da se razlike dva alela koji pripadaju istoj grupi P ili G nalaze izvan peptid vezujućeg mesta, nepodudarnost zbog ovih alela neće imati uticaja na ishod transplantacije MČH. Tako na primer, poznato je da nepodudarnost alela lokusa HLA-DRB1 direktno utiče na ishod transplantacije MČH (Lee i sar., 2007; Petersdorf, 2008), ali je pokazano da nepodudarnost koja podrazumeva HLA-DRB1*14:01 i HLA-DRB1*14:54 ne utiče na pojavu komplikacija posle transplantacije (Yang i sar., 2009). Komitet za nomenklaturu Svetske zdravstvene organizacije je 2005. godine definisao HLA-DRB1*14:54 kao novi alel za koji je retrospektivno pokazano da je tri puta učestaliji u populacijama, a od HLA-DRB1*14:01 se razlikuje u samo jednom nukleotidu (T-C) na poziciji 51 egzona 3. Ova mutacija dovodi do zamene aminokiseline tirozin - histidinom u β 2 domenu molekula DR na mestu 112. Ovaj polimorfizam je lokalizovan bliže ćelijskoj membrani, tako da nema uticaja na vezivanje peptida ili interakciju molekula HLA sa receptorom na T ćelijama. Pasi i saradnici (Pasi i sar., 2011) su u studiji sa 189 parova koji su imali nepodudarnost HLA-DRB1*14:01/HLA-DRB1*14:54, pokazali da nije bilo uticaja ove nepodudarnosti na pojavu komplikacija kod bolesnika posle transplantacije MČH od nesrodnog davaoca. Za alele HLA-B*44:02 i HLA-B*44:27 koji pripadaju grupi HLA-B*44:02P i razlikuju se u sekvenci nukleotida koji kodiraju α 3 domen, dodatno je pokazano u *in vitro* funkcionalnim testovima da se ove razlike ne prepoznaju od strane aloreaktivnih CD8⁺ limfocita T, odnosno da se ova dva alela mogu svrstati u grupu dozvoljenih nepodudarnosti (Bettens i sar., 2013).

1.8 Značaj HLA u transplantaciji MČH

Alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (MČH) je prihvaćeni oblik lečenja za brojna hematološka i onkološka oboljenja, bolesti imunskog sistema i metabolizma (Gratwohl i sar., 2012). Nepodudarnosti u lokusima HLA su nezavisni

značajni faktor koji utiče na incidencu i težinu komplikacija posle transplantacije i ukupno preživljavanje bolesnika. Brojne studije ukazuju na značaj podudarnosti HLA, a razlike u zaključcima o značaju pojedinih lokusa na ishod transplantacije su posledica raznolikosti kliničkih studija u pogledu veličine uzorka, etničkog porekla ispitanika, dijagnoza i stadijuma bolesti u ispitivanim grupama, izvora transplantiranih MČH, kao i uzimanje u obzir različitih lokusa i tehnika tipizacije HLA. Savremene preporuke za izbor parova za transplantaciju (Bray i sar., 2008; Petersdorf, 2008; Spellman i sar., 2012; Furst i sar., 2013) su zasnovane na rezultatima analize uticaja HLA kod velikog broja transplantiranih bolesnika (Morishima i sar., 2002; Flomenberg i sar., 2004; Petersdorf i sar., 2004; Lee i sar., 2007).

1.8.1 HLA u izboru davaoca MČH

Razvojem tehnika tipizacije HLA je omogućen napredak u pouzdanosti određivanja podudarnosti između davaoca i primaoca MČH, ali se usložnjava postupak pronalaženja davaoca zbog velikog polimorfizma HLA (Oudshoorn i sar., 2007; Petersdorf, 2008).

1.8.1.1 Srodni davalac MČH

Najbolji davalac za bolesnika kome je potrebna transplantacija MČH je rođeni brat/sestra koji je identičan u HLA. S obzirom na to da se geni sistema HLA nasleđuju kao haplotip, a da je ekspresija kodominantna, verovatnoća da su rođeni brat/sestra potpuno podudarni ili potpuno različiti u HLA iznosi 25%, a 50% da su haploidentični (Gebel i sar., 2011). Haploidentične transplantacije od srodnog davaoca su terapijska opcija kod bolesnika koji nemaju odgovarajućeg podudarnog davaoca ili ukoliko stepen hitnosti ne omogućava sprovođenje postupka pronalaženja odgovarajućeg nesrodnog davaoca (Velardi, 2013). Zajednički haplotip podrazumeva podudarnost ne samo u glavnim histokompatibilnim lokusima, nego i drugim imunološki relevantnim lokusima na zajedničkom haplotipu (Ciurea i Champlin, 2013; Fernandez Vina i sar., 2013). Prilikom izbora haploidentičnog davaoca, mora se uzeti u obzir i specifičnost anti-HLA antitela ukoliko su prisutna kod primaoca (Brand i sar., 2013).

Prema važećim standardima Evropske federacije za imunogenetiku, verzija 5.7, (EFI, 2012), podudarnost u HLA kod serološki identičnih srodnika mora biti potvrđena na osnovu haplotipova roditelja ili molekularnim testovima visoke rezolucije.

1.8.1.2 Nesrodni davalac MČH

S obzirom na to da samo oko 30% bolesnika ima odgovarajućeg davaoca unutar članova porodice, šira primena alogene transplantacije zavisi od pronalaženja odgovarajućeg nesrodnog davaoca. Savremeni kriterijumi za izbor nesrodnog davaoca su zasnovani na definisanju alela testovima visoke rezolucije za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-C klase I i HLA-DRB1 i HLA-DQB1 klase II (Bray i sar., 2008; Petersdorf, 2008; EFI, 2012; Lown i Shaw, 2013). Podudarnost u svih pet lokusa (10/10 podudarnost) smanjuje smrtnost i rizik pojave teškog oblika bolesti „kalem protiv domaćina“ i udružena je sa boljim preživljavanjem bez bolesti u poređenju sa transplantacijama od nepodudarnog davaoca. Podudarnost na nivou visoke rezolucije za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DRB1 (8/8 podudarnost) je minimalan nivo podudarnosti koji je udružen sa boljim preživljavanjem (Bray i sar., 2008; Dehn i sar., 2008; Spellman i sar., 2008; Horowitz, 2009).

Kada za određenog bolesnika nije moguće pronaći potpuno podudarnog davaoca, jedna nepodudarnost se smatra prihvatljivim rizikom pojave smrtnosti povezane sa transplantacijom (Spellman i sar., 2012), a za izbor davaoca je važno poznavanje ishoda transplantacije u odnosu na nepodudarnost u pojedinim lokusima, kao i razlike značaja antigenske i alelske nepodudarnosti. Fernandez-Vina (Fernandez-Vina i sar., 2013) klasifikuje lokuse HLA u dve grupe u odnosu na značaj koji imaju na ishod transplantacije. Lokusi HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DRB1 su lokusi sa visokom ekspresijom antigena na površini ćelija i veoma povezani sa ishodom transplantacije, dok su HLA-DRB3/4/5, HLA-DQ i HLA-DP lokusi sa niskom ekspresijom alela.

Nepodudarnost alela za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 je udružena sa nepovoljnim ishodom transplantacije (Morishima i sar., 2002; Flomenberg i sar., 2004; Petersdorf, 2008; Furst i sar., 2013), odnosno, nepodudarnost na nivou alela, kao i antigena za ove lokuse, će imati jednak nepovoljni uticaj na pojavu komplikacija posle transplantacije. Postoje i dokazi o konkretnim aminokiselinskim supstitucijama kod

nepodudarnih alela koje utiču na ishod transplantacije. Tako na primer, pokazano je da nepodudarnost između davaoca i primaoca u alelima A*02:01 i A*02:06 je mogući faktor rizika za pojavu teškog oblika akutne bolesti „kalem protiv domaćina“ i veće smrtnosti, a da se nepodudarnost A*02:01 i A*02:05 može tolerisati (Baxter-Lowe i sar., 2009). Ispitivanjima u *in vitro* testovima, pokazano je da isti peptid u žlebu mesta vezivanja peptida kod alela B*44:02 i B*44:03 može imati različitu orijentaciju, a tu razliku mogu da prepoznaju T limfociti što može imati klinički značaj (Kawase i sar., 2007).

Za lokus HLA-C je potvrđeno da antigenska nepodudarnost ima nepovoljan uticaj na pojavu komplikacija, ali je i dalje sporan značaj nepodudarnosti alela HLA-C (Morishima i sar., 2002; Flomenberg i sar., 2004; Lee i sar., 2007; Woolfrey i sar., 2011; Furst i sar., 2013). Razlog može biti i to što su molekuli HLA-C ligandi za inhibitorne receptore na ćelijama NK. Inhibitorni receptori na ćelijama NK koji se vezuju za molekule klase I su KIR (engl. *killer immunoglobulin-like receptors* - KIR). Odsustvo određenog liganda HLA na ćeliji dovodi do aktivacije ćelija NK (Dupont i Hsu, 2004; Moretta i Moretta, 2004; Ruggeri i sar., 2006). Aleli HLA-C se svrstavaju u odnosu na prisustvo aminokiseline Asn80 (grupa C1) ili Lys80 (grupa C2). U zavisnosti od alela HLA-C kod primaoca, potencira se aktivirajuća ili inhibirajuća aktivnost ćelija NK davaoca. Zavisno od toga može se postići zaštitni efekat na pojavu relapsa leukemije i smanjena smrtnost. Visok rizik za nepovoljan ishod transplantacije ima alelska nepodudarnost između davaoca i primaoca u grupi C1 i podudarnost u grupi C2 alela za lokus HLA-C (Fischer i sar., 2012; Venstrom i sar., 2012).

Ranija saznanja (Lee i sar., 2007) da se alelska nepodudarnost u lokusima HLA-B ili HLA-C bolje toleriše od nepodudarnosti u lokusima HLA-A ili HLA-DRB1, nisu jasno potvrđena u novijim studijama (Spellman i sar., 2012).

Lokusi HLA sa niskom ekspresijom (HLA-DRB3/4/5, HLA-DQ i HLA-DP) imaju manju gensku raznolikost, ali mogu da indukuju aloreaktivnost *in vitro* (Fernandez-Vina i sar., 2013). Međutim uticaj izolovane nepodudarnosti ovih lokusa na ishod transplantacije je zanemarljiv ili je komplikovan da se dokaže s obzirom na to da postoji i izražena neravnoteža udruživanja alela bliskih lokusa. Do većeg mortaliteta može dovesti antigenska nepodudarnost u HLA-DQ, kao i udruženost nepodudarnosti u lokusima sa

niskom ekspresijom sa već prisutnom nepodudarnošću u drugim lokusima (Petersdorf, 2008; Weisdorf i sar., 2008; Furst i sar., 2013). Nepodudarnost u HLA-DPB1 može da indukuje aloreaktivni odgovor ćelija T, što dovodi do pojave akutne bolesti „kalem protiv domaćina“, ali je uočen i koristan efekat smanjenja rizika od relapsa leukemije (Shaw i sar., 2007). Zbog toga su aleli lokusa HLA-DPB1 svrstani u grupe, prikazane u radu Zino i saradnika (Zino i sar., 2004), u odnosu na epitope koje prepoznaju aloreaktivne T-ćelije, što omogućava razlikovanje dozvoljenih i nedozvoljenih nepodudarnosti HLA-DPB1 (Zino i sar., 2004; Fleischhauer i sar., 2012).

1.8.1.3 Umbilikalna krv

Upotreba umbilikalne krvi kao alternativnog izvora MČH ima prednost zato što je lakše dostupna, nema rizika za davaoca, manja je verovatnoća transmisivnih bolesti, a tipizirana jedinica umbilikalne krvi se može čuvati u zamrznutom stanju (Gluckman, 2012). Na ishod transplantacije MČH iz umbilikalne krvi najviše utiče broj primenjenih CD34+ ćelija, a zbog nezrelosti imunskog sistema davaoca, prihvatljiva je jedna ili dve nepodudarnosti (Petersdorf, 2008; Gluckman, 2012). Podudarnost se odnosi na lokuse HLA-A i HLA-B testovima niske rezolucije i HLA-DRB1 testovima visoke rezolucije (Petersdorf, 2008). Novije preporuke (Spellman i sar., 2012) uključuju i ostale lokuse, kao i tipizaciju testovima visoke rezolucije uzorka umbilikalne krvi, ali i određivanje majčinih HLA (van Rood i Oudshoorn, 2009; Scaradavou, 2012). Naime, tolerancija koja se stiče tokom fetalnog razvoja na nenasleđene majčine antigene (engl. *non-inherited maternal antigens* - NIMA) doprinosi da je prihvatljiva nepodudarnost koja se odnosi na NIMA (NIMA podudarnost). Novije studije su pokazale da su transplantacije sa NIMA podudarnim jedinicama umbilikalne krvi, i pored HLA nepodudarnosti, bile udružene sa boljim ukupnim preživljavanjem bolesnika i manjom pojavom relapsa bolesti (van Rood i Oudshoorn, 2009; Scaradavou, 2012; Spellman i sar., 2012).

1.8.2 Registar davalaca MČH

Zbog velikog polimorfizma sistema HLA, mala je verovatnoća da dve osobe koje nisu u srodstvu budu HLA identične. Za bolesnike koji nemaju odgovarajućeg davaoca MČH unutar članova porodice, pronalaženje odgovarajućeg nesrodnog davaoca omogućeno

je postojanjem registara davalaca MČH. Registri sadrže baze podataka o HLA tipizacijama prijavljenih dobrovoljnih davalaca MČH. Baze podataka o HLA tipizacijama iz nacionalnih registara davalaca MČH, kao i banaka umbilikalne krvi, su objedinjene u jedinstvenu bazu Svetskog registra davalaca kostne srži (engl. *Bone Marrow Donors Worldwide* - BMDW). Svetski registar je formiran 1989. godine, a prema izveštaju za 2012. godinu (BMDW, 2012) u Svetskom registru je bilo 20 226 863 davalaca prijavljenih u 67 registara iz 49 zemalja i 46 banaka umbilikalne krvi iz 30 zemalja. Funkcionisanje registara na globalnom nivou je definisano standardima WMDA (engl. *World Marrow Donor Assotiation* - WMDA), organizacije koja ima za cilj međunarodnu saradnju u razmeni visoko kvalitetnih produkata MČH za potrebe kliničke transplantacije širom sveta i promovisanje interesa davalaca (Hurley i sar., 2004; Hurley i sar., 2007; Petersdorf, 2010; Shaw i sar., 2010; WMDA, 2012).

Registar davalaca kostne srži Srbije (RDKS) je formiran 2005. godine u Institutu za transfuziju krvi Srbije u saradnji sa Ministarstvom zdravlja Republike Srbije, sa ciljem da omogući lečenje bolesnika kojima je neophodna transplantacija MČH u Srbiji a koji nemaju odgovarajućeg srodnog davaoca (Andrić, 2012). Od februara 2012. godine RDKS ima pristup bazi podataka Svetskog registra, što je omogućilo razvoj programa transplantacije MČH od nesrodnog davaoca u našoj zemlji.

1.8.2.1 Procena verovatnoće pronalaženja davaoca u Registru

Za procenu verovatnoće pronalaženja davaoca značajna je učestalost pojedinačnih alela, kao i učestalost haplotipova u populaciji iz koje potiče bolesnik i potencijalni davaoci. Poznavanje nacionalnih i globalnih učestalosti haplotipova i neravnoteže udruživanja alela HLA omogućavaju da se napravi procena mogućnosti pronalaženja podudarnog nesrodnog davaoca. Na osnovu toga, za bolesnike sa malom verovatnoćom pronalaženja davaoca, donosi se odluka o alternativnoj strategiji koja uključuje nepodudarnog davaoca, umbilikalnu krv ili haploidentičnu transplantaciju.

Metode za izračunavanje verovatnoće podudarnosti su zasnovane na populaciono specifičnim učestalostima haplotipova HLA koje se izračunavaju iz podataka o fenotipovima uz upotrebu odgovarajućih statističkih algoritama (Muller i sar., 2003;

Schmidt i sar., 2009; Eberhard i sar., 2013). Tako na primer, program Haplogenic, koji koristi najveći registar na svetu - nacionalni registar Amerike, NMDP - izračunava verovatnoću pronalaženja davaoca podudarnog u alelima lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 na osnovu učestalosti haplotipova u najvećim etničkim grupama Amerike (Maiers i sar., 2007). Najveći evropski registar - centralni registar Nemačke (nem. *Zentrales Knochenmarkspender-Register Deutschland* - ZKRD) - koristi program OptiMatch, koji je zasnovan na kombinovanju srednje rezolucije tipizacije nemačkih davalaca sa dobijenim učestalostima haplotipova alela tri lokusa, da bi se izračunalo kolika je verovatnoća s kojom je davalac podudaran u svakom lokusu, kao i ukupna verovatnoća u odnosu na HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 (Lown i Shaw, 2013).

Za planiranje daljeg lečenja može biti korisno i određivanje da li tipizacija HLA bolesnika pripada grupi sa visokom verovatnoćom (verovatnoća preko 95%) pronalaženja 10/10 alelski podudarnog davaoca unutar 6 meseci, grupi niske verovatnoće (manje od 5%) ili srednje verovatnoće (Tiercy i sar., 2007).

Na ishod transplantacije, pored podudarnosti HLA, može uticati i non-HLA polimorfizam i razlike drugih imunološki relevantnih lokusa na hromozomu 6. Takve razlike mogu biti mnogo češće kod bolesnika sa retkim fenotipovima i kada je davalac druge etničke pripadnosti. Zato bolesnici transplantirani od davaoca iz nacionalnog registra imaju bolje preživljavanje od bolesnika koji su dobili MČH od internacionalnog davaoca (Furst i sar., 2013). Zbog toga je preporuka da se nacionalna strategija razvoja registra zasniva na nacionalnim davaocima (Schmidt i sar., 2014), što utiče i na brzinu pronalaženja davaoca, odnosno pravovremenu transplantaciju.

1.9 Dosadašnja saznanja o polimorfizmu HLA u populaciji Srbije

Dosadašnja saznanja o polimorfizmu HLA u populaciji Srbije su bila zasnovana na rezultatima familijarnih ispitivanja 658 osoba primenom tehnika serološke tipizacije, gde je pokazana genetička varijabilnost i vezane asocijacije gena na osnovu antigena HLA-A i HLA-B kod stanovništva Srbije (Simonović, 1992). Takođe, dostupni su podaci učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A (N=291), HLA-B (N=291), HLA-C (N=126), HLA-DRB1 (N=386) dobijenih molekularnim tehnikama niske rezolucije (Andric i sar., 2007).

Do sada nije bilo podataka o učestalosti alela i haplotipova alela HLA u populaciji Srbije. Za potrebe transplantacije pacijenata sa ovih prostora, korišćene su dostupne učestalosti alela drugih populacija koje ne moraju nužno da budu identične našoj populaciji. Poznavanje polimorfizma HLA sopstvene populacije bi omogućilo skraćivanje vremena traženja davaoca i pravovremenu transplantaciju MČH. Takođe, ispitivanje polimorfizma HLA zdrave populacije Srbije je neophodan preduslov da bi se omogućilo dokazivanje relativnog rizika određenih alela HLA kod pacijenata u našoj zemlji.

1. Ustanoviti učestalost alelskih grupa za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DRB1, učestalost očekivanih haplotipova i učestalost alela u HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 lokusima.
2. Ustanoviti stepen genetske sličnosti sa drugim populacijama.
3. Proceniti optimalni broj davalaca u Registru davalaca kostne srži Srbije.

3 Materijal i metode

3.1 Ispitanici

Ispitivanje je rađeno kod zdravih, nesrodnih osoba koje su se prijavile u Registar davalaca kostne srži Srbije u periodu od 2005. do 2011. godine. Prilikom prijavljivanja, svi potencijalni davaoci su upoznati sa značajem HLA tipizacije za pronalaženje davaoca za određenog bolesnika, potpisali su saglasnost i dali uzorak krvi za HLA tipizaciju. Uzorci krvi su uzimani u transfuziološkim službama na celoj teritoriji Srbije.

Ispitanici su podeljeni u odnosu na nivo rezolucije tipizacije.

Grupa 1 obuhvata ispitanike kod kojih su testovima niske rezolucije određene grupe alela. Kod 1992 ispitanika je retrospektivnom analizom određena učestalost alelskih grupa za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 i učestalost haplotipova HLA-A-B, HLA-A-DRB1, HLA-B-DRB1 i HLA-A-B-DRB1. U podgrupi od 159 slučajno odabranih ispitanika (Grupa 1B) su dodatno određene grupe alela za lokuse HLA-C i HLA-DQ. Kod ove podgrupe ispitanika određena je učestalost alelskih grupa za lokuse HLA-C i HLA-DQB1 i učestalost haplotipova HLA-C-B, HLA-DRB1-DQB1 i HLA-A-B-C-DRB1-DQB1.

Grupa 2 je podgrupa koja obuhvata slučajno odabrane uzorke 112 ispitanika uzrasta od 18 do 35 godina u vreme ispitivanja. U ovoj grupi određeni su aleli za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 testovima visoke rezolucije i urađena analiza učestalosti alela i haplotipova alela dva, tri i pet lokusa.

3.2 Analizirane populacije

Za ispitivanje stepena genetske sličnosti sa drugim populacijama, podaci o učestalosti alela i haplotipova populacija su dobijeni analizom podataka koji su bili dostupni na www.allelefrequencies.net u novembru 2012. godine (Middleton i sar., 2003; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Odabrane su populacije Evrope, kao i populacije bele rase ispitanika iz Australije i Amerike za koje su bili dostupni podaci o učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A i HLA-B. Ispitivanje stepena genetske sličnosti je rađeno u odnosu na 284222 osoba iz 46 populacija: [Albanija](#) (n=160), [Argentina Buenos Aires pop2](#) (n=1216), [Australija Zapad belci](#) (n=891), [Austrija](#) (n=200), [Azorska ostrva](#) (n=1050), [Bosna i Hercegovina](#) (n=134), [Brazil Parana belci](#) (n=2775), [Bugarska](#) (n=55),

Hrvatska (n=100), Republika Češka Romi pop2 (n=46), Republika Češka Kurdi (n=74), Engleska London Aškenazi Jevreji (n=500), Francuska ostrvo Korzika (n=100), Francuska Grenobl, Nant i Ren (n=6094), Francuska jugoistok (n=130), Nemačka Esen (n=174), Grčka Krit (n=135), Grčka sever (n=500), Severna Irska (n=1000), Izrael Jevreji pop 2 (n=23000), Italija (n=159311), Makedonija pop 3 (n=172), Makedonja pop 4 (n=216), Madeira pop 3 (n=538), Maroko pop 2 (n=110), Norveška pop 2 (n=576), Norveška Sami (n=200), Portugalija Lisabon (n=17420), Portugalija Porto (n=7937), Rumunija (n=348), Rusija Moskva (n=2650), Rusija severozapad pop3 (n=100), Rusija region Samara (n=2500), Rusija južni Ural Baškiri (n=146), Rusija južni Ural Tatari (n=135), Španija Ibica (n=88), Španija Majorka (n=407), Španija Jevreji sa Majorke (n=103), Španija Minorka (n=94), Španija Mursija (n=173), Turska pop 2 (n=228), Turska pop 5 (n=142), SAD OPTN belci (n=8525), Vels (n=1798), Vels pop2 (n=39979).

3.3 Uzorci

3.3.1 Uzorci krvi

Uzorci krvi ispitanika su uzimani u transfuziološkim službama na celoj teritoriji Srbije. Uzorci su transportovani u Odeljenje za tipizaciju tkiva Instituta za transfuziju krvi Srbije na sobnoj temperaturi. Uzorci krvi su uzimani u sterilne epruvete sa odgovarajućim antikoagulansom (Vacutainer EDTA, 4mL, Therumo). Uzorci krvi su do 7 dana od venepunkcije skladišteni na 4 °C, zatim na -80 °C.

3.3.2 Uzorci DNK

Uzorci DNK su dobijani unutar 7 dana od venepunkcije, kao i iz odmrznutih uzoraka krvi, korišćenjem komercijalnih reagenasa QIAamptm DNA Blood Mini Kit (Qiagen) i Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega), u skladu sa uputstvima proizvođača. Koncentracije DNK su merene fluorometrijski na aparatu Qubit Fluorometer (Invitrogen) uz upotrebu komercijalnog kita (Quant-iTTM DNA Assay Kit, Invitrogen) i spektrofotometrijski na aparatu Anthelie UV-VIS Spectrophotometer (Secomam). Uzorci DNK su skladišteni do 30 dana na 4 °C ili duže na -80 °C.

3.4 Metode

3.4.1 Izolacija DNK

Izolacija metodom QIAamp omogućava dobijanje 4-12 µg DNK iz 200 µL cele krvi, sa veličinom fragmenata do 50kb (najviše fragmenta je veličine 20-30 kb). QIAamptm DNA Blood Mini Kit sadrži mikrokolonu sa silikatnom membranom, proteinazu K i puferu za liziranje, ispiranje i eluciju. Postupak izolacije je rađen prema uputstvu proizvođača. Ukratko, u epruvete sa 20 µL proteinaze dodavano je 200 µL uzorka cele krvi i 200 µL pufera za liziranje. Nakon inkubacije tokom 10 minuta na 56°C, dodavano je 200 µL 96% etanola. Lizat je prebacivan u mikrokolone gde se DNK vezivala za silikatnu membranu a preostali sadržaj je uklanjan puferima za ispiranje centrifugiranjem mikrokolona. Dodavanjem pufera za eluciju u mikrokolonu, DNK je eluirana u 1,5 mL epruvete.

Izolacija DNK na aparatu Maxwell 16 je automatizovani postupak koji omogućava istovremenu izolaciju 16 uzoraka. Iz 400 µL cele krvi dobija se do 15 µg DNK. Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit sadrži nosače sa odgovarajućim reagensima (odeljak sa puferom za liziranje, odeljak sa paramagnetnim česticama, odeljci sa puferima za ispiranje), pufer za eluciju i prenosiocem paramagnetnih partikula. U automatizovanom postupku, aparat upravlja prenosiocem paramagnetnih partikula kroz odeljke kertridža i na taj način omogućava vezivanje, pranje i eluciju DNK.

3.4.2 HLA tipizacija

HLA tipizacija je rađena molekularnim testovima koji su zasnovani na reakciji lančanog umnožavanja DNK (PCR). Određivanje grupe alela ispitivanog lokusa je rađeno testovima niske/srednje rezolucije. Zatim su testovima visoke rezolucije određivani aleli ispitivanog lokusa. Korišćene su dve vrste testova. Prva grupa testova je korišćena je za određivanje grupe alela i odnosi se na upotrebu oligonukleotidnih proba specifičnih za sekvencu (PCR-SSO). Druga grupa testova podrazumeva upotrebu prajmera specifičnih za sekvencu (PCR-SSP) i korišćena je za dokazivanje alela, kao i za razrešavanje nejasnih-dvosmislenih rezultata (*ambiguity*) dobijenih tehnikom PCR-SSO. Tipizacije testovima niske rezolucije su rađene od 2005. do 2011., a tipizacije testovima visoke rezolucije su rađene od 2008. do 2012. godine.

3.4.2.1 HLA tipizacija metodom PCR-SSO

HLA tipizacija metodom PCR-SSO je rađena upotrebom Dynal RELI™ SSO HLA Typing Kit-a (Dynal Invitrogen Corporation) po uputstvu proizvođača. Za amplifikaciju su korišćeni biotinizirani prajmeri specifični za lokus. Nakon PCR-a, amplikoni su hemijski denaturisani. Hibridizacija jednolančanih amplikona sa oligonukleotidnim probama specifičnim za sekvencu je vršena reverznim blotom u aparatu Dynal Autorely MII uz upotrebu reagenasa koji su sastavni deo kita. Za analizu rezultata tipizacije korišćen je softver Dynal PMP istog proizvođača.

3.4.2.2 HLA tipizacija metodom PCR-SSP

HLA tipizacija metodom PCR-SSP je zasnovana na upotrebi parova oligonukleotidnih prajmera koji su specifični za određenu sekvencu alela ili grupe alela. Prajmeri su se vezivali za ispitivanu DNK u kontrolisanim uslovima PCR-a. Umnoženi fragmenti DNK (amplikoni) su razdvajani na osnovu veličine fragmenta u agaroznom gelu. Gel je sadržao etidijum bromid koji je omogućavao detekciju razdvojenih fragmenata uz pomoć UV svetlosti. Interpretacija rezultata bila je bazirana na prisustvu ili odsustvu, kao i na veličini specifičnog produkta PCR reakcije. U svaku PCR reakciju bila je uključena i pozitivna kontrola. Pozitivnu kontrolu su činili parovi prajmera specifični za konzervirani gen humanog hormona rasta, koji je prisutan u svakoj humano DNK.

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su komercijalni kitovi (Olerup SSP™) za nisku i visoku rezoluciju tipizacije (Olerup i Zetterquist, 1992). Kit sadrži liofilizovane prajmere specifične za sekvencu alela HLA i gen humanog hormona rasta, PCR Master Mix i informacione tabele specifične za lot. Liofilizovani prajmeri su razliveni u 0,2 mL udubljenja PCR ploča. Svaki bunarčić sadrži poznatu mešavinu specifičnih prajmera i prajmere kontrole. U bunarčiće je dodavano po 10 µL mešavine koja je pravljenjena u zavisnosti od broja bunarčića (Q) u PCR ploči prema tabeli 2. Q je bio od 5 do 92, zavisno od lota ispitivane grupe alela.

Tabela 2. Pravljenje mešavine za SSP Olerup SSP™

Sastojak	Količina
DNK (preporučena čistoća je A260/A280 ratio 1,6-2,0, a optimalna koncentracija DNK je 15-50 ng/μL)	Qx2 μL
PCR Master Mix	Qx3 μL
Taq polimeraza 5 u/ μL (Qiagen)	Qx0.08 μL
Destilovana voda	Qx5 μL- količina Taq
Ukupna zapremina mešavine	Qx10 μL

Umnožavanje DNK (amplifikacija) je vršena u programabilnom termobloku GeneAmplifier 9700 (Applied Biosystems) prema protokolu proizvođača (Tabela 3):

Tabela 3. Uslovi PCR za SSP Olerup SSP™

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
94°C	2 min.	1 ciklus
94°C	10 sek.	10 ciklusa
65°C	60 sek.	
94°C	10 sek.	20 ciklusa
61°C	50 sek.	
72°C	30 sek.	

Analiza PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu u 0,5x TBE puferu uz dodatak etidijum bromida ili Gel Red-a, tokom 15-20 minuta na 8-10 V/cm. Fotografije gela su pravljene na UV transiluminatoru (UV Transilluminator, PhotoDoc-It Imaging System). Analiza prisustva specifičnih i kontrolnih reakcija je rađena u odnosu na DNK sa fragmentima poznate veličine (DNA Size Marker, Olerup SSP, 50-1000 bp), koja je dodavana za svaku elektroforezu.

Za analizu dobijenih rezultata korišćene su informacione tabele specifične za lot (Olerup SSP™), kao i softver Helmberg-Score istog proizvođača.

3.5 Statistička obrada podataka

Učestalost alela i grupa alela dobijena je direktnim brojanjem. Ocena učestalosti pojedinačnih haplotipova dobijena je kroz postupak maksimizacije očekivanja (EM), odnosno maksimizacijom ocene verodostojnosti (MLE) mogućih kombinacija alela za date lokuse. Za dobijanje učestalosti alela i haplotipova korišćen je program ARLEQUIN, verzija 3. 11. (Excoffier i sar., 2005). Standardne devijacije učestalosti su ocenjene bootstrap procedurom u 1000 iterativnih koraka, a ostali parametri programa su podešeni na svoje podrazumevajuće vrednosti.

Održivost pretpostavke o Hardy–Weinbergovoj ravnoteži HLA lokusa u svakoj od ispitivanih grupa je testirana primenom modifikovanog algoritma skrivenog Markovljevog lanca (Guo i Thompson, 1992) sa pristupom od 100 000 koraka i 10 000 dememorizacionih koraka na način implementiran u softverskom paketu ARLEQUIN.

Vrednosti D (neravnoteža udruživanja, LD) računane su za svaki par lokusa A i B po formuli:

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

gde su p_1 i q_1 učestalosti alela A_1 i alela B_1 , dok je x_{11} dobijena učestalost A_1B_1 haplotipa.

Vrednosti D' (relativna neravnoteža udruživanja) dobijene su po formuli:

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

$$\text{uz } D_{max} = \begin{cases} \min(p_1q_1, p_2q_2) & \text{kada je } D < 0 \\ \min(p_1q_2, p_2q_1) & \text{kada je } D > 0 \end{cases}$$

pri čemu su p_2 i q_2 učestalosti alela A_2 i B_2 .

Vrednost 0 za D' ukazuje da su ispitivani lokusi nezavisni jedan od drugog, dok vrednost 1 pokazuje kompletnu zavisnost ispitivanih lokusa.

Populacija naših ispitanika je poređena sa drugim populacijama tako što su prvo sve populacije grupisane na osnovu učestalosti grupa alela lokusa HLA-A i HLA-B pomoću hijerarhijske klasterizacije (Wardov metod) uz korišćenje Nei-ove distance (Nei, 1972) kao mere udaljenosti među populacijama (DA). Za računanje D , D' , Nei-ovih distanci i klasterizaciju korišćen je softverski paket R, verzija 3. 0. 1. (R Core Team, 2013). Zatim je konstruisan dendrogram pomoću rutina implementiranih u R paket ade4 (Dray i Dufour, 2007).

Verovatnoća da svaki naredni slučajni bolesnik nađe odgovarajućeg davaoca, u funkciji veličine registra n , je računata po formuli:

$$c(n) = \sum_i f_i \cdot [1 - (1 - f_i)^n] \quad (1)$$

pri čemu je f_i učestalost i -tog fenotipa, i svi fenotipovi sa pozitivnom učestalošću su uzeti u obzir.

Povećanje ove verovatnoće sa svakim novim davaocem unetim u registar dobija se prvim izvodom formule (1), to jest:

$$c'(n) = -\sum_i f_i \cdot \ln(1 - f_i) \cdot (1 - f_i)^n \quad (2)$$

4 REZULTATI

4.1 Demografski podaci ispitanika

Broj ispitanika u odnosu na pol i uzrast je prikazan u tabeli 4. Osobe muškog pola čine 62,9% ispitanika, a 54,07% (1077/1992) ispitanika je bilo mlađe od 36 godina.

Tabela 4. Broj ispitanika u odnosu na uzrast i pol

Uzrast	Muški pol		Ženski pol		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
18 - 25 godina	150	7,53%	127	6,37%	277	13,91%
26 - 35 godina	504	25,30%	296	14,86%	800	40,16%
36 - 45 godina	389	19,53%	201	10,09%	590	29,61%
46 - 55 godina	188	9,44%	112	5,62%	300	15,06%
>55 godina	12	0,60%	1	0,50%	13	0,65%
Nepoznato	10	0,51%	2	0,10%	12	0,60%
<i>Ukupno</i>	<i>1253</i>	<i>62,90%</i>	<i>739</i>	<i>37,10%</i>	<i>1992</i>	<i>100%</i>

U tabeli 5 je prikazan broj davalaca u odnosu na mesto rođenja i mesto stanovanja. U Srbiji je rođeno 86,14% (1716/1992) ispitanika, a 98,89% (1970/1992) živi na teritoriji Srbije. Najveći broj ispitanika je iz Beogradskog regiona (41,52%), zatim iz Regiona Šumadije i Zapadne Srbije (29,27%) i Regiona Vojvodine (19,28%).

Tabela 5. Raspodela ispitanika prema mestu rođenja i mestu stanovanja

Regioni Srbija	Mesto rođenja		Mesto stanovanja	
	N	%	N	%
Beogradski region	540	27,11%	827	41,52%
Region Vojvodina	360	18,07%	384	19,28%
Region Šumadije i Zapadne Srbije	602	30,22%	583	29,27%
Region Istočne i Južne Srbije	190	9,54%	167	8,38%
Region Kosova i Metohije	34	1,71%	9	0,45%
<i>Drugo</i>				
Bosna i Hercegovina	90	4,52%	13	0,65%
Crna Gora	29	1,46%	7	0,35%
Hrvatska	83	4,17%	1	0,05%
Makedonija	12	0,60%	1	0,05%
Slovenija	8	0,40%	0	0,00%
Drugo inostranstvo	22	1,10%	0	0,00%
Nepoznato	22	1,10%	0	0,00%
<i>Ukupno</i>	<i>1992</i>	<i>100,00%</i>	<i>1992</i>	<i>100,00%</i>

88,3% ispitanika se izjasnilo da su po nacionalnoj pripadnosti Srbi (tabela 6).

Tabela 6. Broj ispitanika u odnosu na nacionalnu pripadnost

Nacionalna pripadnost	N	%
Srbi	1759	88,30%
Mađari	58	2,91%
Crnogorci	18	0,90%
Hrvati	15	0,75%
Jugoslaveni	8	0,40%
Slovaci	8	0,40%
Makedonci	6	0,30%
Muslimani	5	0,25%
Slovinci	5	0,25%
Bugari	3	0,15%
Ukrajinci	3	0,15%
Bošnjaci	2	0,10%
Nemci	2	0,10%
Arapi	2	0,10%
Bunjevci	1	0,05%
Česi	1	0,05%
Poljaci	1	0,05%
Rumuni	1	0,05%
Rusi	1	0,05%
Sirijci	1	0,05%
Turci	1	0,05%
Nepoznato	91	4,57%
<i>Ukupno</i>	<i>1992</i>	<i>100,00%</i>

4.2 Analiza grupa alela HLA

Grupe alela su određene testovima niske rezolucije. Kod 1992 ispitanika su određene grupe alela za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 (Grupa 1A). U podgrupi od 159 ispitanika (Grupa 1B) su dodatno određene grupe alela za lokuse HLA-C i HLA-DQ.

4.2.1 Hardy-Weinbergova ravnoteža za ispitivanu grupu 1

Analizom HWE je pokazano da su odabrane grupe ispitanika u ravnoteži za sve ispitivane lokuse. Očekivane i dobijene vrednosti učestalosti gena za svaki lokus se nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$).

U tabeli 7 je prikazan HWE za ispitivanu grupu sa 1992 ispitanika (Grupa 1A). Za lokus HLA-A, dobijena heterozigotnost je 85,59% a očekivana 85,37% ($p=0,89$). Za lokus HLA-B, dobijena je 92,36% a očekivana heterozigotnost je 92,48% ($p=0,13$). Za lokus HLA-DRB1 dobijena heterozigotnost je 89,76% a očekivana je 89,27% ($p=0,37$).

Tabela 7. Hardy–Weinbergova ravnoteža za Grupu 1A (N=1992)

Lokus	Dobijena heterozigotnost	Očekivana heterozigotnost	p	s.d.
HLA-A	0,8559	0,8538	0,8952	0,0006
HLA-B	0,9237	0,9248	0,1282	0,0006
HLA-DRB1	0,8976	0,8927	0,3695	0,0008

U tabeli 8 je prikazan HWE za ispitivanu grupu sa 159 ispitanika (Grupa 1B). Za lokus HLA-A, dobijena heterozigotnost je 79,24% a očekivana 83,49% ($p= 0,75$). Za lokus HLA-B, dobijena je 93,08% a očekivana heterozigotnost je bila 92,08% ($p= 0,36$). Za lokus HLA-C dobijena heterozigotnost iznosi 89,94% a očekivana je 87,44% ($p=0,62$). Za lokus HLA-DRB1 dobijena heterozigotnost je 91,19% a očekivana 89,27% ($p =0,82$). Za lokus HLA-DQB1 dobijena heterozigotnost je 71,07% a očekivana 73,19% ($p=0,96$).

Tabela 8. Hardy–Weinbergova ravnoteža za Grupu 1B (N=159)

Lokus	Dobijena heterozigotnost	Očekivana heterozigotnost	p	s.d.
HLA-A	0,7925	0,8350	0,7550	0,0008
HLA-B	0,9308	0,9208	0,3655	0,0005
HLA-C	0,8994	0,8744	0,6251	0,0009
HLA-DRB1	0,9120	0,8927	0,8176	0,0009
HLA-DQB1	0,7107	0,7319	0,9629	0,0006

4.2.2 Učestalost grupa alela HLA

Učestalost alelskih grupa i fenotipova za lokus HLA-A je prikazana u tabeli 9. Dokazano je prisustvo 16 grupa alela, od čega 13 ima učestalost veću od 0,01. Najčešća alelska grupa za lokus HLA-A je HLA-A*02 (29,5%), zatim slede HLA-A*01 (14,2%), HLA-A*03 (11,3%), HLA-A*24 (11,1%), HLA-A*11 (6,1%) i HLA-A*26 (6,0%). Polovina ispitanika ima HLA-A*02, a 15,7% njih su homozigoti. Grupe alela koje nisu pronađene u ispitivanoj populaciji su A*34, A*36, A*43, A*74 i A*80.

Tabela 9. Učestalost grupa alela lokusa HLA-A (N=1992)

Grupa alela	n	Učestalost grupe alela	s.d.	Broj homozigota	Učestalost fenotipa
A*01	568	0,1426	0,0053	45	26,25%
A*02	1174	0,2947	0,0070	159	50,95%
A*03	451	0,1132	0,0050	30	21,13%
A*11	244	0,0612	0,0038	8	11,85%
A*23	89	0,0223	0,0023	1	4,42%
A*24	442	0,1109	0,0047	20	21,18%
A*25	105	0,0264	0,0025	0	5,27%
A*26	240	0,0602	0,0037	8	11,65%
A*29	29	0,0073	0,0013	0	1,46%
A*30	84	0,0211	0,0023	1	4,17%
A*31	77	0,0193	0,0022	2	3,76%
A*32	190	0,0477	0,0034	6	9,24%
A*33	101	0,0254	0,0024	3	4,92%
A*66	15	0,0038	0,0010	0	0,75%
A*68	168	0,0422	0,0032	4	8,23%
A*69	7	0,0018	0,0007	0	0,35%

U tabeli 10 su prikazane grupe alela lokusa HLA-B. Dokazano je prisustvo 28 grupa alela, s tim što 21 grupa alela ima učestalost veću od 0,01. Najčešće su HLA-B*35 (13,1%) i HLA-B*51 (12,8%). U ispitivanoj grupi 47,9% osoba ima jednu od ove dve alelske grupe u lokusu HLA-B. Sledeće po učestalosti su HLA-B*18 (9,9%), HLA-B*44 (9,2%), HLA-B*08 (8,6%), HLA-B*38 (5,6%), HLA-B*27 (4,99%), HLA-B*07 (4,97%). Grupe alela lokusa B koje nisu prisutne u ispitivanoj grupi su B*42, B*59, B*67, B*73, B*78, B*81, B*82 i B*83.

Tabela 10. Učestalost grupa alela lokusa HLA-B (N=1992)

Grupa alela	n	Učestalost grupe alela	s.d.	Broj homozigota	Učestalost fenotipa
B*07	195	0,0497	0,0035	9	9,34%
B*08	344	0,0863	0,0047	16	16,47%
B*13	131	0,0329	0,0028	1	6,53%
B*14	126	0,0316	0,0026	3	6,17%
B*15	144	0,0366	0,0030	0	7,23%
B*18	386	0,0989	0,0047	20	18,37%
B*27	199	0,0500	0,0035	2	9,89%
B*35	516	0,1313	0,0053	25	24,65%
B*37	53	0,0133	0,0018	0	2,66%
B*38	221	0,0562	0,0036	8	10,69%
B*39	124	0,0314	0,0029	4	6,02%
B*40	143	0,0361	0,0029	3	7,03%
B*41	53	0,0133	0,0018	1	2,61%
B*44	360	0,0916	0,0047	17	17,22%
B*45	4	0,0010	0,0005	0	0,20%
B*46	1	0,0003	0,0003	0	0,05%
B*47	19	0,0050	0,0011	1	0,90%
B*48	4	0,0010	0,0005	0	0,20%
B*49	117	0,0294	0,0027	0	5,87%
B*50	45	0,0113	0,0017	0	2,25%
B*51	503	0,1285	0,0052	40	23,24%
B*52	46	0,0118	0,0017	2	2,21%
B*53	9	0,0023	0,0007	0	0,45%
B*54	1	0,0003	0,0003	0	0,05%
B*55	45	0,0113	0,0017	0	2,26%
B*56	45	0,0113	0,0017	0	2,26%
B*57	75	0,0188	0,0022	0	3,76%
B*58	34	0,0085	0,0015	0	1,71%

U tabeli 11 su prikazane učestalosti grupa alela lokusa HLA-C. Dokazano je 14 grupa alela. Sve, osim HLA-C*16 i HLA-C*18, imaju učestalost veću od 0,01. Najučestalija grupa alela je HLA-C*07 (24,8%). Sledeće alelske grupe po učestalosti su HLA-C*04, HLA-C*12 (13,5% obe) i HLA-C*06 (10,1%). 44% ispitanika ima HLA-C*07.

Tabela 11. Učestalost grupa alela lokusa HLA-C (N=159)

Grupa alela	n	Učestalost grupe alela	s.d.	Broj homozigota	Učestalost fenotipa
C*01	22	0,0692	0,0139	1	13,21%
C*02	22	0,0692	0,0138	1	13,21%
C*03	19	0,0597	0,0132	0	11,95%
C*04	43	0,1352	0,0191	1	26,41%
C*05	11	0,0346	0,0101	0	6,92%
C*06	32	0,1006	0,0164	2	18,87%
C*07	79	0,2484	0,0248	9	44,02%
C*08	13	0,0409	0,0113	0	8,18%
C*12	43	0,1352	0,0197	2	25,79%
C*14	12	0,0377	0,0108	0	7,55%
C*15	15	0,0472	0,0114	0	9,43%
C*16	1	0,0031	0,0032	0	0,63%
C*17	5	0,0157	0,0070	0	3,14%
C*18	1	0,0031	0,0031	0	0,63%

Dokazano je prisustvo svih grupa alela za lokus HLA-DRB1 (tabela 12). Sve alelske grupe, osim DRB1*09 imaju učestalost veću od 0,01. Najčešće grupe alela su HLA-DRB1*11 (16,9%) i HLA-DRB1*13 (13,2%), zatim HLA-DRB1*03 i HLA-DRB1*16 sa istom učestalošću (10,9%). Slede HLA-DRB1*01 (10,3%), HLA-DRB1*15 (9,8%) i HLA-DRB1*04 (8,98%).

Tabela 12. Učestalost grupa alela lokusa HLA-DRB1 (N=1992)

Grupa alela	n	Učestalost grupe alela	s.d.	Broj homozigota	Učestalost fenotipa
DRB1*01	410	0,1029	0,0050	24	19,38%
DRB1*03	433	0,1087	0,0049	15	20,98%
DRB1*04	358	0,0899	0,0044	19	17,02%
DRB1*07	284	0,0713	0,0043	8	13,85%
DRB1*08	123	0,0309	0,0027	0	6,17%
DRB1*09	15	0,0038	0,0009	0	0,75%
DRB1*10	44	0,0110	0,0016	0	2,21%
DRB1*11	673	0,1689	0,0061	56	30,97%
DRB1*12	76	0,0191	0,0021	0	3,81%
DRB1*13	527	0,1323	0,0055	32	24,85%
DRB1*14	216	0,0542	0,0037	2	10,74%
DRB1*15	392	0,0984	0,0048	21	18,62%
DRB1*16	433	0,1087	0,0052	27	20,38%

U tabeli 13 je prikazana učestalost grupa alela za lokus HLA-DQB1. Sve grupe alela lokusa HLA-DQB1 imaju učestalost veću od 1%. Najčešći su HLA-DQB1*03 i HLA-DQB1*05 (33,3% i 33,0%) sa istom fenotipskom učestalošću (54,7%). Zatim slede HLA-DQB1*02 (16,9%), HLA-DQB1*06 (14,5%) i HLA-DQB1*04 (2,2%).

Tabela 13. Učestalost grupa alela lokusa HLA-DQB1 (N=159)

Grupa alela	n	Učestalost grupe alela	s.d.	Broj homozigota	Učestalost fenotipa
DQB1*02	54	0,1698	0,0207	6	30,19%
DQB1*03	106	0,3333	0,0262	19	54,71%
DQB1*04	7	0,0220	0,0081	0	4,40%
DQB1*05	105	0,3302	0,0262	18	54,71%
DQB1*06	46	0,1447	0,0199	3	27,04%

4.2.3 Učestalost haplotipova grupa alela HLA

Maksimizacijom ocene verodostojnosti (MLE) mogućih kombinacija grupa alela lokusa HLA-A i lokusa HLA-B, dobijeno je 360 haplotipova HLA-A-B. Učestalost veću od 1% ima 26 haplotipova, koji su prikazani u tabeli 14. Od toga, za 38,5% (10/26) haplotipova je dobijena vrednost D' veća od 0,05. Najčešći haplotipovi HLA-A-B su A*01-B*08 (6,7%) i A*02-B*51 (6,2%).

Tabela 14. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-A i HLA-B sa učestalošću većom od 1% (N=1992)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*01-B*08	0,0673	0,0039	0,4223
A*02-B*51	0,0624	0,0043	0,0956
A*02-B*44	0,0386	0,0034	0,0434
A*02-B*18	0,0330	0,0032	0,0144
A*11-B*35	0,0255	0,0027	0,1418
A*02-B*27	0,0248	0,0027	0,0359
A*02-B*35	0,0248	0,0029	-0,0227
A*26-B*38	0,0235	0,0025	0,3532
A*03-B*35	0,0230	0,0027	0,0701
A*33-B*14	0,0182	0,0022	0,5653
A*03-B*07	0,0173	0,0022	0,1087
A*24-B*35	0,0172	0,0024	0,0228
A*24-B*44	0,0160	0,0023	0,0576
A*24-B*51	0,0148	0,0024	0,0050
A*02-B*15	0,0146	0,0021	0,0134
A*03-B*18	0,0139	0,0022	0,0264
A*03-B*51	0,0136	0,0024	-0,0012
A*02-B*40	0,0134	0,0022	0,0098
A*24-B*18	0,0134	0,0022	0,0245
A*01-B*35	0,0132	0,0020	-0,0074
A*25-B*18	0,0130	0,0019	0,1076
A*02-B*38	0,0117	0,0021	-0,0073
A*02-B*39	0,0114	0,0020	0,0074
A*02-B*07	0,0111	0,0019	-0,0053
A*32-B*35	0,0110	0,0018	0,0375
A*23-B*44	0,0101	0,0017	0,0896

Dobijen je 191 mogući haplotip koga formiraju grupe alela lokusa HLA-A i HLA-DRB1. Učestalost veću od 1% ima 26 haplotipova HLA-A-DRB1, a od toga 34,6% (9/26) haplotipova ima D' veći od 0,05 (tabela 15). Haplotip koji ima najveću učestalost je A*01-DRB1*03 (6,2%), zatim sledi A*02-DRB1*11 (4,96%) i A*02-DRB1*16 (4,93%).

Tabela 15. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-A-DRB1 sa učestalošću većom od 1% (N=1992)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*01-DRB1*03	0,0626	0,0040	0,3707
A*02-DRB1*11	0,0496	0,0043	-0,0003
A*02-DRB1*16	0,0493	0,0039	0,0658
A*02-DRB1*13	0,0353	0,0035	-0,0060
A*24-DRB1*11	0,0338	0,0034	0,1005
A*02-DRB1*04	0,0313	0,0033	0,0181
A*02-DRB1*01	0,0261	0,0031	-0,0066
A*02-DRB1*15	0,0235	0,0030	-0,0086
A*02-DRB1*07	0,0221	0,0029	0,0040
A*03-DRB1*11	0,0209	0,0029	0,0117
A*02-DRB1*14	0,0197	0,0027	0,0134
A*24-DRB1*13	0,0186	0,0025	0,0330
A*03-DRB1*01	0,0183	0,0024	0,0651
A*03-DRB1*15	0,0181	0,0025	0,0687
A*01-DRB1*13	0,0169	0,0026	-0,0026
A*26-DRB1*13	0,0167	0,0024	0,0704
A*03-DRB1*13	0,0156	0,0025	0,0050
A*02-DRB1*08	0,0149	0,0022	0,0202
A*33-DRB1*01	0,0145	0,0020	0,1181
A*01-DRB1*11	0,0141	0,0023	-0,0140
A*11-DRB1*01	0,0136	0,0020	0,0759
A*03-DRB1*16	0,0127	0,0022	0,0037
A*11-DRB1*11	0,0124	0,0022	0,0127
A*02-DRB1*03	0,0111	0,0022	-0,0333
A*24-DRB1*15	0,0106	0,0020	-0,0003
A*26-DRB1*04	0,0104	0,0018	0,0586

Dobijeno je 298 mogućih haplotipova koje formiraju grupe alela lokusa HLA-B i HLA-DRB1. U tabeli 16 je prikazano 29 haplotipova HLA-B-DRB1 koji imaju učestalost veću od 1%. Od toga 62,1% (18/29) haplotipova ima vrednost D' veću od 0,05. Jedini haplotip iz ove grupe koji imaju učestalost veću od 5% je B*08-DRB1*03 (7,2%).

Tabela 16. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-B-DRB1 sa učestalošću većom od 1% (N=1992)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
B*08-DRB1*03	0,0723	0,0042	0,6336
B*18-DRB1*11	0,0445	0,0035	0,1823
B*51-DRB1*11	0,0284	0,0030	0,0456
B*35-DRB1*11	0,0262	0,0030	0,0271
B*07-DRB1*15	0,0259	0,0026	0,2246
B*35-DRB1*01	0,0226	0,0026	0,0770
B*38-DRB1*13	0,0223	0,0024	0,1191
B*35-DRB1*14	0,0219	0,0025	0,1188
B*13-DRB1*07	0,0215	0,0024	0,2785
B*51-DRB1*04	0,0204	0,0026	0,0753
B*18-DRB1*15	0,0200	0,0025	0,1147
B*44-DRB1*16	0,0199	0,0024	0,1008
B*14-DRB1*01	0,0184	0,0023	0,1524
B*51-DRB1*13	0,0172	0,0024	0,0015
B*51-DRB1*16	0,0168	0,0024	0,0251
B*44-DRB1*07	0,0160	0,0022	0,1112
B*35-DRB1*13	0,0151	0,0023	-0,0030
B*27-DRB1*01	0,0143	0,0021	0,0939
B*44-DRB1*11	0,0124	0,0022	-0,0040
B*27-DRB1*16	0,0120	0,0019	0,0638
B*35-DRB1*16	0,0120	0,0020	-0,0030
B*18-DRB1*16	0,0113	0,0020	0,0059
B*15-DRB1*13	0,0113	0,0018	0,0504
B*39-DRB1*16	0,0112	0,0018	0,0742
B*35-DRB1*04	0,0111	0,0021	-0,0009
B*44-DRB1*13	0,0108	0,0020	-0,0016
B*51-DRB1*08	0,0105	0,0017	0,0522
B*44-DRB1*04	0,0105	0,0019	0,0266
B*38-DRB1*04	0,0103	0,0018	0,0620

Dobijeno je ukupno 155 mogućih haplotipova koje formiraju grupe alela lokusa HLA-B i HLA-C. U tabeli 17 je prikazano 28 haplotipova HLA-B-C koji imaju učestalost veću od 1%. Od toga 89,3% (25/28) haplotipova imaju vrednost D' veću od 0,05. Najučestaliji haplotipovi su B*35-C*04 (11. 0%), B*08-C*07 (9,4%) i B*18-C*07 (7. 5%).

Tabela 17. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-B-C sa učestalošću većom od 1% (N=159)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
B*35-C*04	0,1101	0,0172	0,7864
B*08-C*07	0,0943	0,0166	0,3151
B*18-C*07	0,0754	0,0156	0,2006
B*14-C*08	0,0409	0,0109	1,0000
B*38-C*12	0,0409	0,0113	0,2726
B*51-C*15	0,0408	0,0113	0,2468
B*51-C*14	0,0377	0,0106	0,2319
B*57-C*06	0,0377	0,0111	0,3484
B*18-C*12	0,0376	0,0105	0,1713
B*13-C*06	0,0346	0,0104	0,3202
B*07-C*07	0,0345	0,0102	0,1024
B*51-C*01	0,0344	0,0104	0,1815
B*27-C*02	0,0283	0,0094	0,3798
B*44-C*07	0,0252	0,0090	0,0312
B*27-C*01	0,0189	0,0080	0,2367
B*35-C*12	0,0189	0,0074	0,0122
B*40-C*02	0,0189	0,0078	0,2491
B*44-C*05	0,0189	0,0078	0,2344
B*52-C*12	0,0189	0,0079	0,1230
B*41-C*17	0,0157	0,0071	1,0000
B*44-C*04	0,0157	0,0072	0,0474
B*50-C*06	0,0157	0,0070	0,1428
B*55-C*03	0,0157	0,0070	0,2514
B*15-C*03	0,0155	0,0072	0,2352
B*18-C*05	0,0126	0,0067	0,0652
B*39-C*12	0,0126	0,0062	0,0815
B*40-C*03	0,0126	0,0062	0,1849
B*56-C*01	0,0126	0,0060	0,1714

Dobijeno je 56 mogućih haplotipova grupa alela za lokuse HLA-DRB1 i HLA-DQB1. Učestalost veću od 1% ima 13 haplotipova, od čega 76,9% (10/13) haplotipova ima vrednost D' veću od 0,05 (tabela 18). Najčešći HLA-DRB1-DQB1 haplotip je DRB1*11-DQB1*03 (16,98%), zatim slede DRB1*01-DQB1*05 i DRB1*03-DQB1*02 (12,9% oba), DRB1*16-DQB1*05 (12,3%), DRB1*04-DQB1*03 (8,8%), DRB1*13-DQB1*06 (8,5%), DRB1*14-DQB1*05 (6,3%) i DRB1*15-DQB1*06 (5,97%).

Tabela 18. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-DRB1-DQB1 sa učestalošću većom od 1% (N=159)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
DRB1*11-DQB1*03	0,1698	0,0208	0,4091
DRB1*01-DQB1*05	0,1289	0,0185	0,3003
DRB1*03-DQB1*02	0,1289	0,0195	0,7236
DRB1*16-DQB1*05	0,1226	0,0186	0,2836
DRB1*04-DQB1*03	0,0881	0,0157	0,1875
DRB1*13-DQB1*06	0,0849	0,0158	0,5439
DRB1*14-DQB1*05	0,0629	0,0135	0,1361
DRB1*15-DQB1*06	0,0597	0,0133	0,3694
DRB1*07-DQB1*02	0,0409	0,0110	0,1815
DRB1*07-DQB1*03	0,0314	0,0102	0,0237
DRB1*08-DQB1*03	0,0157	0,0068	0,0162
DRB1*08-DQB1*04	0,0157	0,0069	0,4887
DRB1*12-DQB1*03	0,0126	0,0065	0,0255

Dobijeno je 2463 mogućih haplotipova koje formiraju grupe alela lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1. U tabeli 19 je prikazano 9 haplotipova koji imaju učestalost veću od 1%. Najčešći haplotip je A*01-B*08-DRB1*03 (5,91%). Zatim slede A*02-B*18-DRB1*11 (1,91%), A*33-B*14-DRB1*01 (1,45%) i A*02-B*51-DRB1*11 (1,42%).

Tabela 19. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-A-B-DRB1 sa učestalošću većom od 1% (N=1992).

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.
A*01-B*08-DRB1*03	0,0591	0,0038
A*02-B*18-DRB1*11	0,0191	0,0026
A*33-B*14-DRB1*01	0,0145	0,0019
A*02-B*51-DRB1*11	0,0142	0,0024
A*02-B*44-DRB1*16	0,0135	0,0021
A*26-B*38-DRB1*13	0,0113	0,0018
A*02-B*51-DRB1*16	0,0107	0,0020
A*03-B*07-DRB1*15	0,0106	0,0018
A*24-B*18-DRB1*11	0,0104	0,0019

Na osnovu učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1, dobijeno je 2965 mogućih haplotipova pet lokusa. U tabeli 20 prikazano je 10 haplotipova koji imaju učestalost veću od 1%. Najčešći haplotip pet lokusa je A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (6,6%). Zatim slede A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (2,5%), A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 (2,2%), A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05 (2,2%) i A*02-B*51-C*14-DRB1*16-DQB1*05 (1,9%).

Tabela 20. Haplotipovi grupa alela lokusa HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 sa učestalošću većom od 1% (N=159).

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.
A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02	0,0660	0,0141
A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03	0,0252	0,0106
A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05	0,0220	0,0082
A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05	0,0220	0,0091
A*02-B*51-C*14-DRB1*16-DQB1*05	0,0189	0,0082
A*02-B*44-C*07-DRB1*16-DQB1*05	0,0157	0,0077
A*24-B*18-C*12-DRB1*11-DQB1*03	0,0157	0,0076
A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,0145	0,0073
A*02-B*57-C*06-DRB1*07-DQB1*03	0,0138	0,0079
A*02-B*18-C*12-DRB1*16-DQB1*05	0,0126	0,0067

4.3 Analiza alela HLA

Aleli su određeni testovima visoke rezolucije za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u grupi od 112 ispitanika (Grupa 2).

4.3.1 Hardy-Weinbergova ravnoteža za ispitivanu grupu 2

U tabeli 21 je prikazan HWE za ispitivanu grupu 2 (N=112). Odabrana grupe ispitanika su u ravnoteži za sve testirane lokuse, očekivane i dobijene vrednosti učestalosti gena za svaki lokus se nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$). Za lokus HLA-A, dobijena heterozigotnost je 85,71% a očekivana 88,34% ($p = 0,49$). Za lokus HLA-B, dobijena je 95,54% a očekivana heterozigotnost je 94,64% ($p = 0,091$). Za lokus HLA-C dobijena heterozigotnost je 95,54% a očekivana 90,97% ($p = 0,67$). Za lokus HLA-DRB1 dobijena heterozigotnost je 94,64% a očekivana 93,95% ($p = 0,98$). Za lokus HLA-DQB1 dobijena heterozigotnost je 89,23% a očekivana 90,27% ($p = 0,62$).

Tabela 21. Hardy–Weinbergova ravnoteža za Grupu 2 (N=112)

Lokus	Dobijena heterozigotnost	Očekivana heterozigotnost	p	s.d.
HLA-A	0,8571	0,8834	0,4946	0,0006
HLA-B	0,9554	0,9464	0,0908	0,0002
HLA-C	0,9554	0,9097	0,6746	0,0007
HLA-DRB1	0,9464	0,9395	0,9806	0,0002
HLA-DQB1	0,8929	0,9027	0,6249	0,0008

4.3.2 Učestalost alela HLA

Dokazana su 24 alela lokusa HLA-A (tabela 22), 16 (66,7%) ima učestalost >1%. Najčešći aleli su A*02:01 (27,23%) i A*01:01 (12,05%). Zatim slede A*11:01 (8,93%), A*03:01 (8,48%) i A*24:02 (8,04%). Aleli A*01:01, A*03:01 i HLA-A*11:01 su jedini aleli dokazani u okviru svoje alelske grupe. Ostali dokazani aleli imaju učestalost manju od 5%. Alelska grupa sa najvećim brojem dokazanih alela lokusa HLA-A u ispitanoj populaciji je HLA-A*02 (A*02:01, A*02:02, A*02:05, A*02:17, A*02:25).

Tabela 22. Učestalost alela lokusa HLA-A (N=112)

. Alel	n	Učestalost alela	s.d.	Broj homozigota
A*01:01	27	0,1205	0,0218	4
A*02:01	61	0,2723	0,0301	6
A*02:02	3	0,0134	0,0075	0
A*02:05	4	0,0179	0,0085	0
A*02:17	1	0,0045	0,0045	0
A*02:25	1	0,0045	0,0046	0
A*03:01	19	0,0848	0,0185	1
A*11:01	20	0,0893	0,0191	3
A*23:01	5	0,0223	0,0102	0
A*24:02	18	0,0804	0,0181	1
A*24:03	1	0,0045	0,0044	0
A*25:01	9	0,0402	0,0131	0
A*26:01	7	0,0313	0,0113	0
A*29:01	1	0,0045	0,0045	0
A*29:02	1	0,0045	0,0047	0
A*30:01	5	0,0223	0,0099	0
A*30:02	3	0,0134	0,0076	0
A*30:04	2	0,0089	0,0061	0
A*31:01	5	0,0223	0,0096	0
A*32:01	11	0,0491	0,0149	1
A*33:01	6	0,0268	0,0107	0
A*33:03	2	0,0089	0,0059	0
A*66:01	2	0,0089	0,0062	0
A*68:01	10	0,0446	0,0135	0

U tabeli 23 prikazani su dobijeni aleli za lokus HLA-B. Dokazano je 35 alela, od kojih 23 (65,7%) ima učestalost >1%. Najčešći alel lokusa HLA-B je B*51:01 (12,95%) i to je jedini dokazani alel u alelskoj grupi HLA-B*51. Prema učestalosti, slede aleli B*18:01 (8,93%), B*35:01 (8,48%), B*08:01 (8,04%) i B*35:03 (6,25%), s tim što je alel B*08:01 takođe jedini dokazani alel u svojoj alelskoj grupi.

Tabela 23. Učestalost alela lokusa HLA-B (N=112)

Alel	n	Učestalost alela	s.d.	Broj homozigota
B*07:02	9	0,0402	0,0135	0
B*07:05	1	0,0045	0,0045	0
B*08:01	18	0,0804	0,0181	1
B*13:02	8	0,0357	0,0120	0
B*14:01	2	0,0089	0,0065	0
B*14:02	9	0,0402	0,0127	0
B*15:01	5	0,0223	0,0098	0
B*15:17	2	0,0089	0,0063	0
B*18:01	20	0,0893	0,0192	0
B*18:03	2	0,0089	0,0064	0
B*27:02	2	0,0089	0,0065	0
B*27:05	8	0,0357	0,0124	0
B*27:09	1	0,0045	0,0045	0
B*35:01	19	0,0848	0,0189	0
B*35:03	14	0,0625	0,0158	1
B*37:01	3	0,0134	0,0075	0
B*38:01	10	0,0446	0,0130	0
B*39:01	4	0,0179	0,0090	0
B*39:06	1	0,0045	0,0045	0
B*40:01	3	0,0134	0,0077	0
B*40:02	3	0,0134	0,0075	0
B*41:02	3	0,0134	0,0075	0
B*44:02	11	0,0491	0,0148	0
B*44:03	5	0,0223	0,0100	0
B*44:05	1	0,0045	0,0043	0
B*47:01	1	0,0045	0,0046	0
B*49:01	2	0,0089	0,0062	0
B*50:01	5	0,0223	0,0098	0
B*51:01	29	0,1295	0,0225	2
B*52:01	5	0,0223	0,0101	1
B*55:01	5	0,0223	0,0096	0
B*56:01	4	0,0179	0,0087	0
B*57:01	7	0,0313	0,0114	0
B*57:02	1	0,0045	0,0044	0
B*58:01	1	0,0045	0,0046	0

Za lokus HLA-C, dokazano je 20 alela (tabela 24). Od toga 16 (80%) alela ima učestalost veću od 1%. Najčešći aleli su C*04:01 i C*07:01 (15,18%), s tim što je HLA-C*04:01 jedini dokazani alel iz alelske grupe HLA-C*04. Učestalost veću od 5% imaju i C*12:03 (12,50%) i C*06:02 (10,71%), zatim C*01:02 (8,04%) i C*02:02 (6,25%). Najveći broj dokazanih alela je za alelsku grupu HLA-C*07 (C*07:01, C*07:02, C*07:04, C*07:06).

Tabela 24. Učestalost alela lokusa HLA-C (N=112)

Alel	n	Učestalost alela	s.d.	Broj homozigota
C*01:02	18	0,0804	0,0180	0
C*02:02	14	0,0625	0,0157	0
C*03:02	1	0,0045	0,0043	0
C*03:03	11	0,0491	0,0139	0
C*03:04	3	0,0134	0,0078	0
C*04:01	34	0,1518	0,0240	0
C*05:01	9	0,0402	0,0130	0
C*06:02	24	0,1071	0,0203	1
C*07:01	34	0,1518	0,0237	2
C*07:02	7	0,0313	0,0118	0
C*07:04	5	0,0223	0,0098	0
C*07:06	1	0,0045	0,0045	0
C*08:02	11	0,0491	0,0143	0
C*12:02	5	0,0223	0,0094	1
C*12:03	28	0,1250	0,0219	1
C*14:02	6	0,0268	0,0107	0
C*15:02	8	0,0357	0,0129	0
C*15:04	1	0,0045	0,0045	0
C*17:03	3	0,0134	0,0077	0
C*18:02	1	0,0045	0,0045	0

U tabeli 25 prikazani su dobijeni aleli lokusa HLA-DRB1. Dobijeno je 26 alela, 18 (69,2%) sa učestalošću većom od 1%. Najučestaliji aleli su DRB1*03:01 (11,16%) i DRB1*16:01 (10,71%) i oni su jedini dokazani aleli u odgovarajućim alelskim grupama. Slede DRB1*01:01 (8,93%), DRB1*13:02 i DRB1*07:01 (7,14% oba), DRB1*11:01 (6,70%), DRB1*15:01 (5,80%), DRB1*11:04 i DRB1*14:54 (5,36% oba). Za 8 od 14 alelskih grupa lokusa HLA-DRB1 je dokazano više od jednog alela. Najveći broj alela je dokazan za alelsku grupu DRB1*04 (DRB1*04:01, DRB1*04:02, DRB1*04:03, DRB1*04:04, DRB1*04:05 i DRB1*04:06), a za alelske grupe HLA-DRB1*11 i HLA-DRB1*13 dokazana su po 3 alela (DRB1*11:01, DRB1*11:03 i DRB1*11:04; DRB1*13:01, DRB1*13:02 i DRB1*13:03)

Tabela 25. Učestalost alela lokusa HLA-DRB1 (N=112)

Alel	n	Učestalost alela	s.d.	Broj homozigota
DRB1*01:01	20	0,0893	0,0192	0
DRB1*01:02	9	0,0402	0,0133	0
DRB1*03:01	25	0,1116	0,0210	2
DRB1*04:01	9	0,0402	0,0135	0
DRB1*04:02	6	0,0268	0,0112	0
DRB1*04:03	4	0,0179	0,0091	0
DRB1*04:04	2	0,0089	0,0064	0
DRB1*04:05	1	0,0045	0,0044	0
DRB1*04:06	1	0,0045	0,0044	0
DRB1*07:01	16	0,0714	0,0170	0
DRB1*08:01	6	0,0268	0,0112	0
DRB1*08:03	1	0,0045	0,0045	0
DRB1*09:01	2	0,0089	0,0064	0
DRB1*10:01	1	0,0045	0,0044	0
DRB1*11:01	15	0,0670	0,0164	0
DRB1*11:03	2	0,0089	0,0062	0
DRB1*11:04	12	0,0536	0,0154	1
DRB1*12:01	4	0,0179	0,0086	0
DRB1*13:01	10	0,0446	0,0137	0
DRB1*13:02	16	0,0714	0,0175	1
DRB1*13:03	2	0,0089	0,0061	0
DRB1*14:01	7	0,0313	0,0117	0
DRB1*14:54	12	0,0536	0,0145	0
DRB1*15:01	13	0,0580	0,0158	0
DRB1*15:02	4	0,0179	0,0087	1
DRB1*16:01	24	0,1071	0,0202	1

Među 16 alela koji su dokazani za lokus HLA-DQB1 (tabela 26), 13 (81,5%) ima učestalost veću od 1%. Najučestaliji aleli su DQB1*03:01 (16,52%), DQB1*05:01 (13,39%), DQB1*05:02 (12,05%) i DQB1*02:01 (11,16%). Zatim slede DQB1*03:02 (9,82%), DQB1*05:03 (8,48%) i DQB1*06:04 (6,70%). Sve alelske grupe, osim DQB*04, imaju više od jednog alela.

Tabela 26. Učestalost alela lokusa HLA-DQB1 (N=112)

Alel	n	Učestalost alela	s.d.	Broj homozigota
DQB1*02:01	25	0,1116	0,0210	2
DQB1*02:02	10	0,0446	0,0138	0
DQB1*03:01	37	0,1652	0,0247	3
DQB1*03:02	22	0,0982	0,0204	3
DQB1*03:03	8	0,0357	0,0122	0
DQB1*03:04	1	0,0045	0,0046	0
DQB1*04:02	5	0,0223	0,0101	0
DQB1*05:01	30	0,1339	0,0233	1
DQB1*05:02	27	0,1205	0,0222	1
DQB1*05:03	19	0,0848	0,0186	0
DQB1*05:04	1	0,0045	0,0048	0
DQB1*06:01	4	0,0179	0,0089	1
DQB1*06:02	8	0,0357	0,0123	0
DQB1*06:03	11	0,0491	0,0142	0
DQB1*06:04	15	0,0670	0,0163	1
DQB1*06:09	1	0,0045	0,0044	0

4.3.3 Učestalost haplotipova alela HLA

Maksimizacijom ocene verodostojnosti (MLE) mogućih kombinacija alela lokusa HLA-A i lokusa HLA-B, dobijen je 201 haplotip HLA-A-B. Učestalost veću od 1% ima 24 haplotipa, koji su prikazani u tabeli 27. Od toga, D' veći od 0,05 ima 75% (18/24) haplotipova. Najčešći haplotipovi su HLA-A*02:01-B*51:01 (8,7%) i HLA-A*01:01-B*08:01 (5,3%).

Tabela 27. Haplotipovi HLA-A-B sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*02:01-B*51:01	0,0866	0,0201	0,2164
A*01:01-B*08:01	0,0531	0,0152	0,3918
A*02:01-B*44:02	0,0349	0,0127	0,0832
A*11:01-B*35:01	0,0310	0,0122	0,2869
A*33:01-B*14:02	0,0268	0,0102	0,6575
A*02:01-B*27:05	0,0223	0,0109	0,0480
A*26:01-B*38:01	0,0223	0,0100	0,4839
A*30:01-B*13:02	0,0223	0,0100	0,6164
A*02:01-B*35:03	0,0201	0,0110	0,0120
A*24:02-B*51:01	0,0198	0,0109	0,0789
A*01:01-B*57:01	0,0179	0,0097	0,1207
A*25:01-B*18:01	0,0179	0,0098	0,1665
A*68:01-B*35:03	0,0179	0,0095	0,2523
A*02:01-B*18:01	0,0148	0,0109	-0,0144
A*01:01-B*35:01	0,0134	0,0085	0,0287
A*02:01-B*07:02	0,0134	0,0090	0,0094
A*02:01-B*40:01	0,0134	0,0082	0,0363
A*02:05-B*50:01	0,0134	0,0079	0,5927
A*03:01-B*35:01	0,0134	0,0087	0,0798
A*03:01-B*38:01	0,0134	0,0084	0,1185
A*23:01-B*44:03	0,0134	0,0079	0,5909
A*24:02-B*07:02	0,0134	0,0085	0,1318
A*30:02-B*18:01	0,0134	0,0081	0,1385
A*32:01-B*35:01	0,0134	0,0085	0,1144

Dobijeno je 186 mogućih haplotipova lokusa HLA-B i HLA-C. U tabeli 28 je prikazano 29 haplotipova HLA-B-C koji imaju učestalost veću od 1%. Svih 29 haplotipova ima D' veći od 0,05. Najčešći haplotipovi su HLA-B*08:01-C*07:01 i HLA-B*35:01-C*04:01 (8,04% oba), zatim HLA-B*18:01-C*07:01 (5,4%).

Tabela 28. Haplotipovi HLA-B-C sa učestalošću >1% (N=159)

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
B*08:01-C*07:01	0,0804	0,0182	0,4883
B*35:01-C*04:01	0,0804	0,0175	0,4858
B*18:01-C*07:01	0,0536	0,0152	0,2895
B*38:01-C*12:03	0,0446	0,0143	0,3271
B*35:03-C*04:01	0,0446	0,0135	0,2471
B*14:02-C*08:02	0,0402	0,0127	0,8106
B*51:01-C*01:02	0,0402	0,0132	0,2501
B*13:02-C*06:02	0,0357	0,0126	0,3086
B*07:02-C*07:02	0,0313	0,0119	0,7706
B*57:01-C*06:02	0,0313	0,0115	0,2688
B*44:02-C*05:01	0,0268	0,0109	0,5264
B*51:01-C*14:02	0,0268	0,0107	0,1851
B*51:01-C*15:02	0,0268	0,0109	0,1775
B*55:01-C*03:03	0,0223	0,0100	0,4421
B*50:01-C*06:02	0,0223	0,0097	0,1903
B*18:01-C*12:03	0,0223	0,0104	0,0980
B*52:01-C*12:02	0,0223	0,0101	1,0000
B*15:01-C*03:03	0,0179	0,0091	0,3491
B*44:02-C*07:04	0,0179	0,0091	0,3491
B*27:05-C*02:02	0,0179	0,0089	0,2593
B*56:01-C*01:02	0,0179	0,0087	0,2081
B*27:05-C*01:02	0,0179	0,0090	0,1934
B*39:01-C*12:03	0,0179	0,0088	0,1273
B*44:03-C*04:01	0,0179	0,0092	0,0975
B*35:03-C*12:03	0,0179	0,0091	0,0857
B*40:02-C*02:02	0,0134	0,0077	0,2036
B*18:01-C*05:01	0,0134	0,0077	0,1144
B*37:01-C*06:02	0,0134	0,0079	0,1131
B*41:02-C*17:03	0,0134	0,0074	1,0000

Dobijeno je 156 mogućih haplotipova koje čine lokusi HLA-A i HLA-C. U tabeli 29 je prikazano 29 haplotipova koji imaju učestalost veću od 1%. D' veći od 0,05 ima 62,1% (18/29). Najčešći haplotipovi su HLA-A*02:01-C*04:01 (6,96%) i HLA-A*01:01-C*07:01 (5,96%).

Tabela 29. Haplotipovi HLA-A-C sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*02:01-C*04:01	0,0696	0,0181	0,1222
A*01:01-C*07:01	0,0596	0,0172	0,3091
A*02:01-C*02:02	0,0438	0,0142	0,1049
A*02:01-C*01:02	0,0331	0,0133	0,0448
A*11:01-C*04:01	0,0279	0,0125	0,1040
A*26:01-C*12:03	0,0268	0,0111	0,1889
A*33:01-C*08:02	0,0268	0,0113	0,5330
A*03:01-C*04:01	0,0261	0,0119	0,0952
A*03:01-C*12:03	0,0251	0,0120	0,1264
A*30:01-C*06:02	0,0223	0,0105	0,1903
A*68:01-C*04:01	0,0223	0,0110	0,1072
A*01:01-C*01:02	0,0222	0,0110	0,1128
A*02:01-C*07:01	0,0214	0,0123	-0,0324
A*02:01-C*14:02	0,0192	0,0100	0,0451
A*02:05-C*06:02	0,0179	0,0092	0,1515
A*11:01-C*15:02	0,0171	0,0094	0,1619
A*25:01-C*07:01	0,0163	0,0094	0,0702
A*24:02-C*07:01	0,0159	0,0103	0,0268
A*02:01-C*03:03	0,0159	0,0098	0,0099
A*24:02-C*03:03	0,0153	0,0092	0,1488
A*25:01-C*12:03	0,0149	0,0087	0,0825
A*01:01-C*06:02	0,0147	0,0094	0,0167
A*24:02-C*12:03	0,0146	0,0093	0,0398
A*32:01-C*12:03	0,0142	0,0091	0,0682
A*02:01-C*07:04	0,0134	0,0083	0,0275
A*02:01-C*06:02	0,0134	0,0104	-0,0243
A*30:02-C*05:01	0,0134	0,0078	0,3243
A*11:01-C*07:01	0,0129	0,0090	-0,0008
A*02:01-C*12:03	0,0115	0,0098	-0,0354

Dobijeno je 197 haplotipova lokusa HLA-A i HLA-DRB1, a sa učestalošću većom od 1% ima 27 haplotipova (tabela 30). D' veći od 0,05 ima 81,5% (22/27). Najučestaliji haplotip je HLA-A*02:01-DRB1*16:01 (6,3%).

Tabela 30. Haplotipovi HLA-A-DRB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*02:01-DRB1*16:01	0,0629	0,0183	0,1386
A*01:01-DRB1*03:01	0,0480	0,0156	0,3223
A*02:01-DRB1*01:01	0,0386	0,0148	0,0574
A*02:01-DRB1*07:01	0,0298	0,0133	0,0410
A*02:01-DRB1*13:01	0,0268	0,0122	0,0562
A*33:01-DRB1*01:02	0,0223	0,0099	0,5433
A*24:02-DRB1*14:54	0,0223	0,0103	0,2369
A*02:01-DRB1*15:01	0,0216	0,0113	0,0228
A*03:01-DRB1*01:01	0,0186	0,0107	0,1349
A*01:01-DRB1*13:02	0,0183	0,0099	0,0870
A*02:01-DRB1*08:01	0,0179	0,0101	0,0399
A*02:01-DRB1*14:54	0,0179	0,0101	0,0127
A*03:01-DRB1*13:02	0,0174	0,0097	0,1436
A*24:02-DRB1*11:04	0,0163	0,0094	0,1582
A*11:01-DRB1*01:01	0,0143	0,0095	0,0775
A*25:01-DRB1*01:01	0,0134	0,0084	0,1144
A*30:02-DRB1*03:01	0,0134	0,0077	0,1081
A*01:01-DRB1*07:01	0,0134	0,0083	0,0427
A*30:01-DRB1*07:01	0,0134	0,0082	0,1690
A*32:01-DRB1*12:01	0,0134	0,0080	0,2595
A*24:02-DRB1*14:01	0,0134	0,0082	0,1398
A*11:01-DRB1*14:54	0,0134	0,0084	0,1019
A*11:01-DRB1*15:01	0,0134	0,0090	0,0976
A*68:01-DRB1*16:01	0,0134	0,0084	0,0841
A*26:01-DRB1*13:02	0,0127	0,0082	0,1515
A*03:01-DRB1*04:01	0,0127	0,0086	0,1136
A*11:01-DRB1*11:04	0,0105	0,0081	0,0671

Dobijeno je 243 mogućih haplotipova lokusa HLA-B i lokusa HLA-DRB1. Od toga 21 haplotip ima učestalost veću od 0,01% (tabela 31). D' veći od 0,05 ima 90,5% (19/21). Najučestaliji haplotip je HLA-B*08:01-DRB1*03:01 (6,5%).

Tabela 31. Haplotipovi HLA-B-DRB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
B*08:01-DRB1*03:01	0,0646	0,0169	0,5423
B*51:01-DRB1*16:01	0,0353	0,0142	0,1853
B*14:02-DRB1*01:02	0,0313	0,0115	0,7685
B*18:01-DRB1*11:04	0,0268	0,0110	0,2604
B*51:01-DRB1*15:01	0,0268	0,0111	0,1580
B*44:02-DRB1*16:01	0,0253	0,0108	0,1964
B*13:02-DRB1*07:01	0,0223	0,0102	0,2870
B*57:01-DRB1*07:01	0,0223	0,0101	0,2903
B*27:05-DRB1*01:01	0,0218	0,0099	0,2165
B*18:01-DRB1*03:01	0,0198	0,0098	0,0971
B*35:03-DRB1*04:01	0,0179	0,0094	0,2558
B*35:01-DRB1*13:01	0,0179	0,0096	0,1736
B*39:01-DRB1*16:01	0,0179	0,0091	0,1515
B*07:02-DRB1*11:01	0,0174	0,0090	0,2284
B*51:01-DRB1*01:01	0,0134	0,0095	0,0156
B*35:01-DRB1*03:01	0,0134	0,0085	0,0384
B*44:03-DRB1*07:01	0,0134	0,0079	0,1690
B*38:01-DRB1*13:01	0,0134	0,0083	0,2673
B*35:03-DRB1*13:02	0,0134	0,0086	0,1333
B*18:01-DRB1*14:01	0,0134	0,0080	0,1226
B*52:01-DRB1*15:02	0,0134	0,0076	0,5927

Dobijeno je 190 mogućih haplotipova lokusa HLA-C i lokusa HLA-DRB1, a 25 ima učestalost veću od 1% (tabela 32). D' veći od 0,05 ima 84% (21/25) haplotipova. Najučestaliji haplotipovi su HLA-C*07:01-DRB1*03:01 (7,1%) i HLA-C*06:02-DRB1*07:01 (5,4%).

Tabela 32. Haplotipovi HLA-C-DRB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
C*07:01-DRB1*03:01	0,0706	0,0177	0,3983
C*06:02-DRB1*07:01	0,0536	0,0152	0,4615
C*04:01-DRB1*13:02	0,0313	0,0127	0,1448
C*08:02-DRB1*01:02	0,0313	0,0120	0,6211
C*07:01-DRB1*11:04	0,0311	0,0120	0,1602
C*12:03-DRB1*16:01	0,0288	0,0122	0,1382
C*02:02-DRB1*16:01	0,0268	0,0115	0,2000
C*04:01-DRB1*04:01	0,0268	0,0115	0,1420
C*12:03-DRB1*15:01	0,0267	0,0116	0,1649
C*12:03-DRB1*13:01	0,0223	0,0106	0,1402
C*04:01-DRB1*16:01	0,0197	0,0109	0,0252
C*07:01-DRB1*14:01	0,0179	0,0098	0,0892
C*01:02-DRB1*11:01	0,0179	0,0098	0,1664
C*15:02-DRB1*11:01	0,0179	0,0093	0,2395
C*04:01-DRB1*07:01	0,0179	0,0094	0,0498
C*04:01-DRB1*03:01	0,0179	0,0095	0,0068
C*01:02-DRB1*01:01	0,0179	0,0099	0,1301
C*02:02-DRB1*01:01	0,0179	0,0100	0,1467
C*04:01-DRB1*01:01	0,0179	0,0105	0,0311
C*05:01-DRB1*03:01	0,0138	0,0080	0,0874
C*07:04-DRB1*16:01	0,0134	0,0084	0,1050
C*12:02-DRB1*15:02	0,0134	0,0079	0,5927
C*12:03-DRB1*14:54	0,0134	0,0091	0,0566
C*03:03-DRB1*01:01	0,0134	0,0085	0,1061
C*12:03-DRB1*04:02	0,0114	0,0077	0,0658

Dobijeno je 156 mogućih haplotipova koje čine lokusi HLA-A i HLA-DQB1, od čega 31 haplotip ima učestalost veću od 1% (tabela 33). D' veći od 0,05 ima 64,5% (20/31) haplotipova. Najučestaliji su HLA-A*02:01-DQB1*05:02 (6,1%) i HLA-A*02:01-DQB1*05:01 (5,4%).

Tabela 33. Haplotipovi HLA-A-DQB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
A*02:01-DQB1*05:02	0,0611	0,0175	0,1181
A*02:01-DQB1*05:01	0,0536	0,0182	0,0726
A*01:01-DQB1*02:01	0,0491	0,0155	0,3330
A*24:02-DQB1*05:03	0,0313	0,0124	0,3132
A*02:01-DQB1*06:03	0,0291	0,0126	0,0608
A*24:02-DQB1*03:01	0,0289	0,0126	0,1026
A*02:01-DQB1*03:01	0,0286	0,0145	-0,0269
A*02:01-DQB1*05:03	0,0276	0,0124	0,0181
A*32:01-DQB1*03:01	0,0259	0,0115	0,1133
A*11:01-DQB1*03:01	0,0242	0,0123	0,0630
A*03:01-DQB1*05:01	0,0241	0,0120	0,1040
A*01:01-DQB1*03:01	0,0218	0,0116	0,0133
A*11:01-DQB1*05:03	0,0215	0,0107	0,1703
A*02:01-DQB1*03:03	0,0183	0,0102	0,0326
A*02:01-DQB1*03:02	0,0171	0,0122	-0,0147
A*01:01-DQB1*03:03	0,0160	0,0092	0,1005
A*33:01-DQB1*05:01	0,0160	0,0090	0,0950
A*32:01-DQB1*05:02	0,0136	0,0089	0,0673
A*30:02-DQB1*02:01	0,0134	0,0078	0,1081
A*30:01-DQB1*02:02	0,0134	0,0080	0,2840
A*03:01-DQB1*05:02	0,0134	0,0090	0,0287
A*68:01-DQB1*05:02	0,0134	0,0086	0,0696
A*11:01-DQB1*06:02	0,0134	0,0082	0,1185
A*01:01-DQB1*06:04	0,0134	0,0087	0,0473
A*26:01-DQB1*06:04	0,0134	0,0082	0,1742
A*03:01-DQB1*06:04	0,0134	0,0088	0,0975
A*68:01-DQB1*06:04	0,0134	0,0083	0,1626
A*03:01-DQB1*03:02	0,0116	0,0088	0,0365
A*01:01-DQB1*03:02	0,0108	0,0084	-0,0013
A*25:01-DQB1*05:02	0,0101	0,0080	0,0453
A*02:01-DQB1*04:02	0,0101	0,0076	0,0150

Dobijeno je 198 mogućih haplotipova lokusa HLA-B i HLA-DQB1. Učestalost veću od 1% ima 31 haplotip (tabela 34). D' veći od 0,05 ima 83,9% (26/31) haplotipova. Najučestaliji je HLA-B*08:01-DQB1*02:01 (6,6%).

Tabela 34. Haplotipovi HLA-B-DQB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
B*08:01-DQB1*02:01	0,0665	0,0163	0,5610
B*51:01-DQB1*05:02	0,0402	0,0150	0,2158
B*14:02-DQB1*05:01	0,0313	0,0123	0,2012
B*18:01-DQB1*03:01	0,0287	0,0127	0,0929
B*51:01-DQB1*03:01	0,0248	0,0126	0,0241
B*35:01-DQB1*03:02	0,0223	0,0110	0,1557
B*57:01-DQB1*03:03	0,0223	0,0099	0,6129
B*18:01-DQB1*05:03	0,0223	0,0109	0,1805
B*13:02-DQB1*02:02	0,0218	0,0098	0,4690
B*27:05-DQB1*05:01	0,0216	0,0104	0,1299
B*07:02-DQB1*03:01	0,0212	0,0104	0,0920
B*18:01-DQB1*02:01	0,0183	0,0099	0,0818
B*51:01-DQB1*05:01	0,0179	0,0104	0,0044
B*38:01-DQB1*05:02	0,0179	0,0096	0,1083
B*39:01-DQB1*05:02	0,0179	0,0090	0,1327
B*35:01-DQB1*05:03	0,0179	0,0099	0,1374
B*35:03-DQB1*05:03	0,0179	0,0098	0,1579
B*44:02-DQB1*05:02	0,0170	0,0097	0,0964
B*51:01-DQB1*06:02	0,0153	0,0089	0,0858
B*35:01-DQB1*02:01	0,0134	0,0085	0,0384
B*44:03-DQB1*02:02	0,0134	0,0077	0,2840
B*41:02-DQB1*03:01	0,0134	0,0084	0,0686
B*44:02-DQB1*03:01	0,0134	0,0089	0,0336
B*51:01-DQB1*03:03	0,0134	0,0083	0,0702
B*15:01-DQB1*05:01	0,0134	0,0082	0,0795
B*52:01-DQB1*06:01	0,0134	0,0075	0,5927
B*35:01-DQB1*06:03	0,0134	0,0082	0,1144
B*38:01-DQB1*06:03	0,0134	0,0083	0,2387
B*35:03-DQB1*06:04	0,0130	0,0084	0,1412
B*18:01-DQB1*03:02	0,0130	0,0091	0,0470
B*35:03-DQB1*03:02	0,0125	0,0086	0,0692

Dobijen je 151 mogući haplotip koga čine lokusi HLA-C i HLA-DQB1. Od toga 36 haplotipova ima učestalost veću od 1% (tabela 35). D' veći od 0,05 ima 77,8% (28/36) haplotipova. Najčešći haplotip je HLA-C*07:01-DQB1*02:01 (7%).

Tabela 35. Haplotipovi HLA-C-DQB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
C*07:01-DQB1*02:01	0,0701	0,0175	0,3944
C*12:03-DQB1*05:02	0,0440	0,0153	0,2632
C*04:01-DQB1*03:02	0,0352	0,0139	0,1480
C*07:01-DQB1*03:01	0,0326	0,0125	0,0534
C*06:02-DQB1*02:02	0,0313	0,0122	0,2586
C*04:01-DQB1*06:04	0,0313	0,0127	0,1489
C*08:02-DQB1*05:01	0,0269	0,0117	0,1596
C*02:02-DQB1*05:02	0,0268	0,0112	0,1704
C*07:01-DQB1*05:03	0,0268	0,0116	0,1001
C*01:02-DQB1*05:01	0,0249	0,0118	0,1148
C*12:03-DQB1*03:02	0,0229	0,0109	0,0940
C*01:02-DQB1*03:01	0,0223	0,0114	0,0596
C*12. 03-DQB1*05:03	0,0223	0,0108	0,1024
C*06:02-DQB1*03:03	0,0205	0,0102	0,1616
C*06:02-DQB1*03. 01	0,0184	0,0105	0,0050
C*04:01-DQB1*02:01	0,0179	0,0096	0,0068
C*07:02-DQB1*03:01	0,0179	0,0093	0,0793
C*02:02-DQB1*05:01	0,0179	0,0097	0,0756
C*04:01-DQB1*05:01	0,0179	0,0105	-0,0034
C*03:03-DQB1*03:01	0,0172	0,0097	0,0578
C*05:01-DQB1*03:01	0,0166	0,0092	0,0626
C*05:01-DQB1*02:01	0,0147	0,0090	0,0953
C*03:03-DQB1*05:01	0,0141	0,0093	0,0587
C*17:03-DQB1*03:01	0,0134	0,0076	0,0686
C*02:02-DQB1*03:01	0,0134	0,0090	0,0198
C*06:02-DQB1*03:02	0,0134	0,0089	0,0297
C*07:01-DQB1*03:02	0,0134	0,0090	-0,0020
C*14:02-DQB1*05:02	0,0134	0,0080	0,0866
C*07:04-DQB1*05:02	0,0134	0,0078	0,0908
C*03:03-DQB1*05:03	0,0134	0,0084	0,1144
C*04:01-DQB1*05:03	0,0134	0,0093	0,0037
C*12:02-DQB1*06:01	0,0134	0,0076	0,5927
C*01:02-DQB1*06:02	0,0134	0,0081	0,1358
C*12:03-DQB1*06:03	0,0134	0,0087	0,0610
C*04:01-DQB1*06:03	0,0134	0,0092	0,0411
C*07:02-DQB1*05:01	0,0133	0,0081	0,0701

Od 154 dobijena haplotipa koja čine lokusi HLA-DRB1 i HLA-DQB1, učestalost veću od 1% ima 21 haplotip i svi imaju D' veći od 0,05 (tabela 36). Najčešći su HLA-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (11,2%), HLA-DRB1*16:01-DQB1*05:02 (10,2%) i HLA-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (8,5%), zatim HLA-DRB1*13:02-DQB1*06:04 i HLA-DRB1*11:01-DQB1*03:01 (6,70% svaki) i HLA-DRB1*11:04-DQB1*03:01 (5,4%).

Tabela 36. Haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.	D'
DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,1116	0,0206	1,0000
DRB1*16:01-DQB1*05:02	0,1027	0,0203	0,8341
DRB1*01:01-DQB1*05:01	0,0848	0,0187	0,5974
DRB1*13:02-DQB1*06:04	0,0670	0,0160	0,9330
DRB1*11:01-DQB1*03:01	0,0670	0,0162	0,3627
DRB1*11:04-DQB1*03:01	0,0536	0,0156	0,2861
DRB1*14:54-DQB1*05:03	0,0491	0,0150	0,5551
DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,0446	0,0136	0,6075
DRB1*13:01-DQB1*06:03	0,0446	0,0135	0,9048
DRB1*01:02-DQB1*05:01	0,0402	0,0134	0,2707
DRB1*15:01-DQB1*06:02	0,0357	0,0120	0,6011
DRB1*04:01-DQB1*03:02	0,0357	0,0126	0,3370
DRB1*14:01-DQB1*05:03	0,0313	0,0116	0,3480
DRB1*07:01-DQB1*03:03	0,0268	0,0109	0,3519
DRB1*04:02-DQB1*03:02	0,0268	0,0107	0,2527
DRB1*15:01-DQB1*05:02	0,0179	0,0092	0,0957
DRB1*12:01-DQB1*03:01	0,0179	0,0089	0,0919
DRB1*15:02-DQB1*06:01	0,0179	0,0091	1,0000
DRB1*08:01-DQB1*04:02	0,0134	0,0078	0,4886
DRB1*04:03-DQB1*03:02	0,0134	0,0078	0,1207
DRB1*08:01-DQB1*03:02	0,0134	0,0075	0,1126

Dobijeno je 573 pretpostavljenih haplotipova koje čine aleli lokusi klase I HLA. Učestalost veću od 1% ima 25 haplotipova HLA-A-B-C (tabela 37). Najčešći haplotip je A*01:01-B*08:01-C*07:01 (5,4%).

Tabela 37. Haplotipovi HLA-A-B-C sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.
A*01:01-B*08:01-C*07:01	0,0536	0,01525
A*11:01-B*35:01-C*04:01	0,0268	0,01219
A*02:01-B*51:01-C*01:02	0,0268	0,01141
A*33:01-B*14:02-C*08:02	0,0268	0,01059
A*02:01-B*18:01-C*07:01	0,0255	0,01203
A*26:01-B*38:01-C*12:03	0,0223	0,01010
A*30:01-B*13:02-C*06:02	0,0223	0,00998
A*02:01-B*27:05-C*02:02	0,0179	0,00917
A*02:01-B*44:02-C*07:04	0,0179	0,00926
A*02:01-B*51:01-C*14:02	0,0179	0,00949
A*25:01-B*18:01-C*12:03	0,0179	0,00905
A*68:01-B*35:03-C*04:01	0,0179	0,00953
A*01:01-B*35:01-C*04:01	0,0134	0,00874
A*01:01-B*57:01-C*06:02	0,0134	0,00845
A*11:01-B*51:01-C*15:02	0,0134	0,00806
A*02:01-B*35:01-C*04:01	0,0134	0,00974
A*02:01-B*35:03-C*12:03	0,0134	0,00839
A*02:01-B*44:02-C*05:01	0,0134	0,00805
A*02:01-B*51:01-C*04:01	0,0134	0,00830
A*02:01-B*57:01-C*06:02	0,0134	0,00868
A*02:05-B*50:01-C*06:02	0,0134	0,00781
A*30:02-B*18:01-C*05:01	0,0134	0,00778
A*03:01-B*35:01-C*04:01	0,0134	0,00872
A*03:01-B*38:01-C*12:03	0,0134	0,00842
A*32:01-B*35:01-C*04:01	0,0134	0,00876

Dobijeno je 664 mogućih haplotipova alela lokusa HLA-A,HLA-B i HLA-DRB1. U tabeli 38 je prikazano 9 haplotipova HLA-A-B-DRB1 koji imaju učestalost veću od 1%. Najčešći haplotip je A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 (4,5%).

Tabela 38. Haplotipovi HLA-A-B-DRB1 sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s.d.
A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01	0,0446	0,01435
A*02:01-B*44:02-DRB1*16:01	0,0223	0,01083
A*02:01-B*51:01-DRB1*16:01	0,0223	0,01160
A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02	0,0223	0,01004
A*02:01-B*51:01-DRB1*13:01	0,0179	0,00996
A*01:01-B*57:01-DRB1*07:01	0,0134	0,00855
A*02:01-B*51:01-DRB1*01:01	0,0134	0,00924
A*30:01-B*13:02-DRB1*07:01	0,0134	0,00832
A*30:02-B*18:01-DRB1*03:01	0,0134	0,00830

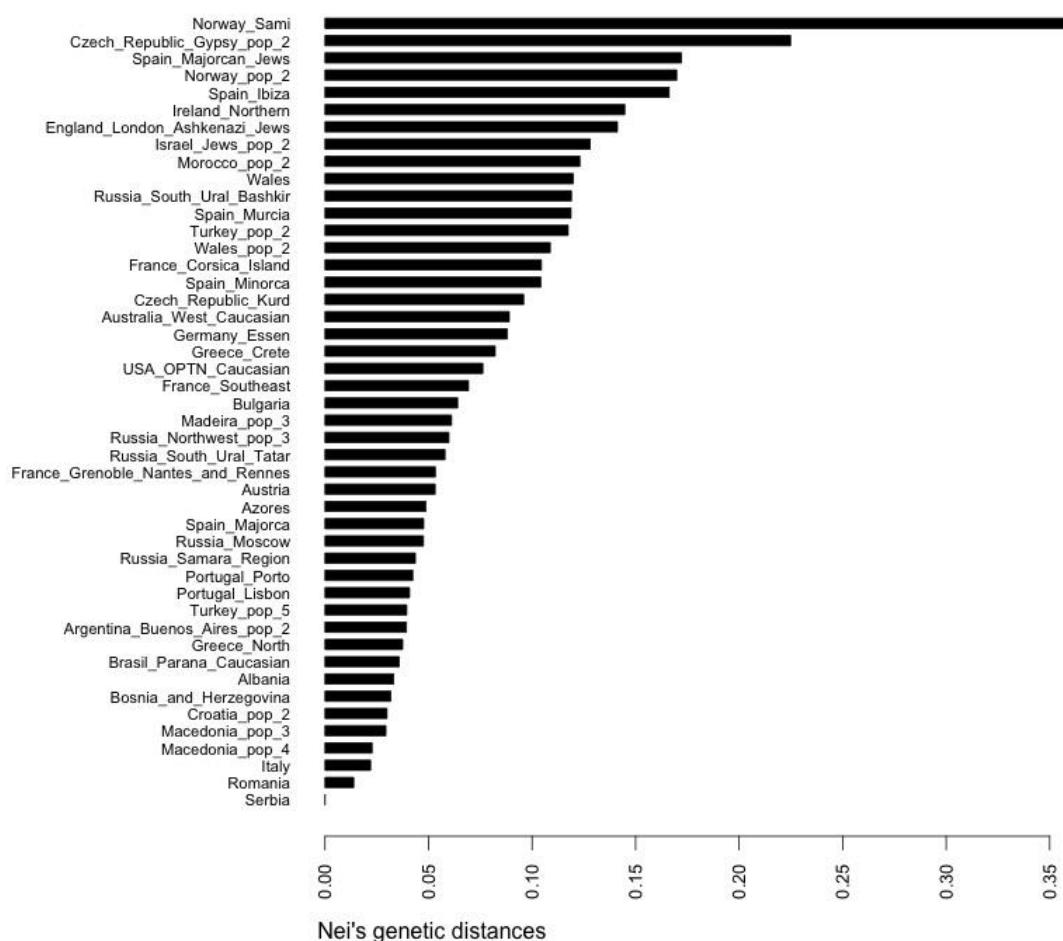
U tabeli 39 su prikazani haplotipovi svih pet lokusa sa dobijenom učestalošću većom od 1%, od 2897 dobijenih. Najučestaliji haplotip je A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (4,4%), sledi A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 sa 2,2%.

Tabela 39. Haplotipovi pet lokusa sa učestalošću >1%

Haplotip	Učestalost haplotipa	s. d.
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,0441	0,0151
A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01	0,0223	0,0103
A*01:01-B*57:01-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*03:03	0,0134	0,0087
A*11:01-B*51:01-C*04:01-DRB1*13:01-DQB1*06:03	0,0134	0,0083
A*02:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*16:01-DQB1*05:02	0,0134	0,0085
A*30:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,0134	0,0085
A*30:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,0134	0,0082

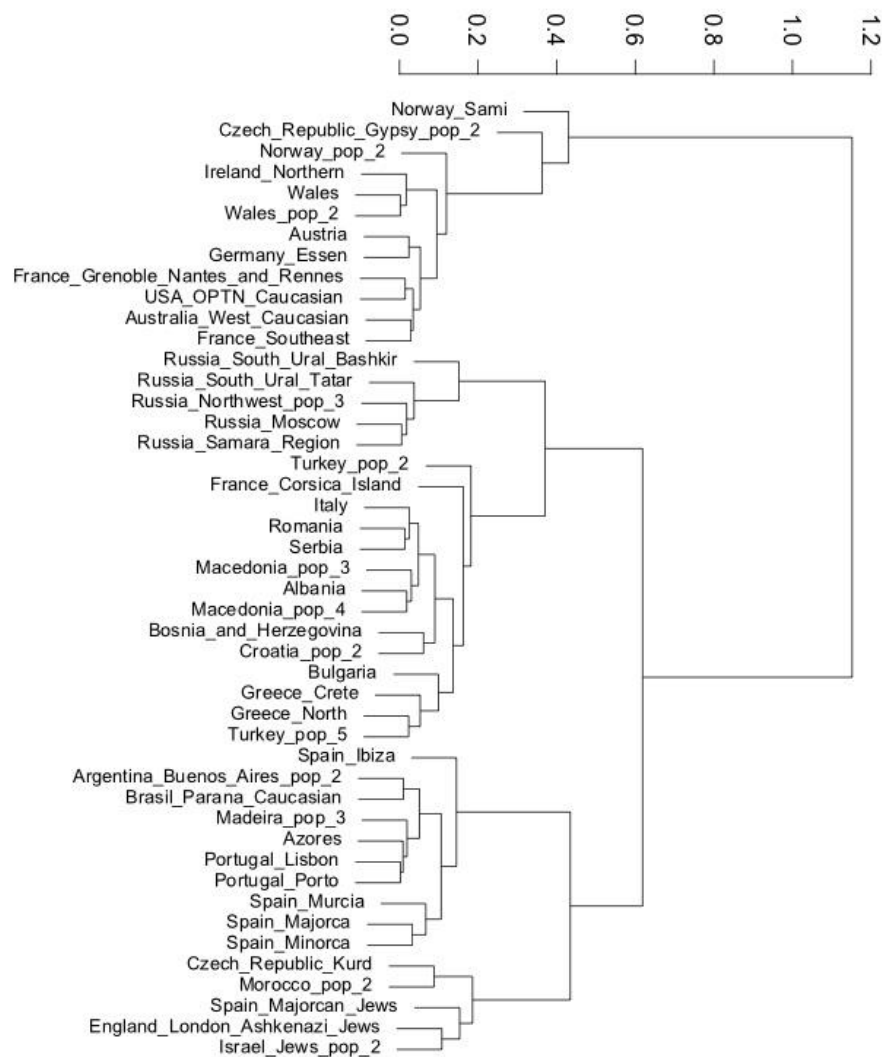
4.4 Genetska sličnost sa drugim populacijama

Poređenje naših ispitanika sa drugim populacijama je rađeno na osnovu učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A i HLA-B. Na grafikonu 1 je prikazana genetska udaljenost drugih populacija u odnosu na populaciju ispitanika Grupe 1 (N=1992). Najmanja udaljenost od populacije ispitanika je dobijena za populaciju Rumunije (DA=0,0138), a najveća za populaciju Laponaca (DA=0,3627).



Grafikon 1. Nei-ova distanca populacija.

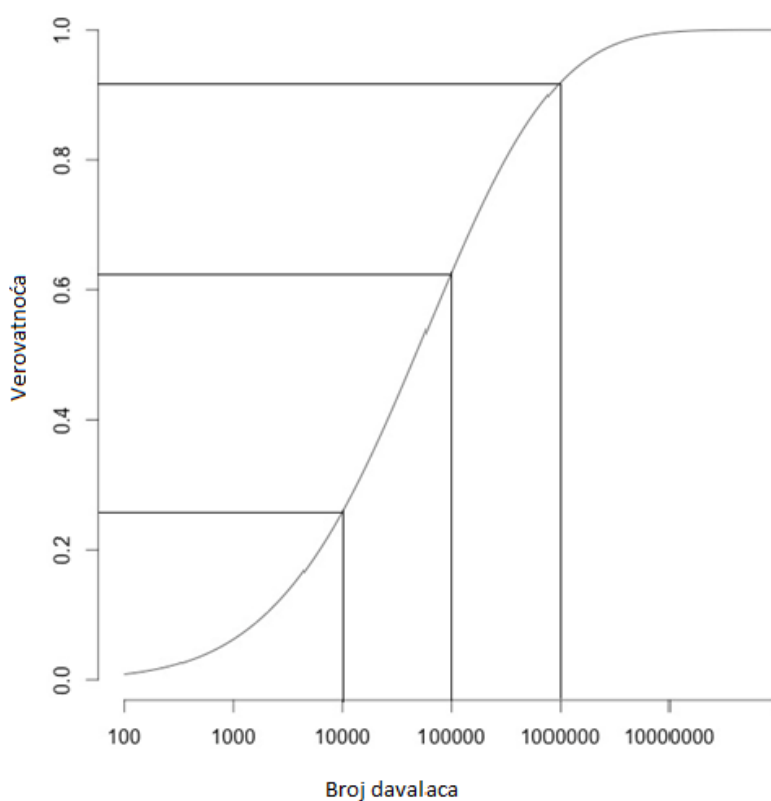
Na grafikonu 2 je prikazano grupisanje populacija u dobijenom dendrogramu. Populacija ispitanika je grupisana sa populacijama Rumunije i Italije, a zatim u grupi sa populacijama Albanije, Makedonije, BiH i Hrvatske. Zajedno sa populacijama Bugarske, Grčke i Turske, ispitivana grupa je deo većeg klastera koji obuhvata i populaciju Rusije. Populacije Zapadne Evrope i populacije drugih belaca su dalje grupisani u odnosu na populacije Jugoistočne Evrope.



Grafikon 2. Dendrogram zasnovan na učestalostima grupa alela za lokuse HLA-A i HLA-B.

4.5 Procena optimalnog broja davalaca u Registru davalaca kostne srži Srbije

Grafikon 3 prikazuje verovatnoću pronalaženja davaoca podudarnog u HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 za svakog novog bolesnika na osnovu dobijenih učestalosti grupa alela i haplotipova lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 u ispitivanoj grupi 1 (N=1992). Verovatnoća da se pronađe davalac za nasumičnog narednog pacijenta iznosi 10,08%. Da bi se ova verovatnoća povećala za 1% potrebno je dodati još 298 osoba, tako da ukoliko Registar ima 2290 davalaca, verovatnoća da se pronađe HLA-A-B-DRB1 podudaran davalac za narednog random pacijenta je 11,08%. Ukoliko bi broj davalaca u Registru bio jedan milion, verovatnoća pronalaženja HLA-A-B-DRB1 podudarnog davaoca bi bila 91,95%.



Grafikon 3. Verovatnoća pronalaženja HLA-A-B-DRB1 podudarnog davaoca u odnosu na broj davalaca u Registru.

Analize polimorfizma HLA i neravnoteže udruživanja alela, kao i razlike učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, imaju primenu prilikom izbora davaoca za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze, solidnih organa i značaj u ispitivanju udruženosti HLA sa etiopatogenezom nekih bolesti. Rezultati ovog rada predstavljaju prvi put prikazane učestalosti alela i učestalosti haplotipova za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u populaciji Srbije. Takođe, na osnovu dobijenog polimorfizma HLA, ustanovljen je stepen genetske sličnosti sa drugim populacijama i dobijena je procena optimalnog broja davalaca u Registru davalaca kostne srži Srbije. Ustanovljeni polimorfizam HLA je osnov za dalja ispitivanja značaja alela HLA kod različitih grupa bolesnika u našoj populaciji.

Ispitivanje je rađeno kod zdravih osoba koje su se prijavile u Registar davalaca kostne srži Srbije (RDKS). RDKS je formiran tokom 2005. godine sa ciljem da omogući lečenje bolesnika kojima je neophodna transplantacija MČH a koji nemaju odgovarajućeg srodnog davaoca (Andrić, 2012). U RDKS može da se prijavi svaka zdrava osoba uzrasta od 18 do 50 godina, prijavljivanje i davanje MČH je dobrovoljno, anonimno i ne plaća se. Prijavljivanje u RDKS se obavlja u svim službama za transfuziju krvi u Srbiji i podrazumeva popunjavanje prijave sa formularom saglasnosti za RDKS i davanje uzorka krvi za HLA tipizaciju. S obzirom na proceduru prijavljivanja u RDKS, ispitanici u ovom radu su zdrave nesrodne osobe iz različitih delova Srbije. Analizom demografskih karakteristika pokazano je da odabrana grupa ispitanika reprezentuje populaciju Srbije s obzirom na to da je 86,14% ispitanika rođeno u Srbiji, a 98,89% živi na teritoriji Srbije. Takođe, 88,3% ispitanika se izjasnilo da su po nacionalnoj pripadnosti Srbi, a dobijena raspodela po nacionalnoj pripadnosti u ispitivanoj grupi u skladu je sa poslednjim popisom stanovništva iz 2011. godine (Republički zavod za statistiku, 2012).

Retrospektivne analize podataka HLA tipizacija davalaca u registrama davalaca MČH se najčešće koriste kao izvor podataka o polimorfizmu HLA za određenu populaciju (Solberg i sar., 2008; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Sanchez-Mazas i sar., 2012; Maiers i sar., 2013), s obzirom na veliki broj ispitanika. Naime, nije jasno utvrđena veličina uzorka koja bi bila dovoljna za procenu značajnosti pojavljivanja alela. Preporučeni

najmanji broj ispitanika je 100 (Sanchez-Mazas i Nunes, 2006), a Sanchez-Mazas i saradnici (Sanchez-Mazas i sar., 2012) su dali preporuku da se učestalost HLA od 1% može smatrati značajnom ukoliko populacija ima više od 200 ispitanika. Međutim, autori sugerišu da ispitivani uzorak treba da bude što je moguće veći nezavisno od određenog broja ispitanika. Učestalosti haplotipova u ovakvim studijama se dobijaju statističkim metodama procene verodostojnosti pojavljivanja haplotipova (engl. *maximum-likelihood estimation*) na osnovu učestalosti dobijenih alela u ispitivanoj populaciji (Sanchez-Mazas i Nunes, 2006). S obzirom na to da se za sve prijavljene davaoce u RDKS, testovima niske i srednje rezolucije, određuju grupe alela za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 (Andrić, 2012), u ovom istraživanju je kod 1992 ispitanika retrospektivnom analizom određena učestalost dobijenih alelskih grupa za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1, kao i učestalost haplotipova HLA-A-B, HLA-A-DRB1, HLA-B-DRB1 i HLA-A-B-DRB1.

Savremeni kriterijumi za izbor davaoca MČH su zasnovani na definisanju alela testovima visoke rezolucije za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-C klase I i HLA-DRB1 i HLA-DQB1 klase II (Bray i sar., 2008; Petersdorf, 2008; EFI, 2012; Lown i Shaw, 2013). U zavisnosti od raspoloživih tehnika, testovima niske rezolucije se prvo određuju grupe alela za svaki lokus, a zatim se testovima visoke rezolucije definišu pojedinačni aleli. Poznato je da je nepodudarnost alela između davaoca i primaoca za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 udružena sa nepovoljnim ishodom transplantacije MČH (Morishima i sar., 2002; Flomenberg i sar., 2004; Petersdorf, 2008; Furst i sar., 2013). Takođe, za lokus HLA-C je potvrđeno da antigenska nepodudarnost ima nepovoljan uticaj na pojavu komplikacija (Morishima i sar., 2002; Flomenberg i sar., 2004; Lee i sar., 2007; Woolfrey i sar., 2011; Furst i sar., 2013), a antigenska nepodudarnost u HLA-DQ može dovesti do većeg mortaliteta nakon transplantacije MČH (Petersdorf, 2008; Weisdorf i sar., 2008; Furst i sar., 2013). Zbog toga je bilo opravdano kod davalaca iz RDKS uraditi dodatno određivanje grupa alela za lokuse HLA-C i HLA-DQ, kao i HLA tipizaciju testovima visoke rezolucije za svih pet lokusa. U podgrupi od 159 slučajno odabranih ispitanika su dodatno definisane grupe alela za lokuse HLA-C i HLA-DQ, a potom je određena učestalost grupa alela za ove lokuse, kao i učestalost haplotipova HLA-C-B, HLA-DRB1-DQB1 i HLA-A-B-C-DRB1-DQB1. Dodatno, kod 112 ispitanika kojima su

prethodno definisane grupe alela, urađena je tipizacija HLA testovima visoke rezolucije, a potom je određena učestalost alela za svih pet lokusa, kao i učestalost haplotipova dva, tri i pet lokusa.

Neophodan preduslov da bi se podaci o učestalosti HLA mogli koristiti za poređenje sa drugim populacijama je procena da li je ispitivana populacija u Hardy–Weinbergovoj ravnoteži za ispitivane lokuse (Gourraud i sar., 2005; Sanchez-Mazas i sar., 2012). Testiranjem održivosti pretpostavke o Hardy–Weinbergovoj ravnoteži HLA lokusa u svakoj od ispitivanih grupa je pokazano da su odabrane grupe ispitanika u ravnoteži za sve ispitivane lokuse HLA, s obzirom na to da se očekivane i dobijene vrednosti učestalosti gena za svaki lokus nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$).

Jedna od osnovnih karakteristika sistema HLA je visok stepen polimorfizma (Bodmer, 2000; Tiercy, 2002), odnosno postojanje dva ili više alela jednog gena u populaciji sa učestalošću većom od 1%. U našoj grupi ispitanika dokazano je 58 grupa alela za lokuse klase I i 18 grupa alela za lokuse klase II HLA. Od toga, učestalost veću od 1% ima 46 grupa alela klase I i 17 grupa alela klase II HLA.

U grupi od 1992 ispitanika, dokazano je prisustvo 16 grupa alela HLA-A (od čega 13 ima učestalost veću od 1%), 28 grupa alela HLA-B (21 grupa alela ima učestalost veću od 1%) i 13 grupa alela HLA-DRB1 (12 grupa alela ima učestalost veću od 1%). Ranijim ispitivanjem genetičke varijabilnosti HLA-A i HLA-B kod stanovništva Srbije primenom seroloških tehnika (Simonović, 1992) dokazano je 8 antigena HLA-A i 20 antigena HLA-B kod 658 osoba. Tipizacija serološkim tehnikama je ograničena raspoloživim specifičnostima antitela, ali je u obe studije ispitivanja polimorfizma u populaciji Srbije potvrđeno da su najučestaliji HLA-A2 (28,49%) odnosno HLA-A*02 (29,5%) za lokus HLA-A, kao i HLA-B35 (13,07%) odnosno HLA-B*35 (13,1%), HLA-B5 (15,35%) odnosno HLA-B*51 (12,8%) i HLA-B18 (9,58%) odnosno HLA-B*18 (9,89%) za lokus HLA-B. Nešto veća učestalost HLA-B5 u odnosu na HLA-B*51 je očekivana s obzirom na to da antigen HLA-B5 ima dva podtipa koja su kodirana grupama alela HLA-B*51 i HLA-B*52 (koji je prisutan u 1,18%) i koji se nisu mogli razlikovati serološkim testovima (Marsh i sar., 2010). Manji broj ispitanika prethodne studije nije uticao na dobijene učestalosti najčešćih grupa alela, ali je veći broj ispitanika u ovoj studiji dao bolji uvid u raspodelu učestalosti ostalih grupa alela lokusa HLA-A i HLA-B, kao i mogućnost dokazivanja

učestalosti seroloških podtipova. Dalje studije na većem broju ispitanika bi trebalo da pokažu učestalost pojavljivanja do sada neotkrivenih grupa alela u populaciji Srbije. Grupe alela koje nisu dokazane ovim ispitivanjem su A*34, A*36, A*43, A*74, A*80 za lokus HLA-A i B*42, B*59, B*67, B*73, B*78, B*81, B*82, i B*83 za lokus HLA-B.

Analiza rezultata dobijenih za grupe alela lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-C je pokazala da 10 grupa alela klase I HLA ima učestalost veću od 10%: A*02 (29,5%), C*07 (24,8%), A*01 (14,2%), C*04 i C*12 (po 13,5%), B*35 (13,1%) i B*51 (12,8%), A*03 (11,3%), A*24 (11,1%) i C*06 (10,1%). Polovina ispitanika ima HLA-A*02 (fenotipska učestalost 50,95%), a A*02 je dominantna grupa alela lokusa HLA-A u svim evropskim populacijama (Middleton i sar., 2003; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). HLA-A*01 je druga po učestalosti grupa alela lokusa HLA-A (14,2%) u ispitivanoj populaciji, slično kao i u populaciji Hrvatske i nekim populacijama Centralne i Zapadne Evrope, ali za razliku od drugih susednih populacija i populacija jugoistočne Evrope u kojima je druga po učestalosti grupa alela A*24 ili A*03 (Ivanova i sar., 2001; Sulcebe i sar., 2009; Alcoceba i sar., 2011; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). HLA-B*35 i HLA-B*51 su najučestalije grupe alela i u populacijama Italije (Rendine i sar., 1998) i populacijama Istočne Evrope, osim populacija Hrvatske i Rumunije gde su najučestaliji B*35 i B*18, kao i BiH gde su najučestaliji B*44 i B*51 (Arnaiz-Villena i sar., 2001; Arnaiz-Villena i sar., 2001; Ivanova i sar., 2001; Arnaiz-Villena i sar., 2009; Sulcebe i sar., 2009; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). U našoj grupi ispitanika sledeće po učestalosti grupe alela za lokus HLA-B su B*18, B*44 i B*08. HLA-B*44 sa HLA-B*07 su najučestalije grupe alela lokusa HLA-B u populacijama Zapadne Evrope, kao i u populaciji Rusije (Crespi i sar., 2002; Harbo i sar., 2010; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Najučestalije grupe alela za lokus HLA-C su, pored HLA-C*07 (24,8%), HLA-C*04, HLA-C*12 (sa po 13,5%) i HLA-C*06 (10,1%). Ovim rezultatima je potvrđen zaključak prvog ispitivanja polimorfizma lokusa C u našoj populaciji o najučestalijim grupama alela lokusa HLA-C (Andrić i sar., 2008) i u skladu je sa rezultatima Buhlera i saradnika (Buhler i sar., 2006) u studiji o polimorfizmu lokusa HLA-C u 39 evropskih populacija.

Analiza rezultata dobijenih za grupe alela klase II HLA je pokazala da sve grupe alela koje su dokazane za lokuse HLA-DRB1 i HLA-DQB1, osim DRB1*09, imaju učestalost veću od 1%. Najučestalije grupe alela za lokus HLA-DRB1 su DRB1*11 (16,9%) i

DRB1*13 (13,2%), slede DRB1*03 i DRB1*16 (po 10,9%). HLA-DRB1*11 je takođe najučestalija grupa alela u populacijama Balkana i populacijama susednih zemalja, dok je DRB1*13 druga po učestalosti grupa alela u populaciji Austrije, Italije i Grčke (Rendine i sar., 1998; Arnaiz-Villena i sar., 2001; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Najučestalije grupe alela za lokus HLA-DQB1 su DQB1*03 (33,3%) i DQB1*05 (33%).

Za sistem HLA je karakteristična neravnoteža udruživanja alela (engl. *linkage disequilibrium*) tj. pojava da se određeni aleli dva lokusa pojavljuju zajedno u istom haplotipu mnogo češće ili ređe nego što bi se očekivalo s obzirom na učestalost tih alela u populaciji (Bodmer, 2000; Gourraud i sar., 2005; Sanchez-Mazas i Nunes, 2006). Neravnoteža udruživanja alela različitih lokusa ukazuje na moguću evolutivnu povezanost alela HLA (Fernandez Vina i sar., 2012), a poznavanje udruženosti alela HLA u haplotipu dva i više lokusa ima praktičan značaj prilikom pronalaženja davaoca za transplantaciju MČH. U ispitivanoj grupi, među haplotipovima dva lokusa koji imaju učestalost veću od 1%, značajno udruživanje grupa alela ($D' \geq 0,05$) je dobijeno za 38,5% (10/26) haplotipova HLA-A-B, 34,6% (9/26) haplotipova HLA-A-DRB1, 62,1% (18/29) haplotipova HLA-B-DRB1, 89,3% (25/28) haplotipova HLA-B-C i 76,9% (10/13) haplotipova HLA-DRB1-DQB1. S obzirom na to da se davaoci u RDKS tipiziraju za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1, za procenu koji će davalac biti podudaran sa bolesnikom i za lokuse HLA-B i HLA-C značajno je poznavanje učestalosti i neravnoteže udruživanja alela za haplotipove HLA-B-C i haplotipove HLA-DRB1-DQB1. U ispitanoj populaciji dobijeno je da najučestaliji haplotipovi grupe alela koji čine lokusi HLA-B i HLA-C su B*35-C*04 (11,0%, $D' = 0,7864$), B*08-C*07 (9,4%, $D' = 0,3151$) i B*18-C*07 (7,5%, $D' = 0,2006$). Najčešći haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 su DRB1*11-DQB1*03 (17%, $D' = 0,4091$), DRB1*03-DQB1*02 (12,9%, $D' = 0,7236$), DRB1*01-DQB1*05 (12,9%, $D' = 0,3003$) i DRB1*16-DQB1*05 (12,3%, $D' = 0,2836$).

Analizom haplotipova lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 u populaciji sa 1992 ispitanika dobijeno je da je najčešći haplotip u populaciji Srbije A*01-B*08-DRB1*03 (5,9%). To je ujedno i dominantan haplotip u evropskim populacijama, tako da drugi autori navode ovaj haplotip kao karakterističan haplotip bele rase (Arnaiz-Villena i sar., 2001; Ruiz i sar., 2005; Leffell i sar., 2007; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Bortolotto i sar., 2012). Drugi po učestalosti haplotip tri lokusa u našoj populaciji je A*02-B*18-

DRB1*11 (1,9%). Ovaj haplotip je najčešći u nekim mediteranskim populacijama (Arnaiz-Villena i sar., 2001; Sulcebe i sar., 2009; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Treći po učestalosti haplotip tri lokusa je A*33-B*14-DRB1*01, koji ima učestalost u populaciji Srbije 1,5%. Ovaj haplotip ima sličnu učestalost i u populacijama Portugalije (1%-2,2%) i populacijama Španije (1, 1-2,6%) (Crespi i sar., 2002; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Međutim, Muller i saradnici (Muller i sar., 2003) su na velikom broju uzoraka dobili da u populaciji Nemačke haplotip A*33-B*14-DRB1*01 ima deset puta manju učestalost (0,1%) u odnosu na našu populaciju, a Kollman i saradnici (Kollman i sar., 2007) su takođe pokazali manju učestalost ovog haplotipa u populaciji američkih belaca (0,5%). Prema raspoloživim podacima za učestalost haplotipova grupa alela tri lokusa (Gonzalez-Galarza i sar., 2011), ovaj haplotip nisu prikazali autori u drugim populacijama belaca, ali je A*33-B*14-DRB1*0102 prisutan među 10 najčešćih haplotipova kod Latino Amerikanaca (Kollman i sar., 2007). Simonović i saradnici su pokazali da haplotip A33-B14, koji je dokazan serološkim testovima u populaciji Srbije, ima visoko pozitivnu vrednost D' (Simonovic i sar., 1993).

U ovom radu su prvi put dobijeni haplotipovi i njihove učestalosti koji se odnose na sve lokuse relevantne za izbor davaoca MČH u populaciji Srbije. Uzimajući u obzir učestalosti svih pet grupa alela, kao i neravnotežu udruživanja grupa alela (D') za lokuse HLA-DRB1 i HLA-DQB1, i HLA-B i HLA-C, očekivano je dobijeno da je najučestaliji haplotip pet lokusa u našoj populaciji A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (6,6%). HLA-B*08 ima samo jednu dokazanu kombinaciju u haplotipu dva lokusa i to je HLA-B*08-C*07 (haplotipska učestalost 9,43%, $D'=0,3151$) tj. nije dobijeno da se grupa alela HLA-B*08 udružuje sa nekom drugom grupom alela lokusa HLA-C u našoj grupi ispitanika. Takođe, dobijeno je da se grupa alela HLA-DRB1*03 javlja samo sa grupom alela DQB1*02 (haplotipska učestalost DRB1*03-DQB1*02 je 12,9%, $D'=0,7236$). Drugi po učestalosti haplotip pet lokusa je A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (2,5%). HLA-B*18 se najčešće udružuje sa HLA-C*07 (haplotipska učestalost 7,5%, $D'=0,2006$), ali se pojavljuje i u haplotipu sa B*18-C*05 (1,26%, $D'=0,0652$), B*18-C*12 (3,76% $D'=0,1713$) i B*18-C*01 (0,3%). DRB1*11-DQB1*03 (16,98%, $D'=0,7236$) je najčešći haplotip dva lokusa i to je jedina kombinacija u kojoj se pojavljuje grupa alela DRB1*11. Sledeća dva haplotipa pet lokusa (učestalost oba haplotipa po 2,2%) su A*33-B*14-

C*08-DRB1*01-DQB1*05 i A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05. Inače, B*14-C*08 (haplotipska učestalost 4,1%, $D'=1$), kao i B*41-C*17 (haplotipska učestalost 1,6%, $D'=1$) su jedini haplotipovi dva lokusa za koje je dobijeno da se obe grupe alela pojavljuju samo u tom haplotipu. S obzirom na to da se haplotip A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 javlja sa velikom učestalošću u populacijama severne, centralne i istočne Evrope, Crespi i saradnici (Crespi i sar., 2002) navode da se ovaj haplotip može smatrati pan-evropskim haplotipom, dok je haplotip A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 karakterističan za mediteranske populacije. Haplotipovi grupe alela pet lokusa kod populacija susednih zemalja su dostupni za albansku i hrvatsku populaciju. Tako, Sulcebe i saradnici (Sulcebe i sar., 2009) su na uzorku od 160 ispitanika dobili da su u albanskoj populaciji najučestaliji haplotipovi grupe alela pet lokusa A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (4,3%), A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (3,1%) i A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQB1*03 (3%). Grubić i saradnici (Grubic i sar., 2000) su na 105 ispitanika hrvatske populacije naveli da je najučestaliji haplotip A1-B8-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*02 (4,3%), zatim A3-B7-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 (2,4%) i A24-B44-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*02 (1,7%).

Ispitivanja haplotipova dva i tri lokusa za grupe alela HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 su rađene na uzorku od 1992 ispitanika, a ispitivanja haplotipova dva, tri i pet lokusa koji uključuju i grupe alela HLA-C i HLA-DQB1 su rađena na uzorku sa manjim brojem ispitanika (N=159). Međutim, zbog dokazane udruženosti alela lokusa HLA-B i HLA-C, kao i HLA-DRB1 i HLA-DQB1, poznavanje neravnoteže udruživanja omogućava da se predvide haplotipovi ukoliko su poznate tipizacije za HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1, a oko 80% davalaca u Svetkom registru (Foeken i sar., 2010) je tipizirano za ova tri lokusa. U skladu sa standardima (EFI, 2012), svi davaoci u RKDS su tipizirani za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 testovima niske rezolucije. Zbog toga, poznavanje učestalosti i neravnoteže udruživanja haplotipova HLA-B-C i haplotipova HLA-DRB1 i DQB1 u našoj populaciji, kao i u ostalim populacijama, omogućava skraćivanje vremena traženja davaoca za određenog bolesnika.

Razvojem tehnika tipizacije HLA je omogućen napredak u pouzdanosti određivanja podudarnosti između davaoca i primaoca MČH (Oudshoorn i sar., 2007; Petersdorf, 2008). Izbor odgovarajućeg davaoca je zasnovan na tehnikama tipizacije koje moraju

da omoguće određivanje alela koji kodiraju istu proteinsku sekvencu peptid vezujućeg mesta molekula HLA. U ovom radu korišćena je metoda PCR-SSP visoke rezolucije tipizacije koja omogućava definisanje egzona 2 i egzona 3 u lokusima regiona klase I, odnosno egzona 2 u lokusima regiona klase II HLA za svaku grupu alela. Za određivanje alela u okviru jedne grupe alela bilo je potrebno od 5 do 92 PCR reakcije, odnosno u proseku 300-450 PCR reakcija za određivanje alela na svih pet lokusa kod jednog ispitanika. U slučajno odabranom uzorku od 112 ispitanika, kojima je prethodno određena grupa alela svih pet lokusa, definisani su egzon 2 i egzon 3 za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-C, kao i egzon 2 za lokuse HLA-DRB1 i HLA-DQB1 testovima visoke rezolucije. U ispitanoj grupi dokazano je prisustvo 121 alela HLA, a svi dokazani aleli su u kategoriji opštih i dobro dokumentovanih alela po CWD klasifikaciji (Mack i sar., 2013). Od toga 66,7% (16/24) alela lokusa HLA-A, 65,7% (23/35) alela lokusa HLA-B, 16/20 (80%) alela lokusa HLA-C, 69,2% (18/26) alela lokusa HLA-DRB1 i 81,5% (13/16) alela lokusa HLA-DQB1 ima učestalost veću od 1%. Najviše alela je dobijeno za lokus HLA-B (35 alela), a najmanje za HLA-DQB1 (16 alela). I drugi autori dokazuju najveći broj alela za lokus HLA-B (Dunne i sar., 2008; Nowak i sar., 2008; Schmidt i sar., 2009; Matevosyan i sar., 2011; Schmidt i sar., 2011; Rendine i sar., 2012), što je očekivano s obzirom na ukupni broj dokazanih alela po lokusu (Robinson i sar., 2013). Na polimorfizam HLA u ispitivanoj grupi ukazuju i podaci da aleli sa učestalošću većom od 1% čine 95,09% (213/224) dokazanih alela lokusa HLA-A, 92,41% (207/224) alela lokusa HLA-B, 98,2% (220/224) alela lokusa HLA-C, 94,64% (212/224) alela lokusa HLA-DRB1 i 98,66% (221/224) alela lokusa HLA-DQB1. Odnosno samo 4,2% (47/1120) svih dokazanih alela se pojavljuju sa učestalošću manjom od 1%. Prema preporukama Sanchez-Mazas i saradnika radne grupe HLA-NET (Sanchez-Mazas i sar., 2012), na uzorku od 100 ispitanika značajnu učestalost imaju aleli sa učestalošću većom od 1,96%, a na uzorku od 200 ispitanika aleli sa učestalošću većom od 1%. U grupi od 112 ispitanika koji su bili uključeni u ovo istraživanje, 78 alela se pojavljuje 4 i više puta (učestalost veća od 1,64%) i može se smatrati da imaju značajnu učestalost.

Najveću heterogenost u ispitivanoj grupi ima grupa alela HLA-DRB1*04 sa 6 dokazanih alela (DRB1*04:01, DRB1*04:02, DRB1*04:03, DRB1*04:04, DRB1*04:05 i DRB1*04:06), zatim slede alelske grupe sa 5 dokazanih alela HLA-A*02 (A*02:01,

A*02:02, A*02:05, A*02:17, A*02:25) i HLA-DQB1*06 (DQB1*06:01, DQB1*06:02, DQB1*06:03, DQB1*06:04, DQB1*06:09). Četiri dokazana alela imaju alelske grupe HLA-C*07 (C*07:01, C*07:02, C*07:04, C*07:06), HLA-DQB1*03 (DQB1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*03:03, DQB1*03:04) i HLA-DQB1*05 (DQB1*05:01, DQB1*05:02, DQB1*05:03, DQB1*05:04), a tri dokazana alela imaju grupe alela HLA-A*30 (A*30:01, A*30:02, A*30:04), HLA-B*27 (B*27:02, B*27:05, B*27:09), HLA-B*44 (B*44:02, B*44:03, B*44:05), HLA-C*03 (C*03:02, C*03:03, C*03:04), HLA-DRB1*11 (DRB1*11:01, DRB1*11:03, DRB1*11:04) i HLA-DRB*13 (DRB1*13:01, DRB1*13:02, DRB1*13:03). Ostale grupe alela imaju ograničen polimorfizam (jedan ili dva alela unutar grupe alela).

Praktičan značaj, prilikom izbora parova za transplantaciju, ima činjenica da neke grupe alela imaju dominantan alel tj. alel sa velikom učestalošću pojavljivanja, dok u nekim grupama alela više alela imaju sličnu učestalost. Tako na primer, jedini aleli dokazani u grupama alela lokusa HLA-A sa visokom učestalošću (5% i više) su A*01:01 (12,05%), A*03:01 (8,48%) i A*11:01 (8,93%). Najčešći alel lokusa HLA-B je B*51:01 (12,95%) i to je ujedno i jedini dokazani alel u alelskoj grupi HLA-B*51, kao i B*08:01 (8,04%) za grupu alela HLA-B*08. Za lokus HLA-C, jedini dokazani aleli u svojim alelskim grupama su C*01:02 (8,04%), C*02:02 (6,25%), C*04:01 (15,18%) i C*06:02 (10,71%). Najučestaliji aleli za lokus HLA-DRB1 su DRB1*03:01 (11,16%) i DRB1*16:01 (10,71%) i oni su jedini dokazani aleli u alelskim grupama. Samo jedan alel je dokazan i za alelsku grupu HLA-DRB1*07 (DRB1*07:01, 7,14%). S druge strane, sve grupe alela lokusa HLA-DQB1 sa učestalošću većom od 5% imaju više od jednog alela. U alelskim grupama u kojima je dokazano više alela, sledeći aleli su dominantni (sa učestalošću većom od 5%): A*02:01 (27,23%), A*24:02 (8,04%), B*08:01 (8,04%), C*07:01 (15,18%), C*12:03 (12,50%), DRB1*01:01 (8,93%), DRB1*15:01 (5,80%). U nekim grupama alela dokazano je više alela sa učestalošću većom od 5%: B*35:01 (8,48%) i B*35:03 (6,25%), DRB1*11:01 (6,70%) i DRB1*11:04 (5,36%), DQB1*03:01 (16,52%) i DQB1*03:02 (9,82%), kao i DQB1*05:01 (13,39%), DQB1*05:02 (12,05%) i DQB1*05:03 (8,48%).

Najčešći alel lokusa HLA-A je HLA-A*02:01 (27,23%), koji je ujedno najčešći alel i u drugim evropskim populacijama (Ivanova i sar., 2002; Schmidt i sar., 2009; Mack i sar., 2011; Schmidt i sar., 2011; Rendine i sar., 2012; Pingel i sar., 2013). U ispitivanoj grupi

naše populacije dobijeno je da je najčešći alel lokusa HLA-B, HLA-B*51:01 (12,95%) koji se kao najučestaliji pojavljuje i u populacijama BiH, Grčke, Hrvatske, Portugalije i Turske (Pingel i sar., 2013). Najučestaliji aleli lokusa HLA-C u našoj populaciji, C*04:01 i C*07:01 (15,18%), su zastupljeni i u drugim evropskim populacijama (Schmidt i sar., 2009; Schmidt i sar., 2011; Rendine i sar., 2012; Pingel i sar., 2013). Za lokus HLA-DRB1 najučestaliji aleli su DRB1*03:01 (11,16%) i DRB1*16:01 (10,71%). Pingel i saradnici (Pingel i sar., 2013) su prikazali na velikom broju uzoraka dobijenih od ispitanika poreklom iz 17 zemalja, koji su prijavljeni u nemački registar davalaca MČH, da je HLA-DRB1*03:01 prisutan među tri najučestalija alela lokusa HLA-DRB1 u populacijama Austrije, BiH, Španije, Engleske, Hrvatske, Holandije, Poljske, Portugalije, Rumunije, Rusije, Amerike, ali ne i u populacijama Francuske, Italije, Grčke, Turske, Kine. Međutim, HLA-DRB1*16:01 je prisutan među prva tri samo u populaciji Grčke, a dokazan je kao najučestaliji zajedno sa HLA-DRB1*11:04 u populaciji Bugarske (Ivanova i sar., 2002) i Makedonije (Petlichkovski i sar., 2004). U našoj populaciji, HLA-DRB1*04:01 (4,02%) ima najveću učestalost u odnosu na druge alele koji su dokazani unutar grupe alela HLA-DRB1*04, sledeći po učestalosti su DRB1*04:02 (2,68%) i HLA-DRB1*04:03 (1,79%). Slična distribucija dobijena je i u populaciji Hrvatske (Grubic i sar., 2012), dok su u većini drugih evropskih populacija najčešći aleli HLA-DRB1*04:01 i DRB1*04:04 (Ivanova i sar., 2002; Nowak i sar., 2008; Eberhard i sar., 2010; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Schmidt i sar., 2011; Rendine i sar., 2012).

Merenjem neravnoteže udruživanja alela za haplotipove koje čine dva lokusa, u ispitivanoj grupi dobijena je statistički značajna neravnoteža udruživanja alela (nivo značajnosti $p=0,05$) lokusa HLA-B i HLA-C ($p = 0,00031$) i lokusa HLA-DRB1 i HLA-DQB1 ($p = 0,00000$). Ostali parovi lokusa HLA nemaju statistički značajnu neravnotežu udruživanja alela ($p>0,05$): HLA-A-B $p=1,00000$, HLA-A-C $p=0,99990$, HLA-A-DRB1 $p=1,00000$, HLA-B-DRB1 $p=1,00000$, HLA-C-DRB1 $p=0,95911$, HLA-A-DQB1 $p=0,99982$, HLA-B-DQB1 $p=0,98638$, C-DQB1 $p=0,34656$. Svih 29 dobijenih haplotipova HLA-B-C i svi HLA-DRB1-DQB1 haplotipovi (ukupno 21) sa učestalošću većom od 1%, kao i 75% (18/24) haplotipova HLA-A-B, 62,1% (18/29) haplotipova HLA-A-C, 81,5% (22/27) haplotipova HLA-A-DRB1, 90,5% (19/21) haplotipova HLA-B-DRB1, 84% (21/25) haplotipova HLA-C-DRB1, 64,5% (20/31) haplotipova HLA-A-DQB1, 83,9% (26/31)

haplotipova HLA-B-DQB1 i 77,8% (28/36) haplotipova HLA-C-DQB1 imaju i $D' \geq 0,05$. Aleli za koje je dobijeno da se uvek udružuju u haplotip ($D'=1$) su HLA-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (broj pojavljivanja je $N=25$, učestalost haplotipa je 11,16%), HLA-B*52:01-C*12:02 ($N=5$, 2,23%), HLA-DRB1*15:02-DQB1*06:01 ($N=4$, 1,79%), HLA-B*41:02-C*17:03 ($N=3$, 1,34%), kao i HLA-A*30:04-B*14:01 ($N=2$, 0,89%). Haplotipovi koji imaju $D'=1$ a pojavljuju se samo jednom su HLA-A*02:17-B*39:06, HLA-A*29:01-B*07:05, HLA-A*29:01-DRB1*10:01, HLA-B*57:02-C*18:02, HLA-B*58:01-C*03:02, HLA-B*07:05-DRB1*10:01.

Najčešći haplotip alela klase I HLA je HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01 (5,4%), a dobijeno je 9 haplotipova alela lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 koji imaju učestalost veću od 1%. Najčešći je haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 koji se pojavljuje 10 puta, dok se haplotipovi HLA-A*02:01-B*44:02-DRB1*16:01, HLA-A*02:01-B*51:01-DRB1*16:01 i HLA-A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 pojavljuju po 5 puta u ispitivanoj grupi.

Dobijeno je 2897 mogućih haplotipova alela svih pet ispitivanih lokusa u našoj grupi ispitanika. Sedam haplotipova alela HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 ima učestalost veću od 1%, s tim što je kumulativna učestalost 13,34%. Slična kumulativna učestalost najčešćih haplotipova svih pet lokusa je dobijena kod 338 ispitanika u populaciji Italije, 8 haplotipova ima učestalost veću od 1% sa kumulativnom učestalošću od 13,92% (Rendine i sar., 2012). Kod 200 ispitanika u populaciji Poljske (Nowak i sar., 2008) 10 haplotipova ima učestalost veću od 1% sa kumulativnom učestalošću od 17,64%. Manja heterogenost je dobijena za populaciju Finske, gde u grupi od 504 ispitanika 14 haplotipova ima učestalost veću od 1% sa kumulativnom učestalošću od 31,12% (Haimila i sar., 2013).

Najučestaliji haplotip svih pet lokusa u našoj populaciji je A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (4,4%), koji je prisutan kao najučestaliji haplotip i u drugim evropskim populacijama (Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Pingel i sar., 2013). Drugi po učestalosti haplotip svih pet lokusa je A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 sa 2,2%. Pingel i saradnici (Pingel i sar., 2013) su na osnovu porekla roditelja ispitanika iz nemačkog registra prikazali da je haplotip A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02 među prvih deset haplotipova u populacijama Španije (učestalost

haplotipa 1,13%), Grčke (0,74%), Italije (0,93%), Portugalije (0,84%) i Turske (0,79%) a nije dokazan u prvih deset haplotipova u populacijama Austrije, Francuske, Nemačke, Velike Britanije, Holandije, Poljske, BiH, Hrvatske, Rumunije, Kazahstana, Rusije, Amerike i Kine. Odsustvo ovog haplotipa se uočava i u radovima drugih autora za populacije Hrvatske sa 105 ispitanika (Grubic i sar., 2000), Bugarske sa 55 ispitanika (Ivanova i sar., 2002), Poljske sa 200 ispitanika (Nowak i sar., 2008), Nemačke sa 20653 ispitanika (Schmidt i sar., 2011), Francuske sa 356 ispitanika (Pedron i sar., 2005), Finske sa 504 ispitanika (Haimila i sar., 2013) i Irske sa 250 ispitanika (Dunne i sar., 2008). Rendine i saradnici (Rendine i sar., 2012) su pokazali da je među 338 ispitanika, A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 drugi po učestalosti haplotip u populaciji Italije, sa učestalošću 2,2%. Maires i saradnici (Maires i sar., 2007) su rangirali haplotipove kod Američke populacije poreklom sa različitih kontinenata. Haplotip A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 se kao peti po učestalosti pojavljuje kod Latino Amerikanaca (Hispano Amerikanaca), dok kod populacija afričkih, evropskih i azijskih Amerikanaca ovaj haplotip nije među prvih deset (kod afričkih nije dokazan, kod evropskih na 15., a kod azijskih na 1036. mestu po učestalosti). Klitz i saradnici (Klitz i sar., 2009) su dobili da učestalost haplotipa A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02 u populaciji 553 ispitanika meksičkih Amerikanaca iznosi 1,09%, a u prikazanim učestalostima u populaciji 564 afričkih Amerikanaca u radu Tua i saradnika (Tu i sar., 2007) nije dobijen ovaj haplotip među haplotipovima koji imaju učestalost $\geq 0,26\%$. Međutim, A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 je najučestaliji haplotip u populaciji Jermenije (učestalost 3%) kako su dokazali Matevosyan i saradnici (Matevosyan i sar., 2011) u grupi od 100 osoba iz njihovog registra. Ayed i saradnici (Ayed i sar., 2004) su na uzorku 100 osoba iz Tunisa dokazali da je haplotip HLA-A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQA1*01:01-DQB1*05:01 među prvih pet sa učestalošću 4%. Najveća učestalost haplotipa A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 (4,3%) je dobijena u populaciji 46 ispitanika severne Portugalije (Spinola i sar., 2002; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). U ranijim radovima haplotip A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 je naveden kao mediteranski (Spinola i sar., 2002; Ayed i sar., 2004; Andrić i sar., 2008). Uzimajući u obzir dokazanu povezanost alela lokusa HLA-B i HLA-C, kao i alela lokusa HLA-DRB1 i HLA-DQB1, zatim dokazanu učestalost ovog haplotipa u našoj grupi ispitanika i

analiziranu distribuciju haplotipova u drugim populacijama, može se smatrati da je prošireni haplotip A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 karakterističan za mediteransku grupu populacija. Sve navedene populacije, uključujući i našu grupu ispitanika, koje imaju haplotip A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 označen kao mediteranski, imaju i pan-evropski haplotip A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 kao najučestaliji, osim populacija Jermenije i Tunisa u kojima nije dokazano prisustvo ovog haplotipa.

S obzirom na to da na učestalost alela i haplotipova utiče broj ispitanika (Sanchez-Mazas i sar., 2012), uporedili smo dobijene rezultate haplotipova u našim grupama ispitanika. U svim grupama je kao najučestaliji dobijen haplotip A*01-B*08-DRB1*03 i to u grupi od 1992 ispitanika dobijen je A*01-B*08-DRB1*03 sa učestalošću 5,91%, u grupi od 159 ispitanika dobijen je prošireni haplotip A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 sa učestalošću 6,6%, a u grupi od 112 ispitanika dobijen je A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 sa 4,4%. Kao drugi najučestaliji haplotip u našoj populaciji u grupi ispitanika kojoj su rađeni testovi niske rezolucije dobijen je A*02-B*18-DRB1*11 i to u grupi od 1992 ispitanika sa učestalošću 1,91%, a u grupi od 159 ispitanika dobijen je prošireni haplotip A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 sa učestalošću 2,5%. Haplotip A*02:01-B*18:01-C*07:01-DRB1*11:04-DQB1*03:01 ima učestalost 0,89% u grupi 112 ispitanika. Treći po učestalosti haplotip u grupi 1992 ispitanika je A*33-B*14-DRB1*01 (1,45%), a grupi od 159 ispitanika prošireni haplotip A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 sa učestalošću 2,2%. A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 sa 2,2% je drugi haplotip alela u grupi 112 ispitanika.

Dobijeni podaci o učestalosti alela i haplotipova se koriste za određivanje stepena genetske sličnosti poređenjem sa drugim populacijama (Schipper i D'Amato, 2000; Solberg i sar., 2008). Middleton i saradnici (Middleton i sar., 2003; Gonzalez-Galarza i sar., 2011) objedinjuju publikovane podatke o učestalosti alela i haplotipova, kao i podatke o poreklu ispitivane populacija, broju ispitanika, tehnikama tipizacije. Ova baza je dostupna na www.allele frequencies.net i osnovni je izvor informacija geografske distribucije alela i haplotipova i za poređenje sopstvene sa drugim populacijama (Solberg i sar., 2008; Gonzalez-Galarza i sar., 2011; Sanchez-Mazas i sar., 2012). Sadrži podatke o polimorfizmu HLA za 924 populacije različitog etničkog i

geografskog porekla sa ukupno oko 4,5 miliona ispitanika. Od toga je 194 populacija sa 10-50 ispitanika, 264 sa 51-100 ispitanika, 319 sa 101-500, 41 sa 501-1000 ispitanika, 75 sa 1000-5000 i 36 populacija sa preko 5000 ispitanika (<http://www.allelefrequencies.net>, februar 2014). Ispitivanje stepena genetske sličnosti naše grupe ispitanika sa drugim populacijama je rađeno u odnosu na 284222 osoba iz 46 populacija na osnovu dostupne učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A i HLA-B (Middleton i sar., 2003; Gonzalez-Galarza i sar., 2011). Filogenetsku analizu na osnovu ovako dostupnih podataka su radili i drugi autori (Dunne i sar., 2008; Arrieta-Bolanos i sar., 2011; Rendine i sar., 2012). Odabrane su populacije Evrope, kao i populacije bele rase ispitanika iz Australije i Amerike. Na osnovu vrednosti genetske distance, populacija naših ispitanika ima najveći stepen genetske sličnosti sa susednim populacijama, kao i populacijama koje žive na području centralnog Balkana. Na dobijenom dendrogramu je pokazano da je populacija Srbije, sa populacijama Rumunije i Italije, deo grupe kojoj još pripadaju i populacije Albanije, Makedonije, BiH i Hrvatske. Zajedno sa populacijama Bugarske, Grčke i Turske, ispitivana grupa je deo većeg klastera koji obuhvata i populaciju Rusije. Populacije Zapadne Evrope i populacije drugih belaca su dalje grupisani u odnosu na populacije Jugoistočne Evrope. Slična pozicija populacije Srbije je prikazana i na dendrogramima autora koji su koristili dostupne podatke o učestalosti HLA-A i HLA-B za populaciju Srbije na uzorku od 291 ispitanika (Andric i sar., 2007; Sulcebe i sar., 2009; Arrieta-Bolanos i sar., 2011). Na genetsku sličnost i sa mediteranskim i sa zapadnoevropskim populacijama ukazuje i prisustvo panevropskog (A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01) i mediteranskog (A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01) haplotipa alela kao dva najučestalija haplotipa u našoj populaciji.

Najveći stepen genetske sličnosti na osnovu učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A i HLA-B je dobijen sa populacijama Rumunije (DAX100= 1,384838) i Italije (DAX100 =2,199858). Sličnost sa populacijom Italije se uočava i u analizi učestalosti haplotipova alela. Rendine i saradnici (Rendine i sar., 2012) su prikazali najčešće haplotipove pet lokusa u grupi od 338 ispitanika. Među 8 haplotipova koji imaju učestalost veću od 1% su 4 haplotipa koja su dokazana i u našoj populaciji među 7 haplotipova sa učestalošću većom od 1%: A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (4,66% u

italijanskoj populaciji u odnosu na 4,41% u našoj grupi ispitanika), A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 (1,78% u odnosu na 2,23%), A*30:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02 (1,60% u odnosu na 1,34%) i A*30:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (1,04% u odnosu na 1,34%). Međutim, Pingel i saradnici (Pingel i sar., 2013) su pokazali da u grupi 1234 ispitanika poreklom iz Rumunije, osim panevropskog haplotipa A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (5,75% u odnosu na 4,41%), nema drugih istih haplotipova sa učestalošću većom od 1% kao u našoj grupi ispitanika.

Poznavanje učestalosti alela i haplotipova u određenoj populaciji ima praktičan značaj za strategiju planiranja registra davalaca MČH, kao i za pristup u traženju davaoca MČH za određenog bolesnika. Procena optimalnog broja davalaca u RDKS je rađena u odnosu na grupu ispitanika sa najvećim brojem haplotipova ($n=3984$) i u ovoj ispitivanoj grupi je dobijeno 2463 mogućih haplotipova grupe alela HLA-A-B-DRB1. Verovatnoća pronalaženja davaoca podudarnog u HLA-A-B-DRB1 je 25% ukoliko se u Registru nalazi 10 000 davalaca. Sa 100 000 tipiziranih davalaca, verovatnoća je 65%, a sa milion davalaca verovatnoća je 92%. Slična aproksimacija procene verovatnoće pronalaženja davaoca može se očekivati i u odnosu na svih pet lokusa s obzirom na to da je dokazano značajno udruživanje grupa alela ($D' \geq 0,05$) kod 89,3% haplotipova HLA-B-C i 76,9% haplotipova HLA-DRB1-DQB1 koji imaju učestalost veću od 1%. Takođe, u grupi od 112 ispitanika je dobijeno da svi haplotipovi alela HLA-B-C i svi haplotipovi alela HLA-DRB1-DQB1 sa učestalošću većom od 1% imaju i statistički značajno udruživanje alela ovih lokusa.

Muller i saradnici (Muller i sar., 2003) su dobili da verovatnoća da se pronađe HLA-A-B-DR fenotipski podudaran davalac iznosi oko 66% ako u Registru ima 150 000 davalaca, ali da je potrebno 10 000 novih davalaca da bi se ta verovatnoća povećala za 1%. Takođe, uzimajući u obzir učestalosti u njihovoj populaciji, 100 000 novih davalaca u Registru sa milion davalaca povećava verovatnoću sa 85% na 86%. Autori zaključuju da se sa povećanjem broja davalaca u Registru povećava i verovatnoća pronalaženja podudarnog davaoca, ali da nije moguće dostići verovatnoću 100%. Razlog tome je ekstremni polimorfizam HLA, kao i ponavljanje istih haplotipova. Odnosno, efikasnija strategija povećanja broja davalaca treba da bude usmerena i na populacije davalaca

sa retkim haplotipovima, što navode i drugi autori (Schmidt i sar., 2009). Beatty i saradnici (Beatty i sar., 2000) su prikazali verovatnoću pronalaženja davaoca kod populacija različitih rasa u odnosu na kriterijume tada važećih standarda i tipizacija zasnovanih na serološkim tehnikama. Dobili su da je za svakog bolesnika bilo koje rase moguće pronaći 4/6 HLA-A, -B, -DR podudarnog davaoca u Registru sa 10 000 davalaca. Sonnenberg i saradnici (Sonnenberg i sar., 1989) su procenjivali verovatnoću pronalaženja davaoca različite podudarnosti koristeći postojeće tabele učestalosti serološkim testovima definisanih haplotipova dva i tri lokusa na globalnom nivou. Izračunali su da je 43% verovatnoća da se pronađe HLA-A-B fenotipski identični davalac u Registru koji ima 3 miliona davalaca, a 60% je verovatnoća da se pronađe parcijalno podudaran davalac u Registru sa 100 000 davalaca. Schmidt i saradnici (Schmidt i sar., 2009) su na osnovu izračunatih mogućih haplotipova alela kod 8862 davalaca nemačkog registra uradili procenu pronalaženja davaoca različitog stepena podudarnosti u odnosu na bolesnika. Za pronalaženje davaoca podudarnog u alelima lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DRB1 dobili su da je verovatnoća 67,8% u Registru sa milion davalaca, a 85,9% u registru sa 7 miliona davalaca.

Za transplantaciju MČH na raspolaganju su i jedinice umbilikalne krvi iz nacionalnih banaka, koje su takođe dostupne u bazi podataka Svetskog registra (Foeken i sar., 2010; Welte i sar., 2010). Zbog toga, dobijeni podaci o učestalosti haplotipova u našoj populaciji, mogu doprineti i u proceni potrebnog broja jedinica umbilikalne krvi za nacionalnu banku umbilikalne krvi, što navode i drugi autori (Querol i sar., 2009; Haimila i sar., 2013). Tako na primer, Querol i saradnici (Querol i sar., 2009) su procenili da je 50 000 jedinica umbilikalne krvi optimalno za nacionalnu banku u Velikoj Britaniji da bi se za 80% bolesnika pronašla najmanje jedna 5/6 podudarna jedinica umbilikalne krvi, odnosno za 98% bolesnika 4/6 podudarna jedinica umbilikalne krvi. Haimila i saradnici (Haimila i sar., 2013) su izračunali da je oko 1700 jedinica umbilikalne krvi potrebno da bi se obezbedilo pronalaženje 5/6 HLA podudarnog davaoca za 80% bolesnika u Finskoj. S obzirom na to da je prema važećim standardima (Petersdorf, 2008) za izbor jedinice umbilikalne krvi dovoljna podudarnost 5/6 i 4/6, s tim što podudarnost za lokus HLA-DRB1 mora biti na nivou alela, dobijeni podaci o učestalosti haplotipova HLA-A-B-DRB1 i učestalosti alela za lokus HLA-DRB1 u se mogu

koristiti za ekonomski racionalno planiranje broja jedinica umbilikalne krvi u nacionalnoj banci.

Veličina Registra nije jedini parametar koji će ukazivati na efikasnost pronalaženja odgovarajućeg davaoca (Lown i Shaw, 2013). Savremene strategije razvoja Registara su usmerene na regrutovanje mlađih davalaca muškog pola (Schmidt i sar., 2009), kao i na aktivnosti koje omogućavaju uključivanje manjinskih populacija sa ciljem da se poveća raznolikost dostupnih haplotipova (Muller i sar., 2003; Schmidt i sar., 2009).

Prema izveštaju za 2012. godinu (BMDW, 2012), u bazi podataka Svetskog registra sa 20226863 davalaca je bilo 1506491 različitih fenotipova, od toga 47% fenotipova se pojavljuju samo jednom. Takođe, tokom 2012. godine, jedan od 15 novo prijavljenih davalaca je bio sa novim HLA-A-B-DR fenotipom. Postoje velike razlike između zemalja u prijavljivanju novih fenotipova u bazu podataka BMDW. Najviše novih fenotipova u 2012. godini je bilo iz Južne Afrike i Kine (sa po više od 10% novih fenotipova), a najmanje iz Irske, Litvanije i Norveške (po oko 2%). Među 1838 prijavljenih davalaca iz Srbije, nije bilo fenotipova HLA-A-B-DR koji već nisu bili prisutni u bazi podataka BMDR. To ima praktičan značaj, jer za pacijente iz zemalja u kojima nema novih fenotipova postoji veća verovatnoća da se pronađe podudaran davalac. Međutim, treba uzeti u obzir da su savremeni kriterijumi za izbor nesrodnog davaoca zasnovani na definisanju alela testovima visoke rezolucije za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1, a da je podudarnost u svih pet lokusa (10/10 podudarnost) udružena sa manjom incidencom i težinom komplikacija posle transplantacije i ukupnim preživljavanjem bolesnika.

Današnje strategije regrutovanja novih davalaca su usmerene na manjinske populacije da bi se dobila veća haplotipska raznovrsnost. U grupi ispitanika iz RDKS nije dokazana statistički značajna razlika učestalosti grupa alela između ispitanika različitih regiona Srbije (Andric i sar., 2014), s tim što manjinske populacije čine 11,7% (233/1992) ispitanika. Od toga 2,91% (58/1992) ispitanika se izjasnilo da su Mađari, a manje od 1% čine populacije drugih nacionalnih pripadnosti.

Za skraćivanje vremena traženja davaoca značajan je i nivo rezolucije tipizacije davalaca, a na to utiču i ekonomske mogućnosti Registara. Tipizacija svih lokusa

relevantnih za ishod transplantacije, kao i informativnost na nivou alela se pokazala kao efikasan pristup u strategiji tipiziranja u Registrima sa velikim brojem davalaca (Tu i sar., 2013). Takođe, glavni Registar Engleske (The Anthony Nolan Trust) je 2011. godine ciljano regrutovao 10 000 davalaca muškog pola kojima je urađena tipizacija visoke rezolucije za svih pet lokusa (Lown i Shaw, 2013). U našoj studiji je kod 112 ispitanika, kojima su prethodno definisane grupe alela, urađena tipizacija HLA testovima visoke rezolucije za svih pet lokusa. Jedini kriterijum za izbor ove grupe ispitanika je bio da su starosti do 35 godina u vreme ispitivanja. U ispitivanoj grupi osobe muškog pola čine 62,9% ispitanika, a 54,07% (1077/1992) ispitanika je bilo mlađe od 36 godina. Prema standardima WMDA (WMDA, 2012), zdrava osoba prijavljena u Registar može davati MČH do uzrasta od 60 godina. Tipizacija najmlađih potencijalnih davalaca koji su se prijavili u RDKS predstavlja osnov za unapređenje efikasnosti RDKS, što će omogućiti pronalaženje odgovarajućeg davaoca za sve veći broj bolesnika u našoj populaciji.

Furst i saradnici (Furst i sar., 2013) su retrospektivnom analizom kod 2646 nemačkih bolesnika pokazali da na ishod transplantacije negativno utiče i nepostojanje davaoca u nacionalnom registru, odnosno da bolesnici transplantirani od davaoca iz nacionalnog registra imaju bolje preživljavanje od bolesnika koji su dobili MČH od internacionalnog davaoca. Na to utiče brzina pronalaženja davaoca, odnosno pravovremena transplantacija. Takođe, autori navode da razlike drugih imunološki relevantnih lokusa na hromozomu 6, kao i non-HLA polimorfizam, koji mogu uticati na ishod transplantacije, mogu biti mnogo češći kod bolesnika sa retkim fenotipovima i ukoliko je davalac drugačijeg etničkog porekla nego bolesnik.

Dobijeni procenjeni broj davalaca i dobijene učestalosti alela, kao i ranije prikazane učestalosti haplotipova u različitim regionima Srbije (Andric i sar., 2014) doprinose donošenju strategije u planiranju aktivnosti prijavljivanja novih davalaca u RDKS.

1. Na osnovu učestalosti grupa alela za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u populaciji Srbije, ustanovljeno je da 46 od 58 grupa alela (79,3%) HLA klase I i 17 od 18 grupa alela (94,4%) HLA klase II ima učestalost veću od 1%.
2. Grupe alela koje imaju učestalost veću od 10% su A*02, A*01, A*03 i A*24; B*35 i B*51; C*07, C*04, C*12 i C*06; DRB1*11, DRB1*13, DRB1*03, DRB1*16 i DRB1*01; DQB1*03, DQB1*05, DQB1*02 i DQB1*06.
3. Značajno udruživanje grupa alela ($D' \geq 0,05$) dva lokusa među haplotipovima koji imaju učestalost veću od 1% je dobijeno za 38,5% haplotipova HLA-A-B, 34,6% haplotipova HLA-A-DRB1, 62,1% haplotipova HLA-B-DRB1, 89,3% haplotipova HLA-B-C i 76,9% haplotipova HLA-DRB1-DQB1.
4. Najčešći haplotipovi grupa alela koje čine lokusi HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 su A*01-B*08-DRB1*03, A*02-B*18-DRB1*11 i A*33-B*14-DRB1*01.
5. Najučestaliji haplotipovi grupe alela svih pet lokusa su A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02, A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03, A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05 i A*02-B*35-C*04-DRB1*16-DQB1*05.
6. Aleli klase I HLA koji imaju učestalost veću od 5% u populaciji Srbije su A*02:01, A*01:01, A*11:01, A*03:01 i A*24:02 za lokus HLA-A; B*51:01, B*18:01, B*35:01, B*08:01 i B*35:03 za lokus HLA-B; C*04:01, C*07:01, C*12:03, C*06:02, C*01:02 i C*02:02 za lokus HLA-C. Aleli klase II HLA koji imaju učestalost veću od 5% su DRB1*03:01, DRB1*16:01, DRB1*01:01, DRB1*13:02, DRB1*07:01, DRB1*11:01, DRB1*15:01, DRB1*11:04 i DRB1*14:54 za lokus HLA-DRB1; DQB1*03:01, DQB1*05:01, DQB1*05:02, DQB1*02:01, DQB1*03:02, DQB1*05:03 i DQB1*06:04 za lokus HLA-DQB1.
7. Najveći polimorfizam je dokazan za grupu alela HLA-DRB1*04 (DRB1*04:01, DRB1*04:02, DRB1*04:03, DRB1*04:04, DRB1*04:05 i DRB1*04:06), zatim HLA-A*02 (A*02:01, A*02:02, A*02:05, A*02:17, A*02:25) i HLA-DQB1*06

(DQB1*06:01, DQB1*06:02, DQB1*06:03, DQB1*06:04, DQB1*06:09), HLA-C*07 (C*07:01, C*07:02, C*07:04, C*07:06), HLA-DQB1*03 (DQB1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*03:03, DQB1*03:04) i HLA-DQB1*05 (DQB1*05:01, DQB1*05:02, DQB1*05:03, DQB1*05:04), HLA-A*30 (A*30:01, A*30:02, A*30:04), HLA-B*27 (B*27:02, B*27:05, B*27:09), HLA-B*44 (B*44:02, B*44:03, B*44:05), HLA-C*03 (C*03:02, C*03:03, C*03:04), HLA-DRB1*11 (DRB1*11:01, DRB1*11:03, DRB1*11:04) i HLA-DRB*13 (DRB1*13:01, DRB1*13:02, DRB1*13:03).

8. Aleli sa učestalošću većom od 5% koji su ujedno i jedini dokazani aleli u pripadajućoj grupi alela su A*01:01, A*03:01, A*11:01, B*51:01, B*08:01, C*01:02, C*02:02, C*04:01, C*06:02, DRB1*03:01, DRB1*16:01 i HLA-DRB1*07:01, dok sve grupe alela lokusa HLA-DQB1 sa učestalošću većom od 5% imaju više od jednog alela.
9. Haplotipovi sa učestalošću većom od 1% koji imaju najveću neravnotežu udruživanja alela ($D'=1$) su HLA-DRB1*03:01-DQB1*02:01, HLA-B*52:01-C*12:02, HLA-DRB1*15:02-DQB1*06:01 i HLA-B*41:02-C*17:03.
10. Najučestaliji haplotipovi pet lokusa u populaciji Srbije su A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01, koji je prisutan kao najučestaliji haplotip i u drugim evropskim populacijama i A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01 koji je karakterističan za mediteransku grupu populacija.
11. Populacija Srbije ima najveći stepen genetske sličnosti sa susednim populacijama, kao i populacijama koje žive na području centralnog Balkana, a potvrđena je veća genetska distanca u odnosu na populacije Zapadne Evrope.
12. Verovatnoća pronalazjenja nacionalnog davaoca podudarnog u HLA-A-B-DRB1 je 65% ukoliko bi Registar davalaca kostne srži Srbije imao 100 000 tipiziranih davalaca, a 90% ukoliko bi u Registru davalaca kostne srži Srbije bilo milion davalaca.

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, 2010. Cellular and molecular Immunology, 6th Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
2. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, 2007. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 69, 545-556. [[PubMed](#)]
3. Alcoceba M, Marin L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Chillon MC, Martin-Jimenez P, Puig N, Santamaria C, Corral R, Garcia-Sanz R, San Miguel JF, Gonzalez M, 2011. Frequency of HLA-A, -B and -DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y Leon (northwest-central Spain). *Tissue Antigens* 78, 249-255. [[PubMed](#)]
4. Amiel JL, 1967. Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease., In: Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., Tosi, R.M. (Eds.) *Histocompatibility testing 1967*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 79–81.
5. Andric Z, Popadic D, Jovanovic B, Jaglicic I, Bojic S, Simonovic R, 2014. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. *Hum Immunol* 75, 218-226. [[PubMed](#)]
6. Andric Z, Simonovic R, Dukic T, 2007. HLA alleles in Serbian population. *Tissue Antigens* 69, 425(P-056).
7. Andrić Z, 2012. Uloga transfuziološke službe u radu Registra davalaca kostne srži Srbije. *Bilt Transf* 58, 58-62.
8. Andrić Z, Simonović R, Dukić T, 2008. Učestalost alela lokusa C sistema humanih leukocitnih antigena kod 125 osoba prijavljenih u Registar davalaca kostne srži Srbije. *Bilt Transf* 54, 11-15.
9. Arnaiz-Villena A, Dimitroski K, Pacho A, Moscoso J, Gomez-Casado E, Silvera-Redondo C, Varela P, Blagoevska M, Zdravkovska V, Martinez-Laso J, 2001. HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of the Greeks. *Tissue Antigens* 57, 118-127. [[PubMed](#)]
10. Arnaiz-Villena A, Karin M, Bendikuze N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C, Oguz FS, Sarper Diler A, De Pacho A, Allende L, Guillen J, Martinez Laso J, 2001. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 57, 308-317. [[PubMed](#)]
11. Arnaiz-Villena A, Reguera R, Ferri A, Barbolla L, Abd-El-Fatah-Khalil S, Bakhtiyarova N, Millan P, Moscoso J, Mafalda A, Serrano-Vela JI, 2009. The peopling of Madeira Archipelago (Portugal) according to HLA genes. *Int J Immunogenet* 36, 9-14. [[PubMed](#)]
12. Arrieta-Bolanos E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott MA, Fowles F, Shah A, Orlich-Perez P, McWhinnie AJ, Alfaro-Bourrouet W, Bujan-Boza W, Little AM, Salazar-Sanchez L, Madrigal JA, 2011. 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* 72, 80-86. [[PubMed](#)]
13. Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Labonne MP, Gebuhrer L, 2004. HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Tissue Antigens* 64, 520-532. [[PubMed](#)]

14. Bach F, Hirschhorn K, 1964. Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test in Vitro. *Science* 143, 813-814. [PubMed]
15. Barrett JH, Thomson W, Ollier W, 2000. HLA and disease association: statistical consideration, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 410-415.
16. Baxter-Lowe LA, Maiers M, Spellman SR, Haagenson MD, Wang T, Fernandez-Vina M, Marsh SG, Horowitz M, Hurley CK, 2009. HLA-A disparities illustrate challenges for ranking the impact of HLA mismatches on bone marrow transplant outcomes in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 971-981. [PubMed]
17. Beatty PG, Boucher KM, Mori M, Milford EL, 2000. Probability of finding HLA-mismatched related or unrelated marrow or cord blood donors. *Hum Immunol* 61, 834-840. [PubMed]
18. Berka N, Gill JM, Liacini A, O'Bryan T, Khan FM, 2012. Human leukocyte antigen (HLA) and pharmacogenetics: screening for HLA-B*57:01 among human immunodeficiency virus-positive patients from southern Alberta. *Hum Immunol* 73, 164-167. [PubMed]
19. Bettens F, Schanz U, Tiercy JM, 2013. Lack of recognition of HLA class I mismatches outside alpha1/alpha2 domains by CD8+ alloreactive T lymphocytes: the HLA-B44 paradigm. *Tissue Antigens* 81, 414-418. [PubMed]
20. BMDW 2012. Bone Marrow Donors Worldwide - Annual Report 2012. (www.bmdw.org).
21. Bodmer JG, 2000. HLA nomenclature, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 40-44.
22. Bodmer WF, 2000. HLA polymorphism: origin and maintenance, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 1-9.
23. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J, Bonorino C, 2012. 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* 73, 180-185. [PubMed]
24. Brand A, Doxiadis IN, Roelen DL, 2013. On the role of HLA antibodies in hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 81, 1-11. [PubMed]
25. Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, Woolfrey A, Muller C, Spellman S, Setterholm M, Confer DL, 2008. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 45-53. [PubMed]
26. Buhler S, Megarbane A, Lefranc G, Tiercy JM, Sanchez-Mazas A, 2006. HLA-C molecular characterization of a Lebanese population and genetic structure of 39 populations from Europe to India-Pakistan. *Tissue Antigens* 68, 44-57. [PubMed]
27. Bunce M, 2000. PCR-SSP typing, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 149-186.
28. Caillat-Zucman S, 2009. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 73, 1-8. [PubMed]
29. Carrington M, 1999. Recombination within the human MHC. *Immunol Rev* 167, 245-256. [PubMed]

30. Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggianno C, Scudeller G, Serra A, 1967. Genetics of leukocyte antigens: a family study of segregation and linkage. , In: Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., Tosi, R.M. (Eds.) *Histocompatibility Testing 1967*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 149-187.
31. Ciurea SO, Champlin RE, 2013. Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, 180-184. [[PubMed](#)]
32. Crespi C, Mila J, Martinez-Pomar N, Etxagibel A, Munoz-Saa I, Priego D, Luque A, Pons J, Picornell A, Ramon M, Castro JA, Matamoros N, 2002. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 60, 282-291. [[PubMed](#)]
33. Dausset J, 1958. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 20, 156-166. [[PubMed](#)]
34. Dehn J, Arora M, Spellman S, Setterholm M, Horowitz M, Confer D, Weisdorf D, 2008. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: factors associated with a better HLA match. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 1334-1340. [[PubMed](#)]
35. Dray S, Dufour AB, 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22, 1-20.
36. Dunne C, Crowley J, Hagan R, Rooney G, Lawlor E, 2008. HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 and DPB1 alleles and haplotypes in the genetically homogenous Irish population. *Int J Immunogenet* 35, 295-302. [[PubMed](#)]
37. Dupont B, Hsu KC, 2004. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 16, 634-643. [[PubMed](#)]
38. Eberhard HP, Feldmann U, Bochtler W, Baier D, Rutt C, Schmidt AH, Muller CR, 2010. Estimating unbiased haplotype frequencies from stem cell donor samples typed at heterogeneous resolutions: a practical study based on over 1 million German donors. *Tissue Antigens* 76, 352-361. [[PubMed](#)]
39. Eberhard HP, Madbouly AS, Gourraud PA, Balere ML, Feldmann U, Gragert L, Torres HM, Pingel J, Schmidt AH, Steiner D, van der Zanden HG, Oudshoorn M, Marsh SG, Maiers M, Muller CR, 2013. Comparative validation of computer programs for haplotype frequency estimation from donor registry data. *Tissue Antigens* 82, 93-105. [[PubMed](#)]
40. EFI 2012. Standards for histocompatibility testing, Version 5.7 Effective from 1st Oct 2012 (www.efiweb.eu European Federation for Immunogenetics).
41. Elsner HA, Blasczyk R, 2004. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 64, 687-695. [[PubMed](#)]
42. Erlich H, 2012. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 80, 1-11. [[PubMed](#)]
43. Erlich HA, Opelz G, Hansen J, 2001. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 14, 347-356. [[PubMed](#)]
44. Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47-50. [[PubMed](#)]

45. Fernandez-Vina MA, Klein JP, Haagenson M, Spellman SR, Anasetti C, Noreen H, Baxter-Lowe LA, Cano P, Flomenberg N, Confer DL, Horowitz MM, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Setterholm M, Champlin R, Lee SJ, de Lima M, 2013. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121, 4603-4610. [[PubMed](#)]
46. Fernandez Vina M, Heslop HE, Barker JN, 2013. New approaches in alternative donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, S91-96. [[PubMed](#)]
47. Fernandez Vina MA, Hollenbach JA, Lyke KE, Sztejn MB, Maiers M, Klitz W, Cano P, Mack S, Single R, Brautbar C, Israel S, Raimondi E, Khoriaty E, Inati A, Andreani M, Testi M, Moraes ME, Thomson G, Stastny P, Cao K, 2012. Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 820-829. [[PubMed](#)]
48. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD, 2008. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 4, e1000024. [[PubMed](#)]
49. Fischer JC, Kobbe G, Enczmann J, Haas R, Uhrberg M, 2012. The impact of HLA-C matching depends on the C1/C2 KIR ligand status in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics* 64, 879-885. [[PubMed](#)]
50. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, Spellman S, Velardi A, Zino E, Petersdorf EW, International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell T, 2012. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol* 13, 366-374. [[PubMed](#)]
51. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D, 2004. 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* 104, 1923-1930. [[PubMed](#)]
52. Foeken LM, Green A, Hurley CK, Marry E, Wiegand T, Oudshoorn M, Donor Registries Working Group of the World Marrow Donor A, 2010. Monitoring the international use of unrelated donors for transplantation: the WMDA annual reports. *Bone Marrow Transplant* 45, 811-818. [[PubMed](#)]
53. Furst D, Muller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J, 2013. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood* 122, 3220-3229. [[PubMed](#)]
54. Gebel HM, Pollack MS, Bray RA, 2011. The HLA System, In: Roback, J.D., Grossman, B.J., Harris, T., Hillyer, C.D. (Eds.) *Technical Manual*. American Association of Blood Banks, Bethesda.

55. Gluckman E, 2012. 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 pp. 91-107.
56. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR, 2011. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 39, D913-919. [[PubMed](#)]
57. Gourraud PA, Barnette T, Vidan-Jeras B, Cambon-Thomsen A, 2005. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transpl Immunol* 14, 245-253. [[PubMed](#)]
58. Gratwohl A, Baldomero H, Sureda A, 2012. 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 pp. 302-315.
59. Grubic Z, Stingl K, Zunec R, 2012. Heterogeneity of HLA-DRB1*04 alleles and haplotypes in the Croatian population. *Tissue Antigens* 80, 219-223. [[PubMed](#)]
60. Grubic Z, Zunec R, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Kastelan A, 2000. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 27, 47-51. [[PubMed](#)]
61. Guo SW, Thompson EA, 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372. [[PubMed](#)]
62. Haimila K, Penttila A, Arvola A, Auvinen MK, Korhonen M, 2013. Analysis of the adequate size of a cord blood bank and comparison of HLA haplotype distributions between four populations. *Hum Immunol* 74, 189-195. [[PubMed](#)]
63. Haimila K, Perasaari J, Linjama T, Koskela S, Saarinen T, Lauronen J, Auvinen MK, Jaatinen T, 2013. HLA antigen, allele and haplotype frequencies and their use in virtual panel reactive antigen calculations in the Finnish population. *Tissue Antigens* 81, 35-43. [[PubMed](#)]
64. Harbo HF, Riccio ME, Lorentzen AR, Utsi E, Myhr KM, Mellgren SI, Flam ST, Thorsby E, Sanchez-Mazas A, Lie BA, 2010. Norwegian Sami differs significantly from other Norwegians according to their HLA profile. *Tissue Antigens* 75, 207-217. [[PubMed](#)]
65. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, Setterholm M, Maiers M, 2009. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 73, 95-170. [[PubMed](#)]
66. Horowitz M, 2009. How important is high resolution typing for unrelated allogeneic transplantation? How far do we go? *Best Pract Res Clin Haematol* 22, 537-541.
67. Hosseini E, Schwarzer AP, Jalali A, Ghasemzadeh M, 2013. The impact of HLA-E polymorphisms on relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res* 37, 516-519. [[PubMed](#)]
68. Howell WM, 2014. HLA and disease: guilt by association. *Int J Immunogenet* 41, 1-12. [[PubMed](#)]
69. Hurley CK, Maiers M, Marsh SG, Oudshoorn M, 2007. Overview of registries, HLA typing and diversity, and search algorithms. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1, 3-5. [[PubMed](#)]

70. Hurley CK, Raffoux C, World Marrow Donor A, 2004. World Marrow Donor Association: international standards for unrelated hematopoietic stem cell donor registries. *Bone Marrow Transplant* 34, 103-110. [[PubMed](#)]
71. Hurley CK, Setterholm M, Lau M, Pollack MS, Noreen H, Howard A, Fernandez-Vina M, Kukuruga D, Muller CR, Venance M, Wade JA, Oudshoorn M, Raffoux C, Enczmann J, Wernet P, Maiers M, 2004. Hematopoietic stem cell donor registry strategies for assigning search determinants and matching relationships. *Bone Marrow Transplant* 33, 443-450. [[PubMed](#)]
72. Hviid TV, Hyleneius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB, 2002. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 60, 122-132. [[PubMed](#)]
73. Ivanova M, Rozemuller E, Tyufekchiev N, Michailova A, Tilanus M, Naumova E, 2002. HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations. *Tissue Antigens* 60, 496-504. [[PubMed](#)]
74. Ivanova M, Spassova P, Michailova A, Naumova E, 2001. Distributions of HLA class I alleles and haplotypes in Bulgarians--contribution to understanding the origin of the population. *Tissue Antigens* 57, 208-215. [[PubMed](#)]
75. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T, Japan Marrow Donor P, 2007. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* 110, 2235-2241. [[PubMed](#)]
76. Klein J, Sato A, 2000. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343, 702-709. [[PubMed](#)]
77. Klitz W, Gragert L, Maiers M, Tu B, Lazaro A, Yang R, Xu Q, Masaberg C, Ng J, Hurley CK, 2009. Four-locus high-resolution HLA typing in a sample of Mexican Americans. *Tissue Antigens* 74, 508-513. [[PubMed](#)]
78. Kollman C, Maiers M, Gragert L, Muller C, Setterholm M, Oudshoorn M, Hurley CK, 2007. Estimation of HLA-A, -B, -DRB1 haplotype frequencies using mixed resolution data from a National Registry with selective retyping of volunteers. *Hum Immunol* 68, 950-958. [[PubMed](#)]
79. Kosmoliaptsis V, Dafforn TR, Chaudhry AN, Halsall DJ, Bradley JA, Taylor CJ, 2011. High-resolution, three-dimensional modeling of human leukocyte antigen class I structure and surface electrostatic potential reveals the molecular basis for alloantibody binding epitopes. *Hum Immunol* 72, 1049-1059. [[PubMed](#)]
80. Lazaro AM, Xiao Y, Cao K, Masaberg C, Nichol L, Ng J, Hurley CK, Posch PE, 2008. Twenty-three novel alleles increase diversity at the HLA-C locus. *Tissue Antigens* 71, 560-563. [[PubMed](#)]
81. Lebedeva TV, Ohashi M, Huang A, Vasconcellos S, Flesch S, Yu N, 2005. Emerging new alleles suggest high diversity of HLA-C locus. *Tissue Antigens* 65, 101-106. [[PubMed](#)]

82. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C, 2007. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 110, 4576-4583. [[PubMed](#)]
83. Leffell MS, Cherikh WS, Land G, Zachary AA, 2007. Improved definition of human leukocyte antigen frequencies among minorities and applicability to estimates of transplant compatibility. *Transplantation* 83, 964-972. [[PubMed](#)]
84. Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Heron S, Rogers M, Slavich L, Walker R, Hsiao T, McLaughlin L, D'Arcy M, Gai X, Goodridge D, Sayer D, Monos D, 2010. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Hum Immunol* 71, 1033-1042. [[PubMed](#)]
85. Lown RN, Shaw BE, 2013. Beating the odds: factors implicated in the speed and availability of unrelated haematopoietic cell donor provision. *Bone Marrow Transplant* 48, 210-219. [[PubMed](#)]
86. Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, He J, Hurley CK, Middleton D, Moraes ME, Pereira SE, Kempenich JH, Reed EF, Setterholm M, Smith AG, Tilanus MG, Torres M, Varney MD, Voorter CE, Fischer GF, Fleischhauer K, Goodridge D, Klitz W, Little AM, Maiers M, Marsh SG, Muller CR, Noreen H, Rozemuller EH, Sanchez-Mazas A, Senitzer D, Trachtenberg E, Fernandez-Vina M, 2013. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens* 81, 194-203. [[PubMed](#)]
87. Mack SJ, Tu B, Yang R, Masaberg C, Ng J, Hurley CK, 2011. Human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in Americans originating from southern Europe: contrasting patterns of population differentiation between Italian and Spanish Americans. *Hum Immunol* 72, 144-149. [[PubMed](#)]
88. Maiers M, Gragert L, Klitz W, 2007. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol* 68, 779-788. [[PubMed](#)]
89. Maiers M, Gragert L, Madbouly A, Steiner D, Marsh SG, Gourraud PA, Oudshoorn M, van der Zanden H, Schmidt AH, Pingel J, Hofmann J, Muller C, Eberhard HP, 2013. 16(th) IHIW: global analysis of registry HLA haplotypes from 20 million individuals: report from the IHIW Registry Diversity Group. *Int J Immunogenet* 40, 66-71. [[PubMed](#)]
90. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Muller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J, 2010. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 75, 291-455. [[PubMed](#)]
91. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Muller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J, 2010. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant* 45, 846-848. [[PubMed](#)]

92. Matevosyan L, Chattopadhyay S, Madelian V, Avagyan S, Nazaretyan M, Hyussian A, Vardapetyan E, Arutunyan R, Jordan F, 2011. HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 allele distribution in a large Armenian population sample. *Tissue Antigens* 78, 21-30. [PubMed]
93. Middleton D, 2000. PCR-SSOP typing, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 187-212.
94. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R, 2003. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens* 61, 403-407. [PubMed]
95. Moretta L, Moretta A, 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 16, 626-633. [PubMed]
96. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y, 2002. 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* 99, 4200-4206. [PubMed]
97. Muller CR, Ehninger G, Goldmann SF, 2003. Gene and haplotype frequencies for the loci hLA-A, hLA-B, and hLA-DR based on over 13,000 german blood donors. *Hum Immunol* 64, 137-151. [PubMed]
98. Muro M, Moya-Quiles MR, Marin L, Torio A, Vallejo C, Moraleda JM, Alvarez-Lopez MR, 2002. Report of recombinations between HLA loci within two families: utility of high resolution typing. *Clin Transplant* 16, 329-333. [PubMed]
99. Mytilineos J, Christ U, Lempert M, Opelz G, 1997. Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* 50, 395-400. [PubMed]
100. Nei M, 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106, 283-292. [PubMed]
101. Nelson KA, 2001. HLA typing, In: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Sheare, W.T., Kotzin, B.L., Schroeder, H.W. (Eds.) *Clinical Immunology - principle and practice*. Mosby International Limited, pp. 126,121-129.
102. Nowak J, Mika-Witkowska R, Polak M, Zajko M, Rogatko-Koros M, Graczyk-Pol E, Lange A, 2008. Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A, -C, -B, -DRB1 and -DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations. *Tissue Antigens* 71, 193-205. [PubMed]
103. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, Fischer G, Poulton K, Wacker K, Hurley CK, Noreen H, Sacchi N, Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working G, 2011. Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group. *Hum Immunol* 72, 1214-1216. [PubMed]
104. Olerup O, Zetterquist H, 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39, 225-235. [PubMed]

105. Oudshoorn M, Horn PA, Tilanus M, Yu N, 2007. Typing of potential and selected donors for transplant: methodology and resolution. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1, 10-12. [PubMed]
106. Pasi A, Crocchiolo R, Bontempelli M, Carcassi C, Carella G, Crespiatico L, Garbarino L, Mascaretti L, Mazzi B, Mazzola G, Miotti V, Porfirio B, Tagliaferri C, Valentini T, Vecchiato C, Fleischhauer K, Sacchi N, Bosi A, Martinetti M, 2011. The conundrum of HLA-DRB1*14:01/*14:54 and HLA-DRB3*02:01/*02:02 mismatches in unrelated hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46, 916-922. [PubMed]
107. Payne R, Rolfs MR, 1958. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 37, 1756-1763. [PubMed]
108. Pedron B, Yakouben K, Adjaoud D, Auvrignon A, Landman J, Guerin V, Leverger G, Vilmer E, Sterkers G, 2005. Listing of common HLA alleles and haplotypes based on the study of 356 families residing in the Paris, France, area: implications for unrelated hematopoietic stem cell donor selection. *Hum Immunol* 66, 721-731. [PubMed]
109. Petersdorf EW, 2008. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 20, 588-593. [PubMed]
110. Petersdorf EW, 2010. The World Marrow Donor Association: 20 years of international collaboration for the support of unrelated donor and cord blood hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 45, 807-810. [PubMed]
111. Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA, 2004. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 104, 2976-2980. [PubMed]
112. Petlichkovski A, Efinska-Mladenovska O, Trajkov D, Arsov T, Strezova A, Spiroski M, 2004. High-resolution typing of HLA-DRB1 locus in the Macedonian population. *Tissue Antigens* 64, 486-491. [PubMed]
113. Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH, 2013. 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* 74, 330-340. [PubMed]
114. Querol S, Mufti GJ, Marsh SG, Pagliuca A, Little AM, Shaw BE, Jeffery R, Garcia J, Goldman JM, Madrigal JA, 2009. Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? *Haematologica* 94, 536-541. [PubMed]
115. R Core Team 2013. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria <http://www.R-project.org>).
116. Ramos M, Lopez de Castro JA, 2002. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 60, 191-205. [PubMed]
117. Rao X, De Boer RJ, van Baarle D, Maiers M, Kesmir C, 2013. 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* 4, 374. [PubMed]

118. Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Curtioni ES, 1998. HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis. *Tissue Antigens* 52, 135-146. [PubMed]
119. Rendine S, Ferrero NM, Sacchi N, Costa C, Pollichieni S, Amoroso A, 2012. 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* 73, 399-404. [PubMed]
120. Republički zavod za statistiku, 2012. Popis stanovništva, domaćinstava i stanova 2011. u Republici Srbiji, In: Republički zavod za statistiku, Republika Srbija, Beograd
121. Riccio ME, Buhler S, Nunes JM, Vangenot C, Cuenod M, Currat M, Di D, Andreani M, Boldyreva M, Chambers G, Chernova M, Chiaroni J, Darke C, Di Cristofaro J, Dubois V, Dunn P, Edinur HA, Elamin N, Eliaou JF, Grubic Z, Jaatinen T, Kanga U, Kervaire B, Kolesar L, Kunachiwa W, Lokki ML, Mehra N, Nicoloso G, Paakkanen R, Voniatis DP, Papasteriades C, Poli F, Richard L, Romon Alonso I, Slavcev A, Sulcebe G, Suslova T, Testi M, Tiercy JM, Varnavidou A, Vidan-Jeras B, Wennerstrom A, Sanchez-Mazas A, 2013. 16(th) IHIW: analysis of HLA population data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). *Int J Immunogenet* 40, 21-30. [PubMed]
122. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG, 2013. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 41, D1222-1227. [PubMed]
123. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A, 2006. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev* 214, 202-218. [PubMed]
124. Ruiz TM, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graca Bicalho M, 2005. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Parana, Brazil. *Transplant Proc* 37, 2293-2296. [PubMed]
125. Sanchez-Mazas A, Nunes JM 2006. HLA data analysis in anthropology: basic theory and practice ([www.http://geneva.unige.ch/docs/Biostat_ASM_&_JMN_Oslo2006.pdf](http://geneva.unige.ch/docs/Biostat_ASM_&_JMN_Oslo2006.pdf), HLA-NET).
126. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, Buhler S, Buus S, Claas FH, Dormoy A, Dubois V, Eglite E, Eliaou JF, Gonzalez-Galarza F, Grubic Z, Ivanova M, Lie B, Ligeiro D, Lokki ML, da Silva BM, Martorell J, Mendonca D, Middleton D, Voniatis DP, Papasteriades C, Poli F, Riccio ME, Vlachou MS, Sulcebe G, Tonks S, Nevessignsky MT, Vangenot C, van Walraven AM, Tiercy JM, 2012. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet* 39, 459-472; quiz 473-456. [PubMed]
127. Scaradavou A, 2012. 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 Transplant* 18, 1773-1775. [PubMed]

128. Schaffer M, Olerup O, 2001. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens* 58, 299-307. [[PubMed](#)]
129. Schipper RF, D’Amaro J, 2000. Population genetics of the human major histocompatibility complex, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 395-415.
130. Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C, 2009. 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* 70, 895-902. [[PubMed](#)]
131. Schmidt AH, Sauter J, Pingel J, Ehninger G, 2014. Toward an optimal global stem cell donor recruitment strategy. *PLoS One* 9, e86605. [[PubMed](#)]
132. Schmidt AH, Solloch UV, Pingel J, Baier D, Bohme I, Dubicka K, Schumacher S, Rutt C, Skotnicki AB, Wachowiak J, Ehninger G, 2011. High-resolution human leukocyte antigen allele and haplotype frequencies of the Polish population based on 20,653 stem cell donors. *Hum Immunol* 72, 558-565. [[PubMed](#)]
133. Schreuder GM, 2000. HLA typing by alloantibodies and monoclonal antibodies, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 49-63.
134. Shaw BE, Ball L, Beksac M, Bengtsson M, Confer D, Diler S, Fechter M, Greinix H, Koh M, Lee S, Nicoloso-De-Faveri G, Philippe J, Pollichieni S, Pulsipher M, Schmidt A, Yang E, van Walraven AM, Clinical Working G, Ethics Working Group of the W, 2010. Donor safety: the role of the WMDA in ensuring the safety of volunteer unrelated donors: clinical and ethical considerations. *Bone Marrow Transplant* 45, 832-838. [[PubMed](#)]
135. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, Madrigal JA, Begovich AB, Horowitz MM, Gratwohl A, Ringden O, Marsh SG, Petersdorf EW, 2007. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 110, 4560-4566. [[PubMed](#)]
136. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK, 2009. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54, 15-39. [[PubMed](#)]
137. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H, 2012. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens* 80, 305-316. [[PubMed](#)]
138. Simonovic R, Paunovic D, Stolic I, Gligorovic V, 1993. Disequilibrium pattern analysis between A and B loci of the HLA system in Serbia. *Arch Biol Sci Belgrade* 45, 15-19.
139. Simonović R, 1992. Genetička varijabilnost i neslučajne asocijacije gena koji određuju proteine plazme, eritrocitne i histokompatibilne antigene kod stanovništva Srbije. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

140. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, Thomson G, 2008. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 69, 443-464. [[PubMed](#)]
141. Sonnenberg FA, Eckman MH, Pauker SG, 1989. Bone marrow donor registries: the relation between registry size and probability of finding complete and partial matches. *Blood* 74, 2569-2578. [[PubMed](#)]
142. Spellman S, Setterholm M, Maiers M, Noreen H, Oudshoorn M, Fernandez-Vina M, Petersdorf E, Bray R, Hartzman RJ, Ng J, Hurley CK, 2008. 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 Transplant* 14, 37-44. [[PubMed](#)]
143. Spellman SR, Eapen M, Logan BR, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm MI, Woolfrey AE, Horowitz MM, Confer DL, Hurley CK, National Marrow Donor P, Center for International B, Marrow Transplant R, 2012. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood* 120, 259-265. [[PubMed](#)]
144. Spinola H, Brehm A, Williams F, Jesus J, Middleton D, 2002. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. *Ann Hum Genet* 66, 285-296. [[PubMed](#)]
145. Spurgin LG, Richardson DS, 2010. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proc Biol Sci* 277, 979-988. [[PubMed](#)]
146. Sulcebe G, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM, Shyti E, Mone I, Ylli Z, Kardhashi V, 2009. HLA allele and haplotype frequencies in the Albanian population and their relationship with the other European populations. *Int J Immunogenet* 36, 337-343. [[PubMed](#)]
147. Sullivan LC, Hoare HL, McCluskey J, Rossjohn J, Brooks AG, 2006. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol* 27, 413-420. [[PubMed](#)]
148. Tait BD, 2000. HLA class I expression on human cancer cells. Implications for effective immunotherapy. *Hum Immunol* 61, 158-165. [[PubMed](#)]
149. Terasaki PI, McClelland JD, 1964. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* 204, 998-1000. [[PubMed](#)]
150. Thorsby E, 2009. A short history of HLA. *Tissue Antigens* 74, 101-116. [[PubMed](#)]
151. Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F, 1970. The HL-A system: evidence of a third sub-locus. *Scand J Haematol* 7, 195-200. [[PubMed](#)]
152. Tiercy JM, 2002. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 9, 173-180. [[PubMed](#)]
153. Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J, Schanz U, Seger R, Chalandon Y, Heim D, Gungor T, Schneider P, Schwabe R, Gratwohl A, 2007. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transplant* 40, 515-522. [[PubMed](#)]
154. Travers P, 2000. Immune recognition and the MHC, In: Bidwell, J.L., Navarrete, C. (Eds.) *Histocompatibility testing*. Imperial College Press, London, pp. 11-38.

155. Tu B, Cha N, Yang R, Ng J, Hurley CK, 2013. A one-step DNA sequencing strategy to HLA type hematopoietic stem cell donors at recruitment - rethinking typing strategies. *Tissue Antigens* 81, 150-160. [PubMed]
156. Tu B, Mack SJ, Lazaro A, Lancaster A, Thomson G, Cao K, Chen M, Ling G, Hartzman R, Ng J, Hurley CK, 2007. HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in an African American population. *Tissue Antigens* 69, 73-85. [PubMed]
157. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A, 1958. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181, 1735-1736. [PubMed]
158. van Rood JJ, Oudshoorn M, 2009. When selecting an HLA mismatched stem cell donor consider donor immune status. *Curr Opin Immunol* 21, 538-543. [PubMed]
159. Velardi A, 2013. Haplo-BMT: which approach? *Blood* 121, 719-720. [PubMed]
160. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewing JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC, 2012. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med* 367, 805-816. [PubMed]
161. Weisdorf D, Spellman S, Haagenson M, Horowitz M, Lee S, Anasetti C, Setterholm M, Drexler R, Maiers M, King R, Confer D, Klein J, 2008. Classification of HLA-matching for retrospective analysis of unrelated donor transplantation: revised definitions to predict survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 748-758. [PubMed]
162. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C, Cord Blood Working Group of the World Marrow Donor A, 2010. International exchange of cord blood units: the registry aspects. *Bone Marrow Transplant* 45, 825-831. [PubMed]
163. WMDA 2012. International Standards for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Registries (www.worldmarrow.org, World Marrow Donor Association).
164. Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, Gajewski J, Hale GA, Horan J, Battiwalla M, Marino SR, Setterholm M, Ringden O, Hurley C, Flomenberg N, Anasetti C, Fernandez-Vina M, Lee SJ, 2011. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17, 885-892. [PubMed]
165. Yang KL, Chen MJ, Lee SK, Lin CC, Tsai MJ, Chiu HM, Jiang S, Chao YC, Chen SP, Lin S, Shyr MH, Lin PY, 2009. New allele name of some HLA-DRB1*1401: HLA-DRB1*1454. *Int J Immunogenet* 36, 119-120. [PubMed]
166. Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S, Parodi AM, Sergeant R, Martinetti M, Bontadini A, Bonifazi F, Lisini D, Mazzi B, Rossini S, Servida P, Ciceri F, Bonini C, Lanino E, Bandini G, Locatelli F, Apperley J, Bacigalupo A, Ferrara GB, Bordignon C, Fleischhauer K, 2004. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood* 103, 1417-1424. [PubMed]
167. Albania:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2699
168. Argentina Buenos Aires pop 2:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2097

169. Australia West Caucasian:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1332
170. Austria:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2450
171. Azores:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2730
172. Bosnia and Herzegovina:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2758
173. Brazil Parana Caucasian:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1926
174. Bulgaria:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1314
175. Croatia pop 2:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2199
176. Czech Republic Gypsy pop 2:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2753
177. Czech Republic Kurd:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2754
178. England London Ashkenazi Jews:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2172
179. France Corsica Island:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2175
180. France Grenoble, Nantes and Rennes:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2429
181. France Southeast:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1517
182. Germany Essen:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1387
183. Greece Crete :
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1614
184. Greece North:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1565
185. Ireland Northern:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1243
186. Israel Jews pop 2:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1970
187. Italy:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1245
188. Macedonia pop 3 :
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1603
189. Macedonia pop 4 :
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1735
190. Madeira pop 3:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2731
191. Morocco pop 2:
http://www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2849

192. Norway pop 2:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2750
193. Norway Sami:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2749
194. Portugal Lisbon:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2722
195. Portugal Porto:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2724
196. Romania:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1544
197. Russia Moscow:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2841
198. Russia Northwest pop 3:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2860
199. Russia Samara Region:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2667
200. Russia South Ural Bashkir:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2845
201. Russia South Ural Tatar:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2846
202. Spain Ibiza:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1317
203. Spain Majorca:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1315
204. Spain Majorcans Jews:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1318
205. Spain Minorca:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1316
206. Spain Murcia:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1327
207. Turkey pop 2:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1611
208. Turkey pop 5:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1650
209. USA OPTN Caucasian:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2389
210. Wales:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=1571
211. Wales pop 2:
http://www.allelefrequencies.net/pop6001c.asp?pop_id=2847

Spisak skraćenica

APĆ	Antigen prezentujuće ćelije
BMDW	Svetski registar davalaca kostne srži
CDC	Mikrolimfocitotoksični test
CWD	Lista opštih i dobro dokumentovanih alela
D	Vrednost neravnoteže udruživanja alela
D'	Relativna vrednost neravnoteže udruživanja alela
DA	Genetska distanca
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
HLA	Humani leukocitni antigeni
HWE	Hardy–Weinbergova ravnoteža
KIR	Receptori na ćelijama ubicama
LD	Neravnoteža udruživanja
MĆH	Matične ćelije hematopoeze
MHC	Kompleks glavnih gena tkivne podudarnosti
MLE	Procena verodostojnosti pojavljivanja haplotipova
NIMA	Nenasleđeni majčini antigeni
PCR	Reakcija lančanog umnožavanja DNK
RDKS	Registar davalaca kostne srži Srbije
SBT	Sekvenciranje nukleotida
SSO	Oligonukleotidne probe specifične za sekvencu
SSP	Prajmeri specifični za sekvencu
WMDA	<i>engl.</i> World Marrow Donor Association

BIOGRAFIJA

Dr Zorana Andrić, rođena je 07.10.1965. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1984. godine, a diplomirala 1990. godine. sa prosečnom ocenom 8.64. Magisterijum iz oblasti transfuziologije upisala je 1998. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i zvanje magistra medicinskih nauka stekla u junu 2000. godine, odbranom magistarskog rada pod nazivom: "Uticaj kriokonzervacije na eritrocite za imunoserološka testiranja". Specijalizaciju iz transfuziologije započela je 1992. godine u Institutu za transfuziologiju Vojnomedicinske akademije, a zvanje specijaliste transfuziologije stekla juna meseca 1995. godine položivši specijalistički ispit sa odličnom ocenom. Od 1996. god. zaposlena je u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Godine 2003. izabrana je u zvanje Istraživač saradnik, a 2005. u zvanje Primarijus. Od 2002. mentor je dela specijalističkog staža iz Transfuziologije na osnovu odluke Veća za posle diplomsku nastavu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2005. godine je koordinator Registra davalaca kostne srži Srbije u Institutu za transfuziju krvi Srbije, a od 2010. godine je šef Odseka za molekularnu tipizaciju Odeljenja za tipizaciju tkiva Instituta za transfuziju krvi Srbije. Autor je ili koautor u 34 publikacije objavljene u celini, 6 poglavlja u udžbenicima i monografijama i u oko 50 sažetaka štampanih u domaćim i međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana **Zorana Andrić**

broj upisa _____

Izjavljujem

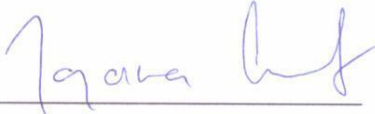
da je doktorska disertacija pod naslovom

Određivanje polimorfizma lokusa humanih leukocitnih antigena u populaciji potencijalnih davalaca matičnih ćelija hematopoeze u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 28.11. 2014. godine

Potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime **Zorana Andrić**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **Određivanje polimorfizma lokusa humanih leukocitnih antigena u populaciji potencijalnih davalaca matičnih ćelija hematopoeze u Srbiji**

Mentor **Prof. dr Dušan Popadić**

Potpisani **Dr Zorana Andrić**

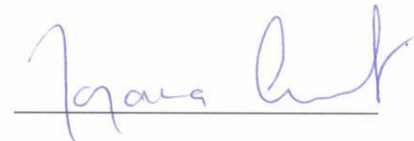
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.11. 2014. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Određivanje polimorfizma lokusa humanih leukocitnih antigena u populaciji potencijalnih davalaca matičnih ćelija hematopoeze u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.11. 2014. godine

