МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА НОВИ ИМУНОГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ПРОЦЕСИТЕ НА СТАРЕЕНЕ И АСОЦИИРАНИ НЕОПЛАЗИИ

Бушра Набил Ал Хадра

ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител: Проф. Милена Иванова Иванова-Шиварова, д.м.

София, 2021

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 1

ВЪВЕДЕНИЕ 3

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 7

I. HLA система 7

1. HLA клас I гени и молекули– структура и функции 8
2. HLA клас II гени и молекули – структура и функции 13
3. HLA полиморфизъм и номенклатура 14

II. Следващо поколение секвениране (NGS) като метод за детекция на полиморфизми при класическите и некласически HLA гени 19

III. HLA асоциация със заболявания 22

IV. Асоциация на HLA региона с дълголетие 24

V. Роля на HLA клас I свързаните MICA и MICB гени в имунния отговор - асоциация с възпалителни, автоимунни заболявания и рак 28

VI. Обобщение 34

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 37

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА 38

I. Материали 38

II. Методи 40

1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв 40
2. Методи за типизиране на класически и некласически HLA чрез NGS 41
3. Методи за определяне на серумни нива на разтворими MIC молекули 69

III. Статистически анализ 75

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 76

Въвеждане на нов метод за HLA генотипизиране с висока разграничителна способност (NGS) 76

Изследване на равновесието на Харди-Уайнбърг и глобалната неравновесна скаченост на изследваните класически и некласически HLA гени 84

КЛАСИЧЕСКИ HLA 87

I. Изследване на алелния полиморфизъм на класически HLA клас I и клас II гени при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация 87

II. Дву-локусни хаплотипи 92

III. Разгърнати хаплотипи 110

2. Разгърнати HLA-A-C-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация 111

НЕКЛАСИЧЕСКИ HLA ГЕНИ 116

Алелно и хаплотипно разпределение на некласическите HLA-E, -F, -G, -H гени при здрави, възрастни индивиди от българската популация 116

I. Изследване на HLA-E, -F, -G, -H полиморфизма на алелно ниво при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация 116

II. Дву-локусни хаплотипи, засягащи класическите HLA клас I , клас II локуси и некласическите HLA клас I гени 119

III. Разгърнат хаплотипен анализ обхващащ класическия HLA-A локус и некласическите HLA клас I (HLA-E, -F, -G, -H) гени 138

Изследване на MICA и MICB полиморфизма на алелно и хаплотипно ниво при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация 143

I. MICA, MICB алелен полиморфизъм при здрави дълголетници и млади индивиди от българската популация 143

II. Дву-локусни хаплотипи 148

III. Разгърнати MIC – класически HLA клас I и клас II хаплотипи при дълголетници и млади индивиди от българската популация 168

Изследване на полиморфизма на некласическите MHC клас I свързани (MIC) гени при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с две групи здрави индивиди от българската популация 182

MICA, MICB алелни честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с две изследвани групи здрави индивиди от българската популация 183

ОБОБЩЕНИЕ 195

ИЗВОДИ 200

БИБЛИОГРАФИЯ 201

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АК - Аминокиселина

АЧ – Алелна честота

ГНС - Глобална неравновесна скаченост

ДК - Дендритни клетки

РА - Ревматоиден артрит

СЗО - Световна здравна организация

СЛЕ - Системният лупус еритематозус

СпА - Спондилоартрит

СПИН - Синдром на придобита имунна недостатъчност

ТКР - Т клетъчен рецептор

ТМ - Трансмембранен домен

ХИВ - Човешки имуннодефицитен вирус

ХЧ - Хаплотипна честота

3' UTR - 3' untranslated region (3' нетранслиран регион)

АН - Ancestor haplotype (Наследствен хаплотип)

EBV - Epstein Barr Virus (Епщайн-Бар вирус)

hCMV - Human cytomegalovirus (Човешки цитомегаловирус)

HLA - Human Leukocyte Antigen (Човешки левкоцитни антиген)

HPV - Human papillomavirus (Човешки папилома вирус)

IMGT - International immunogenetics information system (Международна имуногенетична информационна система)

LD - Linkage disequilibrium (Неравновесна скаченост)

MHC - Major Histocompatibility Complex (Главен комплекс за тъканна съвместимост)

MICA/MICB - MHC class I chain-related gene A/B (MHC клас I свързани гени)

NGS – Next generation sequencing (Следващо поколение секвениране)

NK - Natural killers (Естествени клетки убийци)

NKG2D - NK receptor group 2 member D

NKT – Natural killer T cell (Т-клетки естествени убийци)

OCs - Open conformer (Отворена конформация)

OSCC – Oral squamous cell carcinoma (Орален спиноцелуларен карцином)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Полимеразна верижна реакция)

PCR-SBT - Sequence Based Typing

PCR-SSOP - Sequence Specific Oligonucleotide Probes

PCR-SSP - Sequence Specific Primers

sMICA – soluble MICA (разтворима MICA)

SNPs - Single nucleotide polymorphisms (Единични нуклеотидни полиморфизми)

STR - Short tandem repeats (Къси тандемни повтори)

Tregs – Regulatory T cells (Т регулаторни клетки)

ВЪВЕДЕНИЕ

Характерна особеност на съвременното общество е бързия темп на застаряване на населението в световен мащаб. Докато до преди век в резултат на инфекциозни заболявания с епидемичен характер, стотици хиляди души са умирали често в ранна и средна възраст, то в наши дни продължителността на живот е нараснала със средно 30 години, благодарение на откриването и разпространението на основните концепции в общественото здравеопазване - дезинфекция и стерилизация, и значителния напредък постигнат в областта на медицината и здравните грижи. По данни на Световната здравна организация (СЗО) до 2050г. се очаква броя на индивидите на възраст над 60 години да е 2 милиарда души или 22% от световното население, което е почти двойно в сравнение с техния брой през 2015г. – 900 милиона души (12.3%) (1). Първоначално тази демографска промяна в полза на възрастните индивиди се е наблюдавала само в добре развитите икономически страни като Япония. Днес прогнозите са, че до средата на века 80% от застаряващото население ще заселва ниско- и средно развитите икономически страни, което ще е важен проблем на тези общества от социално-икономическа гледна точка (1). В тази насока, през последните години се наблюдава голям международен интерес към така нареченото „здраво“ или още „успешно“ стареене, чиято основна концепция е удължаване продължителността на живот с поддържане оптимални физиологически и ментални функции във възрастните индивиди. Застаряващото поколение е висок рисков фактор за развитието на редица заболявания, което води до увеличено търсене на медицинска помощ и изисква по-добре подготвени медицински специалисти. Откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към развитието на хронични заболявания, ще допринесе за развитието на стратегии за превенцията на репликативното стареене. Изследванията в областта на стареенето са от изключително значение с цел изясняване на клетъчните и молекулярно-биологичните механизми, които се влошават в хода на стареенето и последващото прилагане на тези познания в клиничната практика.

Стареенето е многофакторен, вероятно полигенен процес, повлиян от екзогенни (околната среда, начин на живот), ендогенни фактори (генетичен фон, оксидативен стрес, клетъчен метаболизъм, възпаление) и епигенетични фактори (ДНК метилация, хистонова и хроматинова модификация) (фигура 1). Взаимодействието на тези фактори и отделните им прояви има различен ефект върху продължителността на живот.



Фигура 1. Фактори оказващи влияние върху процеса на стареене

Стареенето е многофакторен процес повлиян от екзогенни, ендогенни и епигенетични фактори. Изследването на генетичните и молекулярно-биологични механизми на процеса на стареене и идентифицирането на нови биомаркери ще доведе до развитието на стратегии, за поддържане на оптимални физиологични условия във възрастния организъм.

Фамилни проучвания предполагат, че до 30% от продължителността на живот е генетично обусловена (2,3). Кандидат гените, асоциирани с дълголетие най-общо попадат в следните групи: гени кодиращи възпалителни и имунни фактори; елементи на клетъчния стрес; медиатори на метаболизма; компоненти на ДНК репарацията и клетъчната пролиферация; митохондриални ДНК хаплогрупи (2). С напредване на възрастта се наблюдава прогресивно влошаване на функциите на редица органи и системи, в това число и на имунната система. Промените в имунологичните функции съпровождащи стареенето се изучават от едно сравнително ново направление в науката - имунологично стареене. В резултат на тези промени, имунната система губи способността си да реагира ефикасно на инфекции и ваксини, повишава се честотата на автоимунни и злокачествени заболявания, което води до по-високата степен на заболеваемост и смъртност при възрастните хора. Допълнително, възрастните индивиди се характеризират с хроничен, нискостепенен възпалителен статус, който се изразява в 2 до 4 пъти нарастване на серумните нива на възпалителните медиатори (цитокини и протеини на острата фаза) и се асоциира с няколко възрастово-асоциирани заболявания като атеросклероза, диабет тип 2 и неоплазии (4). Страничните ефекти на хроничното възпаление се акумулират бавно, като често водят до тежки увреждания на тъканите без никакви значими симптоми в продължение на години. Това е в съответствие с хипотезата за антагонистична плейотропия, предложена за пръв път през 1957г. от Джордж Уилямс, като в първите етапи на живота гените отговорни за

генериране на про-възпалителния статус са полезни, като осигуряват защита на организма срещу инфекции, а с напредването на възрастта същите гени се асоциират с лошите белези и изяви на стареенето. Това дава основание да се предположи, че някои от генетичните детерминанти на стареенето могат да са полиморфни гени кодиращи молекули, участващи в регулирането на имунния отговор.

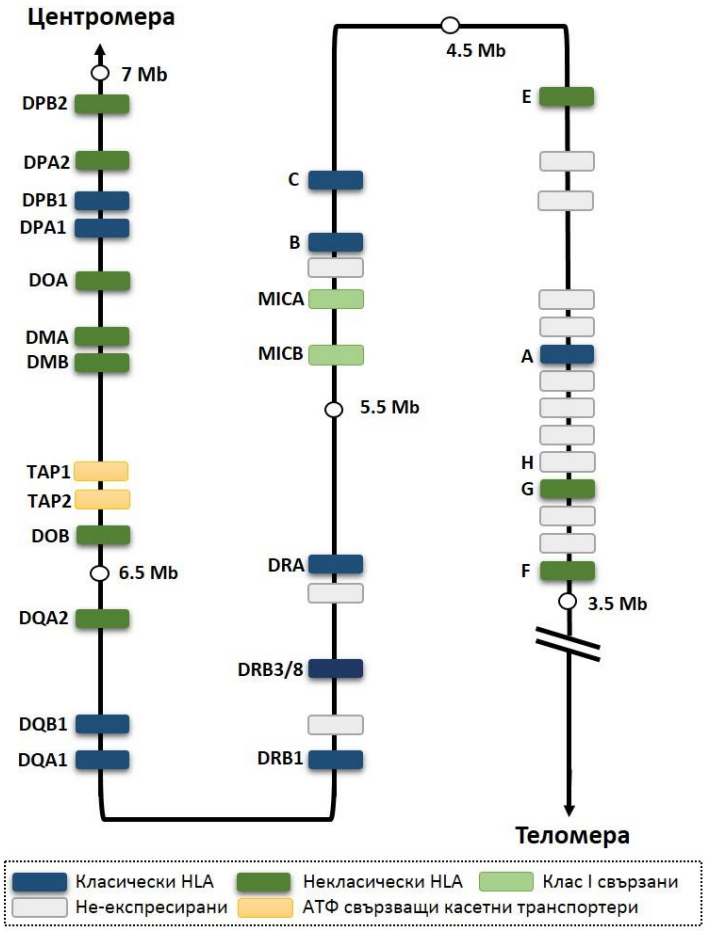
Във връзка с процесите на стареене са изследвани полиморфизми в цитокиновите гени, които корелират с различни нива на цитокинова експресия и по този начин модулират имунния отговор (5). Предполага се, че полиморфизми по-конкретно свързани с повишена продукция на анти-възпалителни цитокини са асоциирани с процесите на успешно стареене. Редица изследвания са фокусирани върху изследване взаимовръзката между дълголетието и най-полиморфната група гени в човешкия организъм – човешки левкоцитни антигени (Human leukocyte antigen - HLA) или още т.н. главен комплекс за тъканна съвместимост (Major histocompatibility complex - MHC), кодиращи молекули с главна роля в активирането на придобития имунен отговор. HLA разпределението е анализирано в редица популации по света, като получените противоречиви резултати сочат, че асоциацията на HLA с дълголетието е популационно специфична. Повечето от данните сочат за възможна асоциация на HLA клас II специфичностите с продължителността на живот, но категорични доказателства все още липсват. По-голяма част от проучванията са съсредоточени върху изучаване на класическите HLA клас I и клас II гени, докато ролята на т. нар. „некласически" HLA гени, към които се отнасят клас I свързаните MIC и некласическите HLA клас Ib (HLA-E, -F, -G, -H) гени, е все още непроучена. Тези гени се характеризират с по-ограничен полиморфизъм в сравнение с класическите HLA и играят ключова роля в процесите на имунорегулиране при физиологични и патологични условия. Изхождайки от значението на класическите и некласическите HLA молекули за индуциране на антиген-завиди и антиген-независим имунен отговор, осигурявайки различни механизми защита на организма, изследването на полиморфизма на тази група гени при клинично здрави възрастни индивиди от българската популация ще позволи откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към заболявания. Поради сложната генетична същност и организация на HLA региона обаче е необходимо използване на най-съвременните секвенционни технологии от следващо поколение (NGS), което ще позволи определянето на значително по-голям брой информативни маркери с по-добра чувствителност и разграничителна способност. Генетични изследвания на класическите

и некласическите HLA гени и извеждането на разширени имунологични профили, ще доведе до по-добро разбиране механизмите на „здраво стареене“, като тези познания могат да бъдат приложени в клиничната практика с цел развитието на терапии за поддържане на оптимални физиологични функции при възрастните индивиди.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

I. HLA система

Главния комплекс на тъканна съвместимост, известен още като MHC комплекс се намира върху късото рамо на шеста хромозома (6p21) и се състой от голям набор полиморфни и мултикопийни гени, чиито продукти играят важна роля не само за тъканната съвместимост, но и участват в имунния отговор, като осигуряват защита на организма срещу патогени и туморогенеза. През 1958г. чрез използването на серуми от многодетни жени са идентифицирани първите MHC продукти на повърхността на белите кръвни клетки (левкоцити) и по тази причина човешките MHC се наричат HLA (човешки левкоцитен антиген) (6). MHC генната фамилия се поделя на три класа: MHC клас I, MHC клас II и MHC клас III. MHC клас I (HLA-A, -B и –C) и клас II (HLA-DR, -DQ и –DP) гените, познати още като класически MHC (фигура 2), кодират антиген-представящи гликопротеини, които свързват къси пептиди и се разпознават съответно от CD8+ и CD4+ αβ T клетките (7). MHC клас III гените от своя страна, кодират разнообразна група от молекули, които изпълняват различни имунни функции (7). Съществува и набор от MHC гени кодиращи молекули, които са структурно сходни с класическите MHC клас I, но изпълняват малко по-различни имунологични функции – това са така наречените некласически HLA клас I гени, към които се отнасят HLA-E, -F, -G и -H гените (означавани още като HLA клас Ib) и MHC клас I свързаните гени (MHC class I chain-related gene A/B – MICA/MICB).



Фигура 2. Генетична организация на класически и некласически HLA гени

Изображението е адаптирано от Robinson J et all (2015) (8)

1. HLA клас I гени и молекули– структура и функции

1.1.Класически HLA клас I

HLA клас I региона се разполага от към теломерният край на MHC региона и се състой от голям набор от гени, които най-общо се подразделят на следните групи: 3 класически HLA гени (HLA - A, - B и - C) известни още като MHC клас Ia, некласическите HLA клас Ib гени (- E, -F, -G, -H), 2 клас I свързани гена (MICA и MICB), 12 клас I псевдогени и 5 клас I свързани псевдогени (MICC-MICG) (9,10). Тези HLA клас I гени са разпределени в три блока, познати съответно като алфа, бета и капа, а между блоковете се разположени не-HLA гени (11). Класическите HLA клас I гени се отличават със своята значителна степен на полиморфизъм, което вероятно се е развило в хода на еволюцията с цел разпознаване на възможно най-широк спектър антигенни специфичности. Некласическите клас I гени се отличават от класическите по своя ограничен полиморфизъм, ниска степен на експресия и не напълно изяснена функция

на кодираните от тях молекули (12). Класическите HLA клас I молекули представляват хетеродимери, транс-мембранни гликопротеини, изградени от една тежка верига – α верига, кодирана в рамките на HLA клас I региона и нековалентно свързан към нея β2 - микроглобулин (лека верига) кодиран от B2M ген разположен извън HLA комплекса (15та хромозома). Тежката, α верига се състой от три екстрацелуларни домена (α1, α2 и α3), трансмембранен (TM) домен и цитоплазмена опашка, кодирани от различни екзони (съответно екзони 2-7). α1 и α2 домените образуват антиген-свързващата ямка на HLA молекулата, поради което полиморфизмите са съсредоточени главно там, а α3 домена е нековалентно свързан с β2-леката верига (12). MHC клас I молекулите свързват пептиди с дължина 8 до 10 аминокиселинни (ак) остатъка (оптимално 9). Способността една MHC молекула да свързва голямо разнообразие от антигени се дължи на наличието на идентични или сходни ак остатъци на така наречените закотвящи (анхорни) позиции по дължината на пептида – 2ра и 3та позиция от към амино-края и 9та позиция от към карбоксилния край на молекулата. Останалата част от пептида намираща се между анхорните остатъци остава отдалечена от пода на ямката, образувайки структура подобна на арка, като по този начин пептиди с малко по-голяма/малка дължина също могат да бъдат захванати от антиген-представящата ямка. α3 домена се характеризира с относително консервативна АК последователност, като заедно с β2-микроглобулин имат сходна вторична структура с консервативните домени на имуноглобулиновите гени. По тази причина клас I молекулите се отнасят към имуноглобулиновата суперфамилия. HLA клас I молекулите се експресират на повърхността на почти всички ядрени клетки, като основната им функция е да представят ендогенни пептиди (собствени и чужди) на Т клетъчния рецептор (TKP) експресиран на повърхността на цитотоксичните CD8+ Т клетки. Т клетките не могат да разпознават антигени протеини, свободно намиращи се в пространството, а само такива представени от MHC молекули – механизъм известен като MHC рестрикция (13). По този начин се осъществява таргетно унищожаване на инфектираната/трансформираната клетка чрез освобождаване на гранулното им съдържимо – гранзими и перфорини. Някой вируси и тумори обаче са развили механизми с цел избягване на имунния отговор, един от които е потискане нормалната експресия на MHC клас I молекулите. MHC епитопите се свързват и от други рецептори експресирани на повърхността на естествените клетки убийци (NK) – инхибиторните имуноглобулин-подобни рецептори KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) и LIR (leukocyte Ig-like receptors) (14). И двата вида рецептори при свързване с

MHC потискат функцията на NK клетките – по този начин при редуцирана експресия на MHC клас I молекули на повърхността на абнормална клетка се намалява и инхибиращия ефект върху функцията на NK клетките, стимулира се съответно тяхното активиране и цитотоксичното убиване на прицелната клетка.

1.2.Некласически HLA клас I

За разлика от класическите клас I молекули, некласическите HLA клас I имат по-ограничена експресия и полиморфизъм, и проявяват малко по-различни имунологични функции – освен антигенно представяне, тези молекули играят ключова роля в процесите на имунорегулиране при физиологични и патологични условия. Към тях се отнасят експресиращите се HLA-E, -F, -G гени, псевдогена HLA-H, както и клас I свързаните гени MICA и MICB (10). J. Rodgers и R. Cook в своя обзорна статия от 2005г (10) класифицират некласическите MHC клас I молекули на млади, такива на средна възраст и стари на базата тяхната поява в хода н еволюцията. Към младите некласически HLA молекули отнасят HLA-F и –G, които се счита, че произлизат преди около 5-20 милиона години от класическите клас Ia MHC молекули и по тази причина проявяват най-голямо сходство с тях. Некласическа клас Ib молекула на средна възраст е HLA-E, която се появява в ранните етапи на развитие на бозайниците (преди около 65 милиона години) и за разлика от промискуитетните класически HLA молекули, HLA-E свързва по-ограничен набор от епитопи. Старите некласически клас Ib датират от ранните етапи на еволюция на гръбначните животни като към тях се отнасят MIC молекулите, които се разпознават и свързват от рецептори експресирани на повърхността на NK клетките (тук се отнасят и гени, които се разполагат извън MHC комплекса като CD1, MR1 и HFE) (10).

Всички некласически HLA молекули се разпознават и свързват от рецептори експресирани на повърхността на NK клетките, като HLA-G и -E допълнително свързват пептиди, които представят на CD8+ T клетките (10,15,16). HLA - E, - F и – G имат сходна структура, но се различават по вида на епитопите, които свързват (17). HLA-E подобно на класическите HLA молекули се експресира от повечето ядрени клетки, но в по-ниски нива (~25 пъти) (18). Главната му функция при нормални условия е да представя сигнални пептиди получени от собствени MHC клас I на CD94/NKG2A инхибиращия рецептор експресиран на повърхността на NK клетки, Т-клетки естествени убийци (natural killer T cell - NKT) и CD8+ αβ T клетки - механизъм за проследяване нормалната експресия на класическите клас I молекули (19).

Инфектирани или трансформирани клетки обикновено потискат MHC клас I експресията, което води до намалено представяне от HLA-E, от там в отслабване на инхибиращите сигнали към цитотоксичните Т- и NK клетки, тяхното активиране и таргетно унищожаване на клетката. Описани са случай на HLA-E рестрикцирано разпознаване от цитотоксични CD8+ Т-клетки на бактериални и вирусни епитопи (туберкулозни бактерии, човешки цитомегаловирус (human cytomegalovirus - hCMV) и Епщайн-Бар вирус (Epstein Barr Virus - EBV) (20–22). Освен това HLA-E е силно асоцииран с представянето на антигени при рак на простата (23). HLA-G от своя страна има ограничена експресия – най-висока експресия се наблюдава на майчино-феталния интерфейс върху цитотрофобластта, плацентата и амниона (24–26). В резултат на алтернативен сплайсинг HLA-G съществува в няколко изоформи - мембранно-свързани (HLA-G1, -G2, -G3 и -G4), при които липсва различна комбинация от α2 и α3 домените и разтворима изоформа, при които липсва трансмембранния домен и цитоплазмената опашка - HLA-G5, -G6 и -G7 (27). И двете форми изпълняват своите имуномодулаторни функции посредством директно свързване за инхибиращите имуноглобулин-подобни транскрипт рецептори -2 и -4 (ILT-2, - 4), които се експресират на повърхността на NK, αβ/γδ Т- и В-клетките, както при клетки от миелоидната клетъчна линия (моноцити, дендритни клетки (ДК) и неутрофили) (28), както и за инхибиращия KIR2DL4 рецептор на NK клетките (27). Най-общо инхибиращите функции на различните изоформи на HLA-G молекулата могат да се обобщят както следва: потискане на цитотоксичните NK- и Т- клетъчно медиирани отговори; потискане на ало-пролиферативните CD4+ Т клетъчни отговори към антигени; стимулиране диференциацията на Т регулаторните клетки (regulatory T cells - Tregs); потискане зреенето на дендритните клетки и процесите на фагоцитоза при неутрофилите (29,30). Имуносупресивният потенциал на HLA-G молекулата имат два различни, противоположни ефекта - благоприятен що се отнася до поддържане на имунологичен толеранс при трансплантация и бременност, и неблагоприятен, що се отнася до експресията на HLA-G от туморни клетки - избягване на антитуморен имунен отговор. Докато HLA-E и –G са добре характеризирани структурно и функционално, HLA-F е най-малко изследваната молекула сред тях, като клиничното й значение и биологични функции остават неизяснени дълъг период от време. Няколко проучвания сочат за значението на HLA-F генетичния полиморфизъм и експресията при патологични условия като назофарингеален карцином (31–33), инфекции (34,35) и автоимунни заболявания (34,35). Подобно на други клас I молекули, HLA- F се

разпознава и свързва от активиращи (KIR2DS4; KIR3DS1) и инхибиращи (KIR3DL2; ILT2) NK рецептори, като до скоро се смяташе, че антиген свързващата й ямка е празна, не свързва пептиди (36) и по-скоро функционира в т.н. отворена конформация (open conformer - OC), като образува хетеродимери с други MHC клас I молекули (37). Проучване на Ch. Dulberger и колектив през 2017 година обаче (38), доказва че HLA-F всъщност може да представя необичайно дълги пептиди в сравнение с конвенционалните MHC молекули, резултат от мутация в следствие на която пептид-свързващата ямка на HLA-F е с отворени краища. Интересно също така е наблюдението, че HLA-F OC и HLA-F свързал пептид се разпознават от различни NK рецептори (38). Тези съвременни проучвания доказват значението на HLA-F в имунорегулаторните процеси и подчертават необходимостта от допълнителни проучвания с цел изясняване на молекулярно-биологичните механизми и клинична значимост на тази молекула.

Седемте клас I свързани MIC гена са разпръснати сред клас I региона, като експресиращите се MICA и MICB се намират в бета блока, а останалите псевдогени – в алфа и капа (39). Кодиращите ги гени са големи – 8799 bp (MICA) и 11 716 bp (MICB) и са разположени центромерно от HLA-B гена (40). Подобно на класическите HLA молекули, MICA и MICB са полиморфни молекули, кодиращи мембранно-свързани гликопротеини, служещи като лиганди за стимулиране на активиращия рецептор от лектинов тип – NKG2D (NK receptor group 2 member D) експресиран на повърхността на цитотоксичните клетки: NK и някои Т клетъчни субтипове (γδ Т, CD8+ αβ Т и някой автореактивни CD4+ Т клетки) (41). Доменната структура на MIC е сходна на тази на класическите клас I молекули: три екстрацелуларни домена (α1, α2 и α3) кодирани от екзони 2-4, трансмембранен домен (ТМ) кодиран от екзон 5 и цитоплазмена опашка – от екзон 6 (40). За разлика от класическите клас I молекули, MIC не свързва β2-микроглобулин и не са антиген представящи молекули. Експресията на тези молекули е сравнително ограничена, но при условия на „клетъчен стрес“ като при вирусна/бактериална инфекция, висока температура, ДНК повреди, злокачествени трансформации и при автоимунни заболявания се повишава значително (42). MICA и MICB молекулите се експресират в ниски нива предимно върху епителни, ендотелни клетки, фибробласти и моноцити (43). Разпознаването на MIC молекулите от NKG2D рецептора на повърхността на цитотоксичните лимфоцити, позволява на клетките на имунната система да идентифицират и да атакуват инфектирани/трансформирани клетки без да е необходима експресията на MHC клас I или антигенно разпознаване.

MIC-NKG2D се явява много ефикасен механизъм за активиране на цитотоксичния имунен отговор на NK и CD8+ Т клетките и защита на организма срещу злокачествени, инфекциозни и автоимунни заболявания (44)(45).

2. HLA клас II гени и молекули – структура и функции

HLA клас II региона съдържа поне по една двойка гени (А и В гени) кодиращи съответно α и β веригите на класическите HLA-DR, -DQ и –DP молекули, експресирани на повърхността на професионалните антиген-представящи клетки (В клетки, макрофаги, дендритни клетки, Лангерханови клетки), тимусния епител и активираните Т-клетки. В допълнение на добре охарактеризираните класически клас II молекули, съществуват още три субрегиона т. нар. некласически HLA клас II – DO, DN и DM. Интересното е, че съществува функционално разнообразие между молекулите от различните субрегиони. HLA-DR, -DQ и –DP локусите кодират полиморфни хетеродимери, трансмембранни молекули, изградени от една α верига, нековалентно свързана с β верига, които в дисталната си част формират антиген-свързваща ямка. Класическите клас II молекули свързват пептиди, резултат от ендозомно разграждане на екзогенни (понякога и на ендогенни) протеини (46). МНС-пептидния комплекс се транспортира до клетъчната повърхност, където се разпознава от TCR на CD4+ Т помощните клетки. Клас II молекулите имат съществено значение за осигуряване на имунен отговор срещу пиогенни бактерии. Некласическите HLA-DM и -DO молекули, обикновено не се експресират на клетъчната повърхност и не представят антигени. Те се намират във вътреклетъчни, ендозомни структури и подпомагат свързването на пептид към подходяща МНС клас II молекула (47). Екзон-интронната организация на гените кодиращи α и β веригите е сходна: екзон 1 кодира водещата секвенция на двете вериги; екзони 2 и 3 кодират екстрацелуларните домени (α1 и α2; β1 и β2). За β веригата екзони 4, 5 и 6 кодират съответно ТМ домена, цитоплазмената опашка и 3’ нетранслираният регион (3’ untranslated region – 3’ UTR), докато за α веригата екзон 4 кодира ТМ и цитоплазмения домени, а екзон 5 3‘UTR на молекулата (48). Гените кодиращи α и β веригите на класическите и некласическите клас II молекули са кодирани последователно, с изключение на А и В гените на HLA-DO локуса, които са разделени от множество гени (48). Част от гените сред клас II региона са дублирани, като -DP и –DQ локусите имат по едно функционално копие (HLA-DPA1 и –DPB1; -DQA1 и –DQB1) и множество псевдо гени (HLA-DQA2, -DQB2, -DQB3, HLA-DPA2 и -DPB2) (48). HLA-DRB региона е по-специфичен, като се състой от голям набор

дупликации, от които четири са функционални гени (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, и -DRB5) и няколко псевдогени (HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8, и -DRB9) (48). Друг интересен феномен, който се установява при HLA-DRB локуса, е че често се наблюдава едновременната експресия на няколко HLA-DRB гена - HLA-DRB1 в комбинация с някой от -DRB3, -DRB4 и -DRB5 гените. В резултат на силно изразена неравновесна скаченост между HLA-DRB гените, то те се унаследяват като стабилни хаплотипи. HLA-DRA локуса е сравнително консервативен, като обикновено един хаплотип съдържа –DRA ген в комбинация с няколко –DRB гени (49). Най-висока степен на полиморфизъм от всички клас II локуси се наблюдава при –DRB1 гена (48).

МНС клас II молекулите са изградени от две различни полипептидни вериги (α и β), които подобно на тежката α верига на клас I молекулите, се състоят от екстрацелуларна част, трансмембранен домен и цитоплазмена опашка. Екстрацелуларните домени са два (α1 и α2, β1 и β2), като проксималните на мембраната домени (α2 и β2) подобно на α3 домена на клас I и на β2-микроглобулина, имат имуноглобулин подобна структура – по тази причина клас II молекулите също се отнасят към имуноглобулиновата суперфамилия. Дистално разположените домени α1 и β1 от своя страна формират антиген-свързващата ямка на клас II молекулите, която е отворена в двата си края, поради липсата на консервативни анхорни ак последователности, разположени в двата края, както е характерно за клас I. По тази причина клас II молекулите могат да свързват пептиди с по-голяма дължина: 13-18 ак остатъка. Консервативните ак остатъци на пептидите свързващи се от клас II молекулите са разпръснати по дължината на пептида и по-конкретно в неговата централна, вътрешна част (13 ак). Така за разлика от пептидите разпознаващи клас I молекулите, които не осъществяват контакт с пода на антиген-свързващата ямка, клас II пептидите са в пряк контакт с нея. МНС клас II молекулите експресирани на повърхността на антиген-представящите клетки представят екзогенно получени антигенни пептиди на CD4+ Т клетките, които от своя страна активират и стимулират В клетките да продуцират антитела срещу специфичния антиген.

3. HLA полиморфизъм и номенклатура

Предвид главната роля на МНС молекулите в индуцирането на имунен отговор и защита на организма от патогени, редица механизми (промискуитетно свързване на антигени; полигенност; кодоминантна експресия; висока степен на полиморфизъм) осигуряват генерирането на възможно най-голям набор от антигенни специфичности,

така че организма да може да реагира на големия спектър от познати и непознати антигени, с които ще се среща по време на своето съществуване. HLA е най-полиморфния регион в човешкия геном, като според номенклатурата на Международната имуногенетична информационна система (International immunogenetics information system - IMGT/HLA database) до момента са описани над 25,000 HLA клас I и клас II алела и 202 не-HLA алела (HFE, MICA/B, TAP1, TAP2) (таблица 1) (50). HLA-B от своя страна е най-полиморфния ген в човешкия геном (51). Полиморфизма в най-голямата си част се дължи на рекомбинации, генни конверсии и единични нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms - SNPs) (12). Най-голяма честота на полиморфни варианти се среща в екзоните кодиращи антиген-свързващата ямка – екзони 2 и 3 кодиращи съответно α-1 и α-2 домените на клас I молекулите и екзон 2 кодиращ α-1 и β-1 домените при клас II молекулите (52). Някой нуклеотидни позиции в тези екзони са инвариантни (непроменливи) генериращи консервативни кодони. Съществуват и позиции където могат да се срещнат някой от четирите нуклеотида, осигурявайки различна степен на променливост (46). SNPs със съществено значение са тези, които водят до несинонимни замени и промяна в ак последователност. Класическите HLA алели се характеризират с наличието на специфични ак последователности на анхорни позиции и с относителна промискуитетност в останалите участъци на свързване, като по този начин всеки HLA алел свърза широк спектър от антигенни специфичности.

Таблица 1. Брой класически и некласически HLA алели и протеини

	Класически HLA клас I и клас II								
Ген	**A**	**B**	**C**	**DRA**	**DRB**	**DQA1**	**DQB1**	**DPA1**	**DPB1**
Брой алели	6082	7256	5842	29	3357	246	1826	194	1556
Брой протеини	3794	4648	3503	2	2378	106	1213	68	1016
Брой нулеви алели	344	269	286	0	155	7	86	7	88

	Некласически HLA клас I гени					
Гени	**MICA**	**MICB**	**HLA-E**	**HLA-F**	**HLA-G**	**HLA-H**
Брой алели	223	131	191	44	78	66
Брой протеини	104	35	73	6	21	0
Брой нулеви алели	5	23	7	0	4	0

Източник: Данните са от http://hla.alleles.org, уебсайта, поддържан от HLA Informatics Group, с актуална информация за броя на HLA алелите и протеините

От еволюционна гледна точка, локалните патогени имат съществено значение за поддържане на МНС разнообразието и за селекцията на определени алели, които съответно могат да са предразполагащи или да придадат устойчивост на индивидите към определени болестотворни агенти или имунни нарушения. През дълги периоди от време ендемичните локални патогени оказват еволюционен натиск, което води до по-висока или съответно по-ниска чистота на срещане на определени алели в популацията. Високото ниво на МНС полиморфизъм, наблюдаван при хора и други видове, допринася за по-голямата устойчивост и оцеляване на тези видове, посредством осигуряването на голям спектър от възможни антигенни специфичности, които МНС молекулите могат да представят. Съществуват и доказателства за обратното, така например гепардите и други видове диви котки, при които са наблюдава ограничен МНС полиморфизъм се отличават с много висока чувствителност към вирусни заболявания (53).

Редица МНС полиморфизми са асоциирани като предразполагащи или съответно протективни за множество заболявания. За разлика от други региони на генома, при които се отчита силна неравновесна скаченост на гените (linkage disequilibrium - LD) на разстояние от приблизително 22 kb (54), при МНС в някои случай скачеността на гените се разпростира до 2 Mb (48). Това се доказва чрез наличието на т.н. разширени HLA хаплотипи, които обхващат няколко клас I и клас II алели разпростиращи се на големи разстояния един от друг. Такъв например е често срещания в някои азиатски популации хаплотип A*33:03-B*58:01-C*03:02-DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01-DPB1*04:01, асоцииран с назофарингеален карцином, което съответства с по-голямата честота на това злокачествено заболяване в тази етническа група (55,56). В резултат на силно изразената неравновесна скаченост на гените при МНС региона, то даден локус асоцииран с определено заболяване може да се окаже част от хаплотип. По тази причина изучаването на HLA хаплотипите е от изключително значение с цел избягване на погрешно асоцииране на дадено заболяване с определен МНС локус. Така например първоначално нарколепсията била асоциирана с HLA-DRB1*15 алела, като в последствие станало ясно, че всъщност ефекта на заболяването се дължи на HLA-DQB1*06:02 част от същия хаплотип (57).

Наследствения хаплотип 8.1 AH (ancestor haplotype – AH) (A1-C7-B8-DR3), типичен за Кавказоидната раса е определен като главен имунологичен детерминант на редица автоимунни заболявания (58–63). При здрави индивиди носители на този хаплотип се наблюдава изместване на имунния отговор в посока Th1 → Th2 (64). Това се

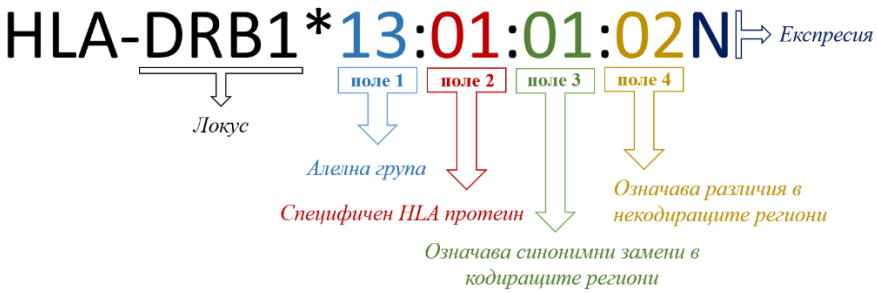
потвърждава от наблюдението, че антиген-стимулираните CD4+ Т клетки продуцират предимно тип 2 цитокини, както и TNF-α (65). Определени полиморфизми в TNF и комплемент кодиращите гени, разположени в HLA клас III региона, се срещат при 8.1 АН носителите. Такива са TNF - 308A полиморфизма асоцииран с високи нива на експресия на цитокина и C4A*Q0 алела, който кодира нефункционален C4 протеин, в резултат на което ефикасните процеси на опсонизация и почистване на организма са компрометирани (59)(66). Високите нива на TNF-α от своя страна индиректно водят до повишена експресията на CD95 рецептора (познат още като Fas), водещ да повишени нива на апоптоза на лимфоцитите от една страна, а от друга до повишена продукция на тип 2 цитокина интерлевкин 10 (IL-10) (62,66). По този начин носителите на 8.1 MHC се оказват много по-чувствителни към развитие на автоантитела, поради едновременното действие на няколко фактора: по-продължително задържане на автоантигени от апоптозиращите собствени лимфоцити, резултат от нарушеното пречистване и поемането на тези автоантигени от дендритни клетки, които под действието на TNF-α се развиват до зрели антиген представящи клетки и индуцират имунен отговор (59,62,66).

MICA от своя страна е най-полиморфния некласически HLA ген, като според IPD-IMGT/HLA Database, (1-05-2020) до момента са идентифицирани 223 алела за MICA гена, следван от HLA-E за който са описани 191 алела, като нови алели се описват непрекъснато и биват добавяни към базата данни. MICB е по-малко изследван в сравнение с MICA, като за него са описани 131 алела кодиращи 35 протеина (IPD - IMGT/HLA Database, 1-05-2020). Трансмембранния домен (TM) на MICA кодиран от екзон 5, се състой от различен брой къси тандемни повтори (short tandem repeats - STR), като полиморфизма се състой от 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 GCT повтора, кодиращи съответно 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 аланинови остатъка (67–70). Друга алелна вариация - A5.1, съдържа инсерция на азотна база гуанин (G) след втория GCT триплет, което води до изместване на рамката на четене в стоп кодон (70). В резултат на това MICA*A5.1 кодира скъсен протеин, който се отделя в екзозоми и поради това има силен инхибиторен ефект върху на NKG2D рецептора (71,72). A5.1 най-често се открива при MICA*008 алела (43), който е и най-често срещания MICA алел при всички изучавани популации. Описани са още няколко полиморфизма, които оказват съществено влияние върху MICA протеиновата структура и стабилност, в резултат на които се наблюдава липса на повърхностната му експресия (73) или до синтеза на молекула със скъсена цитоплазмена опашка (74). Съществуват и нулеви MIC алели (MICA*063N,

MICA*064N, MICB*009N, MICB*021N), при които в резултат на преждевременен стоп кодон кодират молекули със скъсена дължина (75–77). Все още обаче, данните за аленото разпределение на MICA и в по-голяма степен на MICB и тяхната функционална активност са силно ограничени. С оглед изясняване на механизмите за модулиране на цитотоксичния имунен отговор е необходимо да се проучат генетичните полиморфизми на MICA и MICB лигандите.

Наименованието на новите HLA гени и алели е отговорност на комитетът по номенклатура на факторите на HLA системата към световната здравна организация. През 1987г. с въвеждането на молекулярно-генетичните методи за HLA типизиране се въвежда номенклатура за наименуване на новите ДНК секвенции, различна от серологична. За разлика от серологичните специфичности, които най-общо казано отговарят на антигена, при ДНК базираните анализи е възможно разграничаването на отделните антигенни секвенции. По този причина всяка серологично дефинирана HLA антигенна специфичност може да бъде кодирана от множество различни HLA алели. Обратно, много HLA алели нямат определен серологичен еквивалент. HLA алелите определени чрез молекулярно генетични методи се разграничават от серологичните такива по наличието на звезда (*), която разделя буквеното обозначение на съответния HLA генетичен локус и първия двуцифрен код (поле едно) от численото наименование на алела (например HLA-DRB1*10:01). Освен това серологично определената HLA-C антигенната специфичност е прието да се обозначава като “Cw”, за да бъде избегнато объркване с номенклатурата на наименование на протеините на комплемента (78). HLA алелните имена представляват уникални номера от най-малко 4 цифри, две по две разделени от двоеточие, като дължината на името зависи от специфичността на секвенцията и от тази на нейната най-близка, сходна секвенция (фигура 3) (79). Първия двуцифрен код (поле 1) преди първото двоеточие определят алелната група на антигена и обикновено (но не винаги) отговарят на серологичната специфичност. DPB1 локус, прави изключение от серологично-базираната номенклатура, тъй като не е налична подходяща серологична система за типизиране на този локус (80). По тази причина вместо по серологична специфичност, DPB1 алелите се наименуват по реда на тяхното откриване посредством ДНК-базираните методи за типизиране. Следващия сет от цифри (поле 2) отговаря на протеиновата специфичност на антигена или още т.н. субтип. Алели, които се различават по единична, синонимна нуклеотидна замяна в кодиращите региони се различават посредством третия набор от цифри (поле 3) (79). Алели, при които се наблюдават различия в некодиращите последователности (интрони

или в нетранслиращите се последователности) се наименуват посредством използването на четвърти сет от числа (поле 4). Накрая на числената последователност понякога могат да се срещнат някой от следните азбучни обозначения: 'L', 'S', 'C', 'A', 'Q' или 'N', които съответно дават следната информация: L - протеин с ниска повърхностна експресия; S - протеин експресиран в разтворима форма; C - протеин, които се среща в цитоплазмата но не и на клетъчната повърхност; A - аберантен протеин; Q - протеин чиято експресия е „под въпрос"; N – алел, които не се експресира/нулев алел.



Фигура 3. HLA номенклатура
Изображението е адаптирано от Marsh S et all (2010) (81)

II. Следващо поколение секвениране (NGS) като метод за детекция на полиморфизми при класическите и некласически HLA гени

Генотипизирането на силно полиморфния HLA регион се е превърнало в задължителен лабораторен тест за определяне на HLA съвместимостта между донор-реципиент при органна трансплантация и трансплантация на хемопоетични стволови клетки, при антропологични проучвания за генетични връзки между популациите и дори в съдебната медицина. Определянето обаче на индивидуален HLA локус, асоцииран с имуномедиирани заболявания е трудна задача поради сложната генетична организация на региона – изключителна степен на полиморфизъм и силна неравновесна скаченост на гените в комплекса.

Най-напред HLA полиморфизма се е определял посредством серологично типизиране чрез използването на алоантитела (антисерум) срещу антигените експресирани на повърхността на левкоцити (6). С въвеждането на полимеразната верижна реакция (polymerase chain reaction - PCR), започна развиването на ДНК базираните методи за HLA типизиране. Най-често използваните PCR-базирани методи за HLA типизиране са PCR-SSP (Sequence specific primers), PCR-SSOP (Sequence

Specific Oligonucleotide Probes) и PCR-SBT (Sequence Based Typing). PCR-SSP и – SSOP са методи с ниска разграничителна способност – типизиране на ниво първо поле, което съответства на серологичен еквивалент на антигена. Недостатъците на тези техники са ограничените възможности за идентифициране на нови алели, проблеми при разграничаване на близки хетерозиготни алелни комбинации и невъзможност за детекция на полиморфизми извън рамките на ампликона. PCR-SBT от своя страна е метод с висока разграничителна способност базиран на класическото секвениране по метода на Sanger. Намира много широко приложение в клиничната практика, но има своите ограничения: ограничен капацитет, ниска чувствителност и често генериране на неразграничими алелни комбинации.

Развитието на секвенционната технология доведе до разработване на платформи за секвениране от следващо поколение - NGS (Next- Generation Sequencing), които са с по-голям капацитет, по-висока чувствителност, разграничителна способност и производителност в сравнение с класическото секвениране. С въвеждането на тази технология драстично се увеличава броя на новите секвенции и алели в база данни за имунологични полиморфизми IPD-IMGT/HLA (8). Към момента се срещат две основни клонални техники за анализиране на HLA региона: дълго диапазонната PCR амплификация (long-range PCR) и хибридизационно-базиран метод за улавяне (82). И двете техники се характеризират с постигане на добър алелен баланс и покритие на таргетните гени. Непрекъснатото усъвършенстване на NGS базирани методи, заедно с улесняващи работата софтуери за анализ имат потенциала да се превърнат в „златен стандарт“ за прецизно типизиране на HLA алелните варианти (до четвъртото поле) и за генериране на разширени HLA хаплотипи (83). Посредством използването на NGS технологията вече е възможно създаването на популационна база данни включваща резултатите от HLA типизирането на индивидите от съответната популация, която може да служи като референтен панел в популационни проучвания изследващи риска от развитие на HLA-асоциирани заболявания (84). Повечето проучвания до момента използват методи за HLA типизиране с ниска разграничителна (PCR-SSP, PCR-SSOP), като навлизането на NGS технологията ще доведе до по-голяма яснота и ще улесни интерпретация на получените данни. Освен това информацията от NGS-базирано HLA типизирането ще осигури по-добро разбиране и изясняване на механизмите на модулиране на имунния отговор с оглед терапевтично повлияване и определяне на нови биомаркери.

Последните години NGS технологиите набират все по-голяма популярност и достъпност, в резултат на което намират редица научно-изследователски приложения: анализ на епигенетични фактори като ДНК метилиране и ДНК-протеинови комплекси; изследване на човешкия микробиом; идентифициране на редки соматични мутации при ракови образования; цялостно геномно секвениране, таргетно секвениране, РНК секвениране и т.н. Най-широко използваните платформи за NGS секвениране са на Illumina и Thermo Fisher Scientific. NGS секвенирането е многостъпателен процес, като независимо от използваната платформа, методологията на процеса включва най-общо три основни етапа: подготовка на библиотеката, секвениране и анализ на резултатите.

Платформите за секвениране от следващо поколение на Illumina извършват масивно, паралелно секвениране, като използват т. нар. метод на „секвениране чрез синтеза“, при който клонално амплифицираните ДНК фрагменти се прочитат база по база, посредством свързване на флуоресцентно-белязани нуклеотиди. Характерна особеност на тези нуклеотиди, е че имат способността обратимо да прекъснат синтезата на ДНК фрагментите. Подготовката на библиотеката за зареждане на секвенционните апаратни на Illumina, включва свързване на адаптори към генерираните къси фрагменти библиотека. Адапторите са конструирани по специален начин, така че от една страна са комплементарни на къси олигонуклеотидни последователности на повърхността на поточната клетката, където се извършва процеса на клонална амплификация, а от друга в състава им се включени т.нар. индекси, които осигуряват уникалното маркиране на всяка отделна проба в състава библиотеката. Една от основните предимства на тази NGS система е високата производителност. Недостатъците на тази технология секвениране са свързани с използването на обратимо свързаните с блокираща (терминираща) група динуклеотиди, което води до ограничение в дължината на прочита и загуба на точност с нарастване дължината на прочитания фрагмент.

Секвенционната технология използвана от NGS платформата Ion Torrent също е „секвениране чрез синтеза“, като разликата е в начина на детекция на инкорпорирана база. След подготовка на ДНК библиотеката, намножаването на генерираните фрагменти се осъществява посредством емулсионен PCR на повърхността на микросфери. Този процес се извършва напълно автоматизирано от Ion Chef™ апарат. След което всяка микросфера се разпределя в отделна ямка на секвенционен чип, където се извършва процеса на същинско секвениране. Свързването на база към ДНК матрица е съпроводено от отделянето на водороден катион. Това води до промяна на pH на разтвора, което се отчита от йонен сензор (полупроводников чип) разположен на

дънното на всяка ямка на чипа и трансформира получената информация от химичен в електричен сигнал. Предимствата на тази технология са ниска цена и съкратено секвенционно време.

III. HLA асоциация със заболявания

През последните десетилетия са описани редица състояния предимно автоимунни, инфекциозни/бактериални заболявания и тумори, които са асоциирани с определени HLA алели (таблица 2). Точните механизми, които стоят в основата на тези асоциации все още не са напълно изяснени. Така например през годините са предложени няколко хипотези за обясняване асоциацията HLA-автоимунни заболявания като например нетипично представяне на собствени антигени от MHC молекулите (85), имунен отговор срещи изменени собствени протеини (85) и крос-реактивност (86). Допълнително, определен HLA алел може да бъде асоцииран с няколко напълно различни по своята патогенеза заболявания, а в други случай даден HLA алел може да бъде установен като протективен за дадено заболяване и предразполагащ за друго. Описана е също така силна асоциация на HLA алел с заболяване в чиято патогенеза не е известно да има антигенно представяне (HLA-DQB1*06:02 и нарколепсия) (87). Определянето на точния HLA компонент на дадено заболяване е трудно поради силния полиморфизъм на региона, висока плътност на гените, разположени предимно в клъстери, силно изразена неравновесна скаченост между тях и вероятното влияние на други не-HLA гени разположени сред региона. Влиянието на факторите на околната среда, условия на живот и генетичен фон на отделните популации допринася за трудността в интерпретацията на резултатите и води до генерирането на противоречиви данни от различните проучвания.

Таблица 2. Асоциация HLA с някои заболявания

	Заболяване	Популация	HLA алелна/хаплотипна асоциация		Реф.
			Предразполагаща	Протективна	
Вирусни инфекции	Хепатит B (HBV)	Турция	B13, B8, DR7, DR13, DQ3	A-24, Cw1	(88)
		Китай	B35; DQA1*0501; DQB1*0301; DRB1*12:01/12:02 DRB1*06, DRB1*08, DRB1*16	DRB1*11/*12; DR7; DRB1*15; DR13; HLA-DR*0406	(89–93)
		Русия	B18, B35, B40, Cw3	A2	(94)
		Казахстан	A3, B18	A11	
		Американски кавказоиди	HLA A*01-B*08-DRB1*03, B-44-Cw1601, B*44-Cw*0501	A*0301	(95)
		Кавказоиди	B8	DR15	(95)
	Хепатит C (HCV)	Япония	DRB1*04:05, DQB1*04:01; DRB1*04:05, DQB1*04:01; DQB1*05:03	DR9-DQB1*03:01, DQB1*03:03; DRB1*13:02, DRB1*11:01, DQB1*06:04; DRB1*12(12:01/12:02), DQBI*03:01, DRB3*03	(96–99)
		Русия	A10, B35, B40, Cw3; A30, B35, B41, Cw2, A1-B35, A9-B8	Cw4	(94,100)
		Англия	DRB1*07:01, DRB1*15, DRB4*01:01	DRB1*03:01, DRB1*11:01, DRB1*12:01, DQB1*03:01	(101)
		Италия	DRB1*10:01, DRB1*11:01; DQB1*05:02; DR14, DR17	DRB1*11:04, DRB3*03; DRB1*11:04,DQB1*03:01; DR11	(102–104)
Бактериални инфекции	Туберкулоза	Бразилия	HLA-DRB1*04:11:01	DRB1*04:07:01	(105)
Автоимунни	Анкилозиращ спондилит (AC)	Западна Африка	B14 (B*14:03)		(106)
		Китай	B60, B61		(107)
		Общ за AC	B27		(108–111)
	Ревматоиден артрит	Северно Американски кавказоиди	A1-B8-DRB1*03 DRB1*04:04 хаплотипи DRB1*04:01/04:04 хетерозиготи		(112)
		Югоизточен Иран	DRB1*10	DRB1*03	(113)

		Кавказоиди	DRB1*04:01, *04:04, *04:05 (HLA-DR4); DRB1*01:01,*01:02 (HLA-DR1); HLA-DRB1*10:01 (HLA-DR10)	DRB1*01:03, DRB1*13:01, DRB1*13:02, DRB1*04:02	(114–118)
		Япония	DRB1*09:01		(119)
	Диабет тип 1	Кавказоиди и не-кавказоиди	DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02 и DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04 хетерозиготи (DR3/DR4); DPB1*02:02, *03:01; B*39:06;	DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02; DRB1*11:04-DQA1*05:01-DQB1*03:01; DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03; DRB1*14:01-DQA1*01:01-DQB1*05:03; DPB1*04:02; B*57:01;	(80,120–122)
	Системен лупус еритематозус	Япония	DRB1*15:01, *09:01, *08:02, *04:01;	DRB1*13:02, DRB1*14:03 (DR6);	(119, 123)
		Кавказоиди и не-кавказоиди	HLA-DR3, DR9, DR15	HLA-DR4, DR11, DR14	(124)
Тумори	**Орален спиноцелуларен карцином**	Холандска	B*40, B*35, B*40-DRB1*13		(125)

Съкращения: Реф. – референции.

IV. Асоциация на HLA региона с дълголетие

През последните години много изследователи проучват влиянието на HLA гените върху продължителността на живот, поради главната роля на кодираните от тях молекули в модулирането на имунния отговор и значителната степен на полиморфизъм на тази група гени. Предполага се, че определени HLA алели/хаплотипи са свързани с дълголетие и поради това имат различно разпределение при възрастни в сравнение с млади индивиди. HLA разпределението е анализирано в няколко популации по света като получените резултати са много противоречиви, което предполага, че асоциацията HLA/продължителност на живот е популационно специфична. Въпреки това, при обобщаването на данни от различни популационни проучвания се открояват няколко алела, главно HLA клас II, които се срещат с по-висока честота при столетници.

При демографското проучване на Пес и Пулен (126), изучавайки регионите в света с най-висока концентрация на столетници възниква термина „сини зони“. Това са райони

с много висока честота на дълголетници в добро физиологичното и психичното състояние. Има общо 5 сини зони по света (Икария, Гърция; Окинава, Япония; Сардиния, Италия; Лома Линда, Калифорния; Никоя, Коста Рика), чиито обитатели са изолирани популации, споделящи сходен начин на живот. При проучване изследващо HLA алелното разпределение в различни региони на Италия е установено, че обитателите на отдалечените един от друг региони каквито са северните и южните части на полуострова, както и населението на остров Сардиния, имат статистически значими различия в HLA алелното/хаплотипно разпределение (127). В друго проучване изследващо асоциацията HLA – продължителност на живот при столетници от Сардиния се наблюдава по-висока честота на HLA-DRB1*15 алела при дълголетници в сравнение с здравата, млада контролна група (128). Установената разлика обаче не е статистически значима. Интересно е, че HLA-DRB1*15 е един от главните генетични фактори асоциирани с множествена склероза (МС), включително и в едно италианско фамилно проучване (129–132). От друга страна съществуват сведения за протективната роля и по-добър отговор на хепатит В инфекцията при носителите на този алел (92,133,134). При столетници от Окинава се наблюдава увеличена честота на следните клас II алели: DQB1*05:03; DQA1*01:01, *05; DRB1*01:01, *12:01 и *14:01 (135). Допълнително при изследване на братя и сестри на столетници от Окинава е установено, че те имат по-висок шанс да доживеят до своите 90 години в сравнение с останалата част от населението (136), което подчертава значението на фамилните проучвания при дълголетници.

Тези противоречиви данни вероятно са резултат от взаимодействието на различни фактори като начин на живот, фактори на околната среда, пол, генетична хетерогенност в рамките на една популация и неравновесната скаченост характерна за гените от HLA комплекса. Изучаването на HLA-хаплотипите може да хвърли яснота върху погрешно интерпретирани асоциации с определени HLA алели. Въпреки това обаче сравнително малко проучвания изследват значението на HLA-хаплотипите за продължителността на живот (137–140). Общия за кавказоидната раса хаплотип 8.1 АН (A1-C7-B8-DR3) е асоцииран с множество автоимунни заболявания, а при здрави индивиди с дисфункция на Т-клетъчно медиираният имунитет. При две отделни проучвания в ирландското и френското население се наблюдава статистически значима, висока честота на A1B8Cw7DR3 хаплотипа при мъже на и над 90 години (137,141). Полово специфичните различия в продължителността на живот вероятно са повлияни от специфични биологични фактори като Х-свързани гени, полови хормони и/или различни социални

фактори. Характерното за 8.1 АН изместване на имунния отговор от тип 1 (клетъчно-медииран) към тип 2 (хуморален) вероятно благоприятства дълголетието при мъже, за разлика от противоположния пол, който по начало е по-предразположен към автоимунни заболявания (142). HLA алел асоцииран с дълголетие при жени е DR11, който е наблюдаван с висока алелна честота при възрастни жени от Мексико и две кавказки популации (143–145). При едно от тези проучвания проведено в френската популация, освен DR11 друга полово-специфична разлика бе установена и за DR7, който се наблюдава с по-висока честота при възрастни мъже (9). Този алел е асоцииран с дълголетие и в гръцката популация (146). В частност за гръцката популация все още няма сведения за връзка на DR7 алела със заболявания, но при проучвания в няколко различни популации тази антигенна специфичност е определена като предразполагаща за вирусни инфекции (147–150) и автоимунни заболявания (151–153). От друга страна високата честота на DR11 при възрастни жени съвпада с данните за протективна асоциация на тази алел при инфекциозни заболявания (150,154–156). При обобщаването на данните от различните популационни проучвания главно HLA клас II алели се наблюдават с висока алелна честота при здрави възрастни (таблица 3). Това може да се обясни с ролята на клас II молекулите в антигенното представяне и разпознаване от CD4+ Т помощните клетки. В проведено проучване на дълго живеещи индивиди от китайската популация са идентифицирани 4 единични нуклеотидни полиморфизма (SNPs) в HLA-DQB1 гена асоциирани с дълголетие и липидна хомеостаза (157). DRB1*18 е установен с статистически значима висока честота при сицилиански столетници (158). Въпреки преобладаването на клас II специфичности, асоциация с дълголетието имат и няколко HLA клас I алели: при възрастни италианци – висока честота на A31, B7 и Cw7 (159); възрастни гърци - висока честота на B16 и ниска на B15 (146); китайци – висока честота на A9 и ниска на A30, Cw3, w6, w7 серотиповете (160), възрастни холандски жени – ниска честота на B40 (143).

Алелното и хаплотипно разпределение на класическите HLA клас I и клас II гени е изследвано при дълголетници от българската популация чрез прилагане на типизиращи техники с висока разграничима способност - NGS (161). Позитивна асоциация с дълголетието се установява за HLA-A*01:01:01:01, -C*07:01:02, -B*35:02:01, -B*15:17:01:01 специфичностите и за HLA-DRB1*11 хаплотипни асоциации, при изследвани 59 здрави, възрастни и 367 млади индивиди от българската популация. Част от установените асоциации потвърждават резултати получени при предишни

изследвания върху дълголетници от българската популация използващи типизиращи техники с ниска разграничителна способност и класическо секвениране (140).

Таблица 3. Асоциация HLA и дълголетие

HLA специфичност	Изследвана група	Възраст		Популация	Ефект	Ст. Зн.	Типизиране	Реф.
		Възрастни	Контрола					
DRB1*11	71 възрастни, 99 млади	86,2 (средна)	35,2 (средна)	Мексико	Висока при възрастни жени	да	PCR-SSO; PCR-SBT	(145)
B40 DRw11 (DR5)	964 възрастни, 2444 млади	Над 85	20-35	Холандия	Ниска при възрастни жени; Висока при възрастни жени	да да	Лимфо-цитотоксичен тест	(143)
DR7 DR11 DR13	533 столетници, 229 деветдесет годишни братя/сестри, 2950 контроли	101.2 (средна) 94.7 (средна)	20-60	Франция	Висока при мъже; По-висока при жени-сестри; Висока при столетници	да да да	Обратен dot-blot	(144)
DRB1*15	120 столетници, 86 контроли	100	60	Сардиния	Висока при столетници	не	ARMS/PCR	(128)
DRB1*18	77 столетници, 299 контроли	100	-	Сицилия	Висока при мъже столетници	да	PCR-SSP	(158)
B16 DR7 B15 DR4	171 възрастни, 405 контроли	75-104	18-65	Гърция	Висока при възрастни; Ниска при възрастни	да да	Серологично типизиране	(146)
DRB1*0101, *1201, *1401; DQB1*0503; DQA1*0101,*05. DRB*0403, *1302	120 столетници, 129 възрастни	102.3 (средна)	63.5 (средна)	Япония	Висока при столетници Ниска при столетници	да да	PCR-RFLP	(135)
A9 A30; Cw3,w6,w7	22 столетници, 179 деветдесет годишни 211 възрастни	93.0 (средна)	38 (средна)	Китай	Висока при възрастни Ниска при възрастни	да да	Лимфо-цитотоксичен тест	(160)

Съкращения: Ст. зн. – статистическа значимост; Реф. – референции.

Данните от популационни проучвания изследващи асоциацията HLA – дълголетие обикновено са противоречиви и трудни за интерпретиране от една страна поради различията в генетичния фон и фактори на околната среда при отделните популации, а от друга страна причина са и различните методологични подходи – различни критерии за включване в изследването; големина на изследваната група; изследване на отделни HLA локуси и/или различни типизиращи подходи. Този тип проучвания наистина са подложени на редица фактори затрудняващи интерпретацията, като наред с гореизброените значение има и хомогенността на изследваната популация по отношение на произход (63,162,163). Обобщаването на всички тези противоречиви данни само подчертава необходимостта от изясняване влиянието на генетични фон и популационната хетерогенност по отношение HLA върху продължителността на живот. Определянето на популационно специфични алели и хаплотипи, чрез които могат да се идентифицират индивиди с висок риск за развитие на възрастово асоциирани заболявания, ще допринесе за развитието на стратегии за „подмладяване“ на имунната система на база рискови имунологични фенотипове. Имайки в предвид важната роля на HLA в модулирането на имунния отговор се предполага, че дълголетието е асоциирано със селекция на HLA алели и хаплотипи осигуряващи устойчивост на заболявания. Редица проучвания през последните десетилетия изследват тази асоциация, но категорично заключение все още липсва. Необходими са повече проучвания в различни етноси и популации, обхващащи по-големи групи, селекционирани по точно определени, общи критерии, за да могат да бъдат изведени популационно специфични HLA алели и хаплотипи, които да се използват като информативни биомаркери за развитието на стратегии за поддържане на оптимални имунологични функции във възрастния организъм.

V. Роля на HLA клас I свързаните MICA и MICB гени в имунния отговор - асоциация с възпалителни, автоимунни заболявания и рак

Поради близкото разположение на MIC гените до HLA-B, асоцииран с някой вирусни, автоимунни и възпалителни заболявания, интерес представлява изследване и ролята на MIC алелния и хаплотипен полиморфизъм за развитието на тези състояния (44,164–166). Така например MICB*002 и MICB*014 са описани като протективни за ревматоиден артрит в Японската популация (166).

Таблица 4. Асоциация на MICA/B полиморфизма с възпалителни, автоимунни заболявания и рак

Заболяване	Екзони 2-4	ТМ домен	Алелна асоциация	Популация	Референции
Рак на маточната шийка		+ +	MICA*A5.1	Шведска	(167)
Левкемия		+ + -- +	MICA*A5 MICA*A5.1 MICA*A5.1	Японска САЩ	(168) (169)
Денга		+	MICA*008	Кубинска	(170)
Туберкулоза		-	HLA-B*18-MICA*018	Бразилска	(171)
Системен лупус еритематозус		+	MICA*A5.1	Европеидна	(172)
Ревматоиден артрит	 + +	+ +	MICA*A9 MICA-129 Val	Азиатска Индийска	(172) (173)
Анкилозиращ спондилит		+	MICA*A6	Азиатска	(172)
Диабет тип 1		+	MICA*A5.1	Индийска	(174)
Хронично възпалително заболяване на червата	+		MICA-129 Met/Met	Испанска	(175)
Синдром на Sjögren (Сьогрен)		++	MICA*008	Френска и Английска	(176)
Язвен колит		+ + -	HLA-B*52-MICA*A6 MICA*A5.1 MICA*A4	Испанска	(71)
Автоимунно заболяване на щитовидната жлеза		+ +	MICA*010	Корейска	(177)
Орален спиноцелуларен карцином		+ +	MICA-A5.1	Японци	(178)

Съкращения: ТМ –трансмембранен домен; +, предразполагаща MIC алелна асоциация със заболяването (P = <0.05); ++, силно предразполагаща MIC алелна асоциация със заболяването (Pc = <0.05); –, протективна алелна асоциация със заболяването (P = <0.05); силно протективна MIC алелна асоциация със заболяването (Pc = <0.05).
Адаптирано от Stephens HAF и сътр (2001) (179)

Неопластично трансформираните клетки се характеризират с акумулация на различни генетични мутации и нарушения в нормалните клетъчни регулаторни процеси. Способността на имунната система да установи и унищожи тези клетки е

ключова за потискане на рака. Често, обаче възможностите за имунологичен надзор над туморите са нарушени поради наличие на разнообразни имуномодулаторни механизми, които са обект на интензивно проучване. Тези механизми включват намалена до липсваща експресия на класически HLA клас I молекули, която се наблюдава при повечето неопластично-трансформирани клетки и по този начин избягване на HLA-медииранияят имунен отговор. С оглед ролята на NKG2D-MIC взаимодействието за иницииране на HLA независим цитотоксичен имунен отговор, в последните години тези системи са обект на интензивно проучване с оглед изясняване на механизмите на модулиране и възможното терапевтично повлияване. Разпознаването на MICA/MICB експресирани върху туморните клетки от NKG2D рецептора на цитотоксичните ефекторни клетки е инициращото събитие за отстраняване на туморните клетки.

Освен повърхностно свързани, MICA молекулите съществуват и в разтворима форма (soluble MICA - sMICA) – механизъм използван от туморните клетки за избягване на MIC-NKG2D медиирано разпознаване от имунната система. sMICA се генерира чрез протеолитично срязване на трите екстрацелуларни домена на молекулата от металопротеиназа (ADAM) - процес известен като „MICA срязване" (180). Срязаната sMICA молекула взаимодейства с NKG2D рецептора, което води до интернализацията и лизозомна деградацията на рецептора във вътрешността на ендозоми, което индуцира слаб отговор към клетките експресиращи NKG2D лиганда (181). Наред с MICA срязването, микро-РНКи в туморните клетки потискат допълнително експресията на MICA, за да избегнат имунно-разпознаване. За разлика от повърхностно свързаната MICA молекула, която стимулира имунния отговор, разтворимата форма sMICA потиска имунния отговор от една страна като не позволява на клетките на имунната система да разпознаят, кои точно са трансформираните клетки експресиращи MIC, а от друга като потиска експресията на NKG2D на повърхността на CD8+ T и NK клетките и по този начин допълнително инхибира MICA-NKG2D медиирано разпознаване от имунната система (182). Установено е, че на повърхността на T клетките в периферната кръв, както и на повърхността на CD8+ T клетките, броя на NKG2D рецепторите е редуциран в резултат от асоциацията на имунния рецептор с циркулиращ разтворим MICA (183). Този механизъм редуцира имуногенността на злокачествените образувания, промотира туморна прогресия и избягване на имунния отговор. Високи нива на sMICA са наблюдавани в серуми на пациенти с ракови заболявания, но не и при здрави индивиди (178,184–187) и обикновено тяхното ниво корелира с етапа на развитие и метастазиране на тумора (187). Освен при пациенти със

злокачествени заболявания sMICA се отчита в серуми на пациенти с автоимунни заболявания и остри вирусни инфекции (176,188,189). Известни са още два допълнителни механизма при тумори за репресия на NKG2DL (NKG2D лиганди): инхибиране на транскрипцията на NKG2DL гените посредством хистон деацетилази, демонстрирано при левкемия и епителни тумори (190,191) и свръхекспресия на микро-РНКи (192). Допълнително, някои MICA алели (най-често срещания от които MICA*008) кодират скъсени, GPI-свързани молекули, които не могат да бъдат протеолитично срязани, а се отделят под формата на екзозоми (193), които се явяват мощни инхибитори на имунния отговор. Ролята на отделните полиморфни варианти се потвърждава и от проучвани върху MICA-129Met/Val диморфизма и NK клетъчната активност и асоциацията с различни неоплазии (194–197). Isernhagen и сътрудници (195,198) показват, че MICA-129Met предизвиква по-силна дегранулация и продукция на IFN-γ. Допълнително определени полиморфни варианти в MICA, определят повишен афинитет на свързване с NKG2D рецептора и съответно по-добър отговор към неопластично трансформирани клетки. Липсват генетични проучвания върху асоциацията на MICB и неоплазии. Необходими са допълнителни комплексни проучвания върху генетичния полиморфизъм на MICA/MICB лигандите с оглед изясняване на част от механизмите за имуномодулация на раковите заболявания.

По-голямата част от злокачествените образования се развиват в резултат на комбиниран ефект от генетична предиспозиция и излагане на карциногени от околната среда. Няколко проучвания доказват значението на унаследяването за развитието на рак на устната кухина, като според проучване на Garavello и сътрудници (2008) шанса родните от първа линия (родители, братя и сестри, и деца) на заболели с орален карцином да развият заболяването е по-голям (OR = 1.1 - 3.8) (199). Отслабения имунен отговор също е важен фактор предразполагащ за развитието на орална неоплазия. Така например по-голяма вероятност за развитие на орален карцином имат индивиди заразени с човешки имунодефицитен вирус (ХИВ), пациенти подложени на органна трансплантация или такива, които са на имуносупресивна терапия (200,201). През последните години усилено се проучват патогенетичните механизми, залегнали в основата на развитие на пренеоплазии. Предходни проучвания върху генетичния полиморфизъм на NK клетъчните рецептори и техните HLA лиганди показват силни предразполагащи и протективни асоциации при различни неоплазии. Особен интерес във връзка с механизмите на изплъзване на туморите от имунологичен надзор предизвикват некласическите гени в HLA клас I региона – MIC.

В резултат на по-голямата чувствителност на бързо регенериращите се епителни клетки към канцерогенни агенти, най-широко разпространените злокачествени заболявания са тези от епителен произход. Устната кухина е често излагана на карциногенни агенти, главните от които са тютюнът и алкохолът (особено комбинацията от двата фактора). Човешкия папилома вирус (Human papillomavirus - HPV) се смята за етиологичен фактор за развитие на орален карцином, като е отговорен за развитието на не повече от 10% случаите (202). Според световната здравна организация WHO в световен мащаб ракът на устната кухина заема шесто място сред всички злокачествени заболявания (2%-4%) (203). Оралните тумори включват група неоплазии засягащи всеки регион на устната кухина, фарингеалните области и слюнчените жлези (203). Най-често срещаната орална неоплазия с епителен произход е оралния спиноцелуларен карцином (Oral squamous cell carcinoma - OSCC), който представлява около 90% от всички случай на рак на устната кухина (204). Честота на заболеваемост с OSCC, варира значително в зависимост от географското местоположение, като тя е най-голяма в Индия – около 45% (205). По епидемиологичните данни от различни популационни проучвания OSCC е по-често срещан при мъже в сравнение с жени, със средна възраст на заболеваемост около 62 години (203,206–209). Асоциацията на MICA полиморфизма с OSCC е изследвана само в 3 популации, като получените данни са противоречиви.

Таблица 5. Асоциация MICA полиморфизъм и OSCC

Популация	**Алел**	**Асоциация**		**Реф.**
		P/P_C	**OR**	
Тайванска	MICA-A6	0,002	2.64 (1.39–5.02)	(210)
Холандска	MICA-A9	0,01	NA	(211)
Японска	MICA*008	0,021	1,66	(212)
	MICA*008	0,038	1,37	(178)

OR (Odds ratio) – съотношение на шансовете; Реф. – референции.

При две проучвания в японската популация изследващи STR полиморфизма в екзон 5 на MICA е установена статистически значима повишена честота на MICA-A5.1 алела кодиращ скъсен MICA протеин при пациенти с OSCC в сравнение със здрави контроли (178,212). Пациенти хомозиготни по този алел имат по-високи серумни нива на sMICA и по-ниска преживяемост (178). Проучване в холандската популация изследващо пациенти със спиноцелуларен карцином (Squamous cell carcinoma - SCC) карцином на

главата и шията, наблюдава статистически значима висока честота на A9 алела само при пациенти с орален SCC. При носителите на този алел обаче не се установява наличието на разтворим MIC в серумите (211). При проучване асоциацията HLA и/или MICA алели с патогенезата на SCC на главата и шията отново в холандската популация, статистически значими асоциации с OSCC се установяват само за HLA-B алели и хаплотипи (B*40, B*35, B*40-DRB1*13), но така асоциация с MICA алел не е установена. HLA-B-MICA хаплотипен анализ обаче разкрива тенденция към асоциация на B*40 с MICA-A5.1 STR полиморфизма (125). Стратегиите за терапевтично приложение на данните събрани за MICA/B полиморфизма трябва да бъдат насочени към откриване на лекарства/съединения, които могат да инактивират ERp5 и/или разтворимите sMICA (43). Антитела срещу MICA също могат да се използват като терапевтични средства, тъй като те могат да намалят нивата на циркулиращи разтворими sMICA, да противодействат на имунологичното потискане и да стимулират антитуморната цитотоксичност (213). От друга страна подходи, които потискат убиквитинацията и микро-РНКи, използвайки химични агенти, могат да помогнат за запазване на експресията на MIC по време на вирусна инфекция (214,215). Значението на полиморфизма на MICA и неговите функционални аспекти постепенно се изясняват. Подробното проучване на MICA, по-специално отделните алелни форми и кодираните от тях молекули с различни патобиологични роли и механизми на действие ще позволи да се развият ефективни терапевтични стратегии за болести, медиирани от MICA.

С напредването на възрастта хомеостазата и регенеративните функции в организма се влошават, което е предпоставка за развитието на възрастово-асоциирани патологии, сред които и рак. С течение на времето в клетките се натрупват ДНК повреди, като при физиологични условия тези клетки завършват с репликативното стареене и/или апоптоза. Това са едни от механизмите стоящи в основата на предпазването на организма от образуване на ракови клетки, като същевременно стоят в основата на главните възрастово асоциирани изменения на организма. Може да се каже, че познатите до този етап процеси, стоящи в основата на стареенето от една страна, а от друга в основата на образуване на злокачествените заболявания, в някой отношения си приличат, а в други – се различават съществено (216). Така например и двете състояния могат да се характеризират с теломерно скъсяване, епигенетични промени и нарушен метаболизъм. От друга страна, трансформираните клетки са „хипер активни“ клетки, характеризиращи се с натрупването на мутации, даващи им преимущество в избягване механизмите на програмирана клетъчна смърт, докато стареещите клетки се

характеризират с намалена активност и намалена способност за възпроизвеждане. По-доброто разбиране на общите и съответно различните механизми стоящи в основата на стареенето и туморогенеза, би довело до развитието на стратегии и терапии насочени срещу повлияване на двете състояния едновременно – забавяне процесите на репликативно стареене и ранна профилактика за неоплазии с цел превенция или по-добро терапевтично повлияване на патологията.

VI. Обобщение

Бързите темпове на промяна във възрастовата структура на съвременните общества представлява предизвикателство за здравната система. Застаряващото население е висок рисков фактор за развитието на редица хронични заболявания, което води до увеличено търсене на медицинска помощ и изисква по-добре подготвени медицински специалисти. Мнозинството проучвания изследващи различните състояния на отклонение от нормалната жизнена дейност на организма, се концентрират върху изучаване на индивиди засегнати от съответния абнормален ефект, тъй като при тях лесно могат да се открояят генетичните или други биологични разлики, стоящи в основата на проявата. Последните години, голям интерес от изследователска гледна точка представлява точно противоположната стратегия: изследване на възрастни индивиди, които са успели да достигнат определен етап от жизнения си цикъл (над 65 години), без да развият хронични заболявания. Изследването на такива индивиди, би могло да разкрие каква е тяхната тайна – какво седи в основата на биологичните им успех да се запазят ментално и физически здрави, въпреки напредването на възрастта и всички съпътстващи я промени. Според едни от водещите изследователи в сферата, в основата на процесите на „успешно“ стареене стоят гени, които от една страна намаляват риска за развитието на хронични заболявания, а от друга такива, които придават устойчивост на разрушаващия им ефект. Откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към развитието на хронични заболявания ще допринесе за развитието на стратегии за поддържане на оптимални функции във възрастния организъм.

Основната научна хипотеза на настоящия дисертационен труд, е че дълголетието се асоциира с гени, регулиращи имунологичните функции, като полиморфизмът на тези гени може да повлияе процесите на „успешно остаряване“ и дълголетие чрез модулиране на отговора на индивида към живото-застрашаващи заболявания. Изучаването на HLA генетичната система, като главен модулатор на имунния отговор и

асоциацията й с процесите на успешно стареене са обект на засилен изследователски интерес през последните десетилетия. На база на обобщени данни от различни популационни проучвания може да се изведе предположението, че дълголетието вероятно се асоциира със селекция на HLA алели и хаплотипи, които осигуряват устойчивост към заболявания. Изхождайки от значението на класическите, антиген-представящи HLA клас I и клас II молекули за активиране на придобития имунитет и значението на некласическите HLA клас Ib (HLA-E, -F, -G,-H) и клас I свързаните MICA и MICB молекули за индуциране на антиген-зависим и антиген-независим имунен отговор, осигурявайки различни механизми защита на организма срещу инфекциозни, автоимунни заболявания и тумори, изследването на полиморфизма в тази група гени при клинично здрави възрастни индивиди от българската популация вероятно ще доведе до откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към заболявания. Поради сложната генетична същност и организация на HLA региона обаче е необходимо използване на най-съвременните секвенционни технологии от следващо поколение (NGS), което ще позволи определянето на значително по-голям брой информативни маркери с по-добра чувствителност и разграничителна способност. Генетични изследвания на класическите и некласическите HLA гени и извеждането на разширени имунологични профили, ще доведат до по-добро разбиране механизмите на дълголетието и могат да бъдат приложени като нови таргети при имунотерапия и имунофармакология.

Стареенето е главен рисков фактор за развитието на злокачествени заболявания. Оралния спиноцелуларния карцином (OSCC) представлява 90% от оралните неоплазии, характеризиращ се с по-висока честота на проява с напредване на възрастта и средна възраст на диагностициране около 62 години (283). В контекста на механизмите стоящи в основата на „успешното“ стареене, интерес представлява сравняването на генетичния фон на здрави, дълголетници от българската популация и на индивиди диагностицирани с тази агресивната неоплазия. В частност изследването на алелния полиморфизъм на стрес-индуцируемите MIC гени, чиято роля е описана в редица проучвания като благоприятстваща иницииране на HLA независим цитотоксичен имунен отговор и унищожаването на туморни клетки, би хвърлило допълнително светлина върху генетичната същност на дълголетието в българската популация. Допълнително, 92% до 98% от случаите на туморите в лицево- челюстната област при своето развитие имат пред-туморен стадий, като ранната диагностика с цел превенция

развитието и/или прилагане на навременна терапия с цел контрол над заболяването, са от изключително значение, като в тези случай преживяемостта на пациентите достига до 80%. Изследването на MIC полиморфизма при пациенти от българската популация диагностицирани с OSCC ще доведе до извеждането на популационно специфични биомаркери, асоциирани съответно с повишен и/или намален риск от развитието на оралната неоплазия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изясни ролята на полиморфизма на класическите и некласическите HLA гени определени чрез методи с висока разграничителна способност при дълголетие.

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

1. Въвеждане на нова технология секвениране от следващо поколение (NGS) за анализ на класически и некласически HLA гени.
2. Изследване на полиморфизма на класически HLA гени (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) при здрави млади и възрастни индивиди от българската популация
3. Проучване на полиморфизма на некласическите HLA клас I свързани MIC и некласическите HLA клас Ib гени (HLA-E, -F, -G, -H) гени в българската популация.
4. Проучване на разпределението на некласическите алели и хаплотипи при здрави млади и възрастни индивиди от българската популация
5. Определяне на алели и хаплотипи, асоциирани с дълголетие в българската популация.
6. Определяне на MICA и MICB полиморфизми при пациенти с орален спиноцелуларен карцином (OSCC) и извършване на сравнителен анализ с контролна група здрави индивиди от българска популация и селекционирана група здрави възрастни индивиди.
7. Определяне на серумни нива на разтворими MICA и MICB молекули при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и здрави индивиди от българската популация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

I. Материали

В проучването са включени две независими групи здрави индивиди от българската популация: възрастни здрави индивиди на възраст над 65 години с фамилна анамнеза за дълголетие и млади здрави индивиди на възраст до 35 години. Здравите възрастни индивиди от българската популация са селекционирани съобразно SENIEUR протокола, а здравите млади индивиди са селекционирани съобразно JUNIER протокола (218).

Таблица 6. Характеристика на изследваните индивиди и тяхното разпределение по пол и възраст

		Брой изследвани индивиди			Възраст (г)		Пол	
Изследвани гени		**Възрастни**	**Млади**	**Общо**	**Възрастни**	**Млади**	**Възрастни**	**Млади**
Некласически HLA	**MICA**	40	92	132	65 - 99 (74,8)	20 - 35 (25,9)	25 Ж; 15 М	62 Ж; 30 М
	MICB	40	78	118	65 - 99 (74,8)	20 - 35 (25,5)	25 Ж; 15 М	53 Ж; 25 М
	HLA-E, -F, -G, -H	40	22	62	65 - 99 (74,8)	20 - 35 (25,2)	25 Ж; 15 М	16 Ж; 6 М
Класически HLA	**HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1**	94	541	635	65 - 99 (77,9)	18 - 35 (26,4)	55 Ж; 39 М	290 Ж; 251 М

Представени са броя изследвани индивиди и разпределението по пол и възраст в зависимост от изследваната група гени. В скоби е представена средната възраст на изследваната група. Ж, жени; М, мъже.

Изследваната група от пациенти с оралната неоплазия, орален спиноцелуларен карцином включва 30 пациенти диагностицирани въз основа на клинични и хистологични изследвания (таблица 7). Пациентите са диагностицирани в Специализираната болница за активно лечение по лицево-челюстна хирургия (СБАЛ по ЛЧХ) – София, Факултет по дентална медицина и Клиника по УНГ болести към УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“. Включените индивиди са на възраст между 55 г. и 85 години, като 63.3 % от пациентите са на възраст над 65г. Всички пациенти са включени в изследването след писмено деклариране на информирано съгласие.

Таблица 7. Характеристика на включените в изследването пациенти и здрави индивиди

	Пациенти OSCC (n=30)	**Здрави дълголетници (n=40)**	**Здрави индивиди (n=132)**
Пол			
Жени	11	25	87
Мъже	19	15	45
Възраст			
Средна възраст	66.0	74.0	40.7
Диференциация на карцинома			
G1 | G1-G2	8		
G2 | G2-G3	11		
G3	4		
Неопределени	7		

n – брой изследвани индивиди; G1 – добре диференциран тумор; G2 – умерено диференциран; G3 – ниско диференциран.

II. Методи

1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв

Използва се системата iPrep™ (Invitrogen, USA) с кит за екстракция iPrep PureLink® gDNA™, която позволява бързо (~35 мин) и автоматизирано изолиране на геномна ДНК от прясна и/или замразена периферна кръв, както и от концентрирани левкоцитни проби (buffy coat).

Методът се базира на използването на монодисперсни магнитни микросфери (Dynabeads® MyOne™ SILANE), които свързват геномната ДНК за своята оптимизирана силиконова повърхност. Най-напред клетките се лизират посредством лизиращ буфер, а протеините се разграждат от протеиназа К. Получения лизат се смесва с магнитните микросфери с цел улавяне на отрицателно зареденатa геномна ДНК за положително зареденатa повърхност на микрочастиците. Отделянето на магнитните микросфери свързали ДНК от лизата се осъществява чрез магнитен разделител. С цел премахване на допълнителни замърсявания, микрочастиците се измиват с измиващ буфер (Wash Buffers), след което геномната ДНК се елуира в отделна епруветка чрез елуиращ буфер (Elution Buffer).

Изпълнение на метода:

1. Като изходен материал се използва 350 µL периферна кръв (или концентрирана левкоцитна проба). Приготвя се и празна епруветка, в която ще се извърши елуирането.
2. За всяка кръвна проба се приготвя единичен стрип, съдържащ магнитни микросфери и разтвори (iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit). Стрипът се вортексира внимателно и се следи за пълна ресуспензия на магнитните микросфери.
3. Стрипът се поставя в автоматичния апарат за ДНК изолиране (iPrep™), а двете предварително подготвени епруветки (с периферна кръв и тази за елуиране) се поставят на определените за тях места на стрипа. Задава се начало на екстракцията. Крайният обем на елуиране е 100 µl.
4. Концентрацията на изолираната ДНК се определя спектрофотометрично на апарат GeneQuant™ (GE Healthcare, USA) или флуориметрично чрез Qubit™ 2.0 и кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific Corp., USA).
5. Изолираната ДНК е съхранявана на +4^{o}C за няколко седмици или при -20^{o}C за по-продължителен период от време.

2. Методи за типизиране на класически и некласически HLA чрез NGS

2.1.AlloSeq Tx17

За целите на настоящия дисертационен труд за първи път у нас бе въведена нова технология секвениране от следващо поколение (AlloSeq Tx17 – CareDx), която позволява едновременно типизиране с висока разграничителна способност на 8 класически HLA локуса: HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1, -DPB1, -DQA1, -DPA1, както и на 6 некласическите HLA клас I гени: HLA-E, -F, -G, -H, MICA и MICB. Тази нова технология се различава от стандартното NGS секвениране, по това, че таргетните гени не се амплифицират чрез PCR, а се улавят посредством хибридизиране с къси фрагменти (сонди) на повърхността на магнитни микросфери. Тези фрагменти са комплементарни на консервативни участъци в рамките на изследваните гени. Предимство на тази технология е, че позволява обхващане на цели гени (екзони и интрони) или всички екзони на таргетните гени, което е лимитация на PCR-базираното секвениране, особено при наличието на дълги интрони между екзоните. NGS методиката е многостепенен процес, като най-общо може да се раздели на три основни етапа: подготовка на библиотеката, секвениране и анализ на резултатите.

Изпълнение на метода:

Подготовка на библиотеката:

1. Тагментиране

1.1.В отделни гнезда на 96-ямкова 0.2 ml PCR плака за всяка проба се прибавят по 10µL от 10-100 ng/µL ДНК.

1.2.Приготвя се тагментационен мастер микс от следните реагенти:

Реагент	**Количество на проба (µL)**	**Количество за 24 проби + 10% излишък (µL):**
Тагментационен буфер	10	264
Стерилна вода	20	528
Тагментационни микросфери	10	264
Общо количество	40	1056

1.3.Приготвената смес се миксира чрез вортексиране, след което се центрофугира за кратко.

1.4.Добавя се по 40 µL от тагментационен мастер микс към всяка ямка с предварително накапана ДНК проба.

1.5.Плаката се запечатва с фолио и се центрофугира на 280 x g за 30 секунди

1.6.Плака се поставя във висококоростна клатачка за микроплаки (BioShake iQ) и се клати за 1 минута на 1600 rpm

1.7.Плаката се проверява визуално за:

а) За наличие на микросфери, които не са равномерно разпределени в ямката. При наличие на такива стъпка 7 се повтаря.

б) Ако сместа се е разпръснала върху фолиото или по стените на ямката – извършва се кратко центрофугиране и се повтаря стъпка 7.

1.8.Плаката се поставя в PCR апарата и се стартира следната тагментационна програма:

Количество реакционна смес: 50

Температура	**Време**
55°C	5 минути
10°C	2 минути

2. Пречистване с цел премахване на несвързаните ДНК фрагменти

2.1.След приключване на програмата, незабавно плаката се вади от PCR апарата и се оставя на стайна температура за 2 минути.

2.2.Добавя се по 10 µL стоп буфер и плаката се запечатва отново с фолио

2.3.Плака се поставя на клатачка за микроплаки и се клати за 1 минута на 1600 rpm

2.4.Плаката се инкубира за 5 минути на стайна температура.

2.5.По време на инкубацията, PCR микса и индексите се изваждат от фризера, за да се размразят, след което се поставят върху лед/леден блок.

2.6.Плаката се инспектира визуално за разпръсната смес по фолиото или по стените на плаката. При наличие на такава плаката се центрофугира.

2.7.Реакционната смес се измива три пъти с тагментационен измиващ буфер, както следва:

а) Фолиото се премахва и плаката се поставя върху магнит за 1 минута.

б) Супернатантата се отстранява, без да се нарушава целостта на микросферите в ямките.

в) Бавно се добавя 100 µL тагментационен измиващ буфер към всяка ямка.

г) Плаката отново се запечатва с фолио и се поставя на клатачка за микроплаки и се клати за 2 минути на 1800 rpm на стайна температура

д) Ако пробите се разпръснат върху фолиото, плаката се центрофугира при 280 x g за 30 секунди

е) Стъпките от а) до е) се повтарят два пъти за общо 3 измивания.

3. Индексиране - необходимите индекс адаптори са разпределени в 6 индекс 1 (i7) епруветки и в 4 индекс 2 (i5) епруветки, по този начин позволявайки едновременно анализиране на до 24 проби. Преди употреба индексите се изваждат от фризера и се темперират на стайна температура, след което се центрофугират (~1минута) и се поставят върху лед/леден блок до момента на използване.

3.1. Преди отстраняването на супернатантата от третото (последно) измиване, се подготвя PCR мастер микс, както следва:

Реагент	**Количество на проба (µL)**	**Количество за 24 проби + 10% излишък (µL):**
Стерилна вода	20	528
PCR микс	20	528
Общо количество	40	1056

3.2. Фолиото се отлепя, като плаката се поставя върху магнит за 1 минута.

3.3. Премахва се супернатантата от последното тагментационно миене и плаката се отстранява от магнитната стойка.

3.4. Добавя се 40 µL PCR мастер микс към всяка ямка и плаката се запечатва с фолио.

3.5. Плаката се поставя на клатачка за микроплаки да се клати за 2 минути на 1800 rpm на стайна температура, след което се центрофугира на 280 x g за 1 минута.

3.6. Преди да бъдат използвани, индексите се центрофугират.

3.7. Към всяка ямка последователно се добавят по 5µl от индекс i7 (H705, H706, H707, H710, H711, H14) и по 5µl от индекс i5 (H503, H505, H506, H517)

3.8. След накапване на всички индекси, плаката се запечатва с фолио и се поставя на клатачка за микроплаки да се клати за 1 минута, на 1800 rpm, на стайна температура.

3.9. Плаката се центрофугира на 280 x g за 10 секунди, след което визуално се инспектира за равномерно разпределение на микросферите в реакционната смес.

3.10. Плаката се поставя PCR апарат и се стартира следната програма:

#	**Температура**	**Време**	**Брои цикли**
1	72°C	3 минути	1
2	98°C	3 минути	1
3	98°C	20 секунди	9

4	60°C	30 секунди	
5	72°C	3 минути	
6	72°C	3 минути	1
7	10°C	∞	1

На този етап библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15 ° C до -25 ° C до 1 седмица.

4. Пречистване и селекция на фрагментите по размер – използват се пречистващи, магнитни микросфери (Purification beads). Преди преминаване към изпълнението на тази стъпка от протокола е необходимо магнитните микросфери да се темперират на стайна температура най-малко 30минути преди започване. Допълнително е необходимо да се приготви пресен 80% разтвор на етанол, както следва:

Реагент	**Количество за 24 проби + 50% излишък (µL):**
100% Етанол	11520
Стерилна вода	2880
Общо количество	14400

4.1. Приготвя се разреден разтвор на пречистващите, магнитни микросфери, като към 2592 µL Purification beads се добавят 3888 µL стерилна вода (краен обем 6480 µL).

4.2. В 96-ямкова X 0.8mL дълбокодънна плака (MIDI Plate), се накапват по 225 µL от разредените магнитни микросфери (в ямки на позиции съответстващи на 96-ямкова 0.2 ml PCR плака).

4.3. С помощта на пипета се смесват разделените микросфери и супернатанта от предходната стъпка на индексиране, след което 45 µL от всяка смес се прехвърля в съответната ямка на MIDI плаката, съдържаща разредените, пречистващи магнитни микросфери.

4.4. Дълбокодънната MIDI плака се запечатва с фолио, след което се поставя на клатачката за 2минути на 1800 rpm.

4.5. Плаката се инкубира на стайна температура за 5 минути. По време на тази инкубация фрагментите с най-голяма дължина се свързват за микросферите.

4.6. Центрофуга на 280 x g за 1 минута.

4.7. Фолиото се отлепя и плаката се поставя на магнитна плоча за 5 минути.

4.8. 260 µL от супернатантата се прехвърлят в нова дълбокодънна MIDI плака или в чисти, неизползвани ямки на същата плака

4.9. Добавят се 20,8 µL неразредени пречистващи, магнитни микросфери (Purification beads) към всяка проба, след което плаката се запечатва с фолио.

4.10. Поставя се на клатачката на 1800rpm за 1 минута, след което плаката се инкубира на стайна температура за 5 минути. По време на тази инкубация фрагментите с таргетен размер (~800bp) се свързват за микросферите.

4.11. Фолиото се отлепя и плаката се поставя на магнитна плоча за 5 минути.

4.12. С помощта на пипета, се аспирира и изхвърля супернатанта от всяка ямка, като се внимава да не се наруши целостта на микросферите оставащи в гнездата.

4.13. Без да се премахва плаката от магнита, магнитните микросфери се промиват два пъти с 80% етанол, както следва:

а) Добавя се 200 µL 80% етанол към всяка проба.

б) Инкубира се за 30 секунди на стайна температура.

в) Супернатантата се аспирира и премахва.

г) Стъпки от а) до в) се повтарят до общо 2 измивания.

4.14. След премахване на супернатантата от последното миене от всички ямки, плаката се оставя върху магнитната плоча за 5 минути, което цели да се изпари цялото остатъчното количество етанол.

4.15. Към всяка ямка се добавя по 17 µL ресуспендиращ буфер, за елуиране на таргетните фрагменти.

4.16. Плаката се запечатва и се поставя на клатачката за 2 минути на 1800 rpm.

4.17. Следва инкубиране на плаката за 5 минути при стайна температура и центрофугиране на 280 x g за 30 секунди.

4.18. Фолиото се отлепва и плаката се поставя на магнитната плоча за 5 минути.

4.19. 15 µL супернатанта се прехвърлят в нова 0.2 ml PCR плака.

На този етап библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15 ° C до -25 ° C до 1 месец.

5. Обединяване на библиотеките

5.1. При обединяването на 12 проби или по-малко, от всяка библиотека се иззема по 2,5 µL и се обединяват в една епруветка от 0.2 mL на PCR стрип и се добавя ресуспендиращ буфер до краен обем от 30 µL. Преминава се директно към стъпка на хибридизация (без концентриране).

5.2. При обединяването на повече от 12 проби от всяка библиотека се изземат по 2,5 µL и се обединяват в 1.5 mL микроцентрофужна епруветка (Епендорф). Извършва се стъпка на концентриране.

6. Концентриране

6.1. Към 1.5mL микроцентрофужната епруветка, съдържаща обединените библиотеки се прибавят 108 µL Purification beads

6.2. Епруветката се вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Центрофугира се за кратко.

6.3. Инкубира се на стайна температура за 5 минути. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява.

6.4. Без да се премахва от магнитния държател, микросферите се промиват два пъти с 80% етанол, както следва:

а) Добавя се 200 µL 80% етанол.

б) Инкубира се за 30 секунди на стайна температура.

в) Супернатантата се аспирира и премахва.

г) Стъпки от а) до в) се повтарят до общо 2 измивания.

6.5. Епруветката се оставя отворена върху магнитния държател в продължение на 5 минути за да се изпари остатъчното количество етанол.

6.6. Добавя се 32 µL ресуспендиращ буфер в епруветка, за елуиране на библиотеките.

6.7. Епруветката се вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти, след което се инкубира на стайна температура в продължение на 5 минути. Центрофугира се за кратко.

6.8. Епруветката се поставя на магнитния държател за 1 минута.

6.9. 30 µL от супернатанта се прехвърлят в нова епруветка от 0.2 mL на PCR стрип.

На този етап, библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15°C до -25°C до 1 седмица.

7. Хибридизация: преди изпълнението на тази стъпка е необходимо предварително загряване на хибридизационен буфер 1 на 50°C за 15 минути в загряваща система Hybex. След инкубацията буфера се вортексира и инспектира визуално за наличие на преципитати – при наличие на такива се загрява за допълнителни 15 минути отново на 50°C.

7.1. За всяка хибридизационна реакция се комбинират следните реагенти в епруветка на PCR стрип:

Реагент	Количество за една библиотека (µL)
Обединена библиотека	30
AlloSeq Tx панел от сонди	10
Хибридизационен буфер 1	50
Хибридизационен буфер 2	10
Общо количество	100

7.2. Всяка хибридизационна реакция се миксира добре посредством пипетиране нагоре и надолу 10 пъти, след което кратко се центрофугира.

7.3. PCR стрипа се поставя PCR апарата и се стартира следната програма:

Количество на реакционната смес: 100 µL
Предварително загрят капак на PCR апарат: 100°C

#	Температура	Време	Брои цикли
1	98°C	5 минути	1
2	98°C - 62°C, спада с 2°C на цикъл	1 минута	1
3	Връщане на стъпка 2 за още 18 цикъла (общо 19 цикъла)		
4	62°C	90 минути	1
5	62°C	∞	1

7.4. PCR стрипа не се вади от апарата, докато реактивите необходими за изпълнение на следващата стъпка не са готови за работа. Необходимо е улавящите микросфери (Capture Beads) да са темперирани на стайна температура най-малко 30минути преди работа и загряване на Hybex системата до 58°C, където да се инкубира Capture Wash Buffer. Когато не се използва Capture Wash Buffer трябва да се държи в загряващата Hybex системата, за да подържа 58°C. Веднага се преминава към следващата стъпка от протокола, реакционната смес не може да се съхранява!

8. Улавяне на таргетните фрагменти:

8.1. Приготвя се елуиращ мастер микс, както следва:

Реагент	Количество за една библиотека (µL)
Улавящ елуиращ буфер 1	28,5
2N NaOH	1,5

8.2. За всяка хибридизационна реакция се добавят 250 µL от улавящите микросфери (Capture Beads) в нова 1,5 ml микроцентрофужна епруветка.

8.3. Към улавящите микросфери се прибавят 100 µL от хибридизационна смес от предишната стъпка.

8.4. Епруветката се вортексира на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Не се центрофугира. Инкубира се на 58 ° C в Hybex системата за 15 минути, след което се центрофугира за кратко.

8.5. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява.

8.6. Микросферите се промиват три пъти с Capture Wash Buffer, както следва:

а) Епруветката се премахва от магнитния държател.

б) Добавят се 200 µL от загретия Capture Wash Buffer (58 ° C).

в) Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Не се центрофугира.

г) Епруветката се инкубира на 58 °C в загряващата Hybex система за 5 минути, след което се центрофугира за кратко.

д) Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява.

е) Стъпки от а) до е) се повтарят още два пъти за общо 3 измивания.

8.7. Микроцентрофужната епруветка се премахва от магнитния държател и се добавят 200 µL от загретия Capture Wash Buffer (58°C).

8.8. Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Не се центрофугира.

8.9. Цялото съдържание (измиващ разтвор и микросфери) се прехвърля в нова 1,5 ml епруветка и се инкубира на 58°C в загряващата Hybex система за 5 минути, след което се центрофугира за кратко.

8.10. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута, след което супернатантата се отстранява. Центрофугира се за кратко и отново се поставя на магнитния държател за 1 минута. Премахва се цялото останало количество супернатанта. Епруветката се премахва от държателя.

8.11. Приготвения по-рано елуиращ мастер микс се вортексира и се добавят 23 µL към епруветката съдържаща улавящите микросфери. Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти.

8.12. Епруветката се инкубира на стайна температура в продължение на 2 минути, след което се центрофугира за кратко. Поставя се на магнитния държател за 1 минута.

8.13. В нова 0,2 епруветка на PCR стрип се прехвърлят 21 µL от супернатантата.

8.14. Добавят се 4 µL улавящ елуиращ буфер 2 (Capture elution buffer 2). Миксира се посредством пипетиране нагоре и надули 6-8 пъти (краен обем 25 µL).

На този етап библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15 ° C до -25 ° C до 24 часа.

9. PCR намножаване на таргетните фрагменти

9.1. Към уловените таргетни фрагменти на библиотеката се добавят 5 µL праймери и 20 µL PCR микс. Миксира се чрез пипетиране нагоре и надолу 10 пъти и се центрофугира за кратко.

9.2. PCR стрипа се поставя в PCR апарата и се стартира следната програма:

Количество на реакционната смес: 50 µL
Предварително загрят капак на PCR апарат: 105°C

#	Температура	Време	Брой цикли
1	98°C	30 секунди	1
2	98°C	1 минута	17
3	60°C	30 секунди	
4	72°C	3 минути	
5	72°C	5 минути	1
6	10°C	∞	1

На този етап библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15 ° C до -25 ° C до 1 седмица.

10. Пречистване: необходимо е пречистващите микросфери (Purification beads) да се темперират на стайна температура най-малко 30минути преди работа.

10.1. Приготвя се пресен 80% разтвор на етанол.

10.2. В нова 1,5 ml микроцентрофужна епруветка се добавят 27 µL пречистващи микросфери.

10.3. Прехвърлят се 45 µL от PCR реакционната смес в епруветката съдържаща микросферите.

10.4. Епруветката се вортексира на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Центрофугира се за кратко, след което се инкубира за 5 минути на стайна температура.

10.5. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява

10.6. Без да се премахва от магнитния държател, микросферите се промиват с 80% етанол два пъти, както следва:

а) Добавя се 200 µL 80% етанол.

б) Инкубира се за 30 секунди на стайна температура.

в) Супернатантата се аспирира и премахва.

г) Стъпки от а) до в) се повтарят до общо 2 измивания.

10.7. Епруветката се оставя отворена върху магнитния държател в продължение на 5 минути за да се изпари остатъчното количество етанол.

10.8. Епруветката се премахва от магнитния държател и се добавят 32 µL ресуспендиращ буфер за елуиране на целевите фрагменти. Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти, след което се инкубира на стайна температура за 5 минути. Центрофугира се за кротко.

10.9. Епруветката се поставя на магнитния държател за една минута, след което се прехвърлят 30 µL от супернатантата в нова 1.5 ml епруветка.

Библиотеките могат да се съхраняват при температура от -15 ° C до -25°C до 1 месец.

11. Подготовка на библиотеката за секвениране

11.1. Концентрацията на библиотеката се измерва флуориметрично чрез Qubit™ 2.0 и кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific Corp., USA);

11.2. Прилага се следната формула: (1*X)/Y=Z, където Y е измерената концентрация на библиотеката (ng/µl) конвертирана в nM, а X е необходимия краен обем разредена библиотека (µl). Резултата от тази формула (Z) е обема библиотека (µl), който ще се използва в следващата стъпка.

11.3. В нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка количеството библиотека Z се разрежда с ресуспендиращ буфер до краен обем X. По този начин се генерираната разредена библиотека с концентрация 1 nM.

11.4. На този етап разредената до 1 nM библиотека се денатурира и разрежда до концентрация от 5 pM. За целта в нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка се прехвърлят 5 µl от 1 nM библиотеката и към тях се добавят 5 µl 0.1N NaOH. Епруветката се вортексира, центрофугира се за кратко и се инкубира на стайна температура за 5 минути.

11.5. След края на инкубацията се добавят 5 µl ресуспендиращ буфер. Епруветката се вортексира и центрофугира за кратко.

11.6. Към епруветката се добавя 985 µl хибридизационен буфер (HT1). Не се вортексира, а се миксира посредством извършване на въртеливи движения на епруветката. Центрофугира се за кратко.

11.7. Необходимо е крайно разреждане на библиотеката до концентрация 1,6 pM. За целта се прилага следната формула: ((1,6pM*500µl) / 5) / Y = X, където 500µl е необходимия обем разредена и денатурирана библиотека за зареждане на секвенатора, а Y е броя библиотеки, които ще се комбинират за зареждане на секвенатора. Резултата от формулата (X) е количеството денатурирана и разредена библиотека, което се прехвърля в нова 1,5ml епруветка и към него се добавя хибридизационен буфер (HT1) до краен обем от 500µl.

11.8. В предварително размразената касета с реагенти се добавят 500µl от денатурираната и разредена библиотека. Касетата се поставя в секвенатора и се задава начало на секвенционния рън.

11.9. Анализ на данните - за анализ на секвенциите беше използван софтуерния продукт AlloSeq™ Assign. Програмата използва консенсусно генотипизиране чрез сравняване с база данни IPD-IMGT/HLA.

2.2.GenDx NGSgo

Китове за амплификация на GenDx (NGSgo-AmpX) са налични за следните класически HLA гени: HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DRB3/4/5, както и за некласическите HLA клас I свързани гени MICA и MICB. Локус-специфичната амплификация се извършва в апарат за полимеразна верижна реакция (PCR апарат), като реакционната смес съдържа локус-специфични праймери, геномна ДНК и PCR смес съдържаща ензим, dNTP-та и буфер. Класическите HLA клас I гени (HLA-A, -B, -C), както и клас I свързаните MICA и MICB гени имат пълно покритие при амплификацията. За HLA клас II, които се отличават с изключително дълги интрони се амплифицират само клинично значимите екзони. Амплификацията на некласическите MICA и MICB гени се осъществява при същите условия като на класическите HLA, което позволява комбиниране на амплификационните реакции на MICA/MICB и HLA локусите в един PCR апарат. Получените HLA и MIC ампликони за всяка проба могат да бъдат обединени заедно и да се премине към идентичния етап на подготовка на библиотеката.

Изпълнение на метода:

1. MICA и MICB амплификация

1.1. Оптималната ДНК концентрация за амплификация на MIC гените е 40 ng. Въпреки това концентрацията може да варира между 20 – 80 ng (в 1-2 µl). При

необходимост от разреждане на геномната ДНК за достигане на таргетна концентрация се използва вода за PCR без нуклеази.

1.2. Лиофилизираните MICA и MICB праймери се ресуспендират, като към всяка от епруветките се добавя по 106 µl вода без нуклеази. Внимателно се вортексира до разтваряне на праймерите, след което центрофугира.

1.3. Приготвят се отделни реакционни смеси за MICA и MICB локус-специфичните амплификации, както следва:

Реагент	**Количество на проба (µl)**
Вода без нуклеази	4.5 – 5.5
GenDx-LongMix (4x)	2.5
MICA/MICB праймери	1
Геномна ДНК	1-2
Общо количество	10

1.4. Реакционните смеси се миксират чрез пипетиране, след което се центрофугират за кратко.

1.5. В 96-ямкова PCR плака се накапват по 1 – 2 µl геномна ДНК и по 10 µl от PCR реакционните смеси за MICA и MICB (в отделни ямки).

1.6. Стартира се следната PCR програма:

Количество на реакционната смес: 12 µL
Предварително загрят капак на PCR апарат: 95°C

#	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
1	95°C	3 минути	1
2	95°C	15 секунди	35
3	65°C	30 секунди	
4	68°C	6 минути	
5	68°C	10 минути	1
6	15°C	∞	1

1.7. За да се провери правилното протичане на амплификацията, се осъществява гел електрофореза на ампликоните (по 2 µl) в 1% агарозен гел. Очаквания размер на ампликоните е около ~13 kb.

2. Амплификация на класически HLA гени

2.1. Оптималната ДНК концентрация за амплификация е 100ng в 1-5 µl краен обем.

2.2. Епруветките съдържащи локус специфичните лиофилизирани праймери най-напред се центрофугират (~1 мин), след което се ресуспендират, като към всяка от епруветките се добавя по 27 µl вода без нуклеази (за 24 реакции). Внимателно се вортексира до разтваряне на праймерите, след което центрофугира.

2.3.За всяка локус-специфична амплификационна реакция се приготвя отделен работен разтвор, както е описано в таблицата. HLA-DQB1 изисква добавянето на X-разтвор и двойно количество ензим на една реакция.

Реагент	**Количество на проба (µl)**	
	За всички локуси (без DQB1)	**DQB1**
Вода без нуклеази	14.85	9.45
X-разтвор (5x)		5
LongRange Ензимна смес (5 U/µl)	0.4	0.8
LongRange буфер (10X)	2.5	2.5
Смес dNTP (10 nM)	1.25	1.25
AmpX праймери	1	1
Геномна ДНК	5	5

2.4.Работните разтвори се вортексират внимателно и се центрофугират за кратко. В 96-ямкова PCR плака се накапват по 5 µl геномна ДНК и по 20 µl от PCR реакционните смеси, като всеки локус се накапва в отделна ямка.

2.5.Стартира се следната PCR програма:

Количество на реакционната смес: 25 µL
Предварително загрят капак на PCR апарат: 95°C

#	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
1	95°C	3 минути	1
2	95°C	15 секунди	35
3	65°C	30 секунди	
4	68°C	6 минути	
5	68°C	10 минути	1
6	15°C	∞	1

2.6.За да се провери правилното протичане на амплификацията, се осъществява гел електрофореза на ампликоните (по 2 µl) в 1% агарозен гел. Очаквания размер на ампликоните за отделните локуси е следния: за HLA-A, -B, -C от 3.1 до 3.4kb; DRB1 от 3.7 kb до 4.8 kb; DRB3: 3.8 kb; DRB4: 0.4 kb (екзон 2) и 1.3 kb (екзон 3); DRB5: 4.0 kb; DQA1: от 5.4 kb до 5.8 kb; DQB1 от 3.7 kb до 4.1 kb; DPA1: 4.7 kb; DPB1: 5.0 kb (за екзон 1) и 5.7 kb (екзони 2-5).

3. Определяне концентрацията на ампликоните: се извършва чрез използване на кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity. Необходимо е да се определи концентрацията на три репрезентативни проби от всеки локус. Селекцията на тези репрезентативни проби се извършва на база интензитета на ивиците от гел електрофорезата. Извежда се средноаритметична стойност на база трите измервания на концентрацията на всеки локус, която се счита за репрезентативна за всички проби изследвани за съответния локус.

3.1. Ампликоните се разреждат десет пъти преди да им бъде определена концентрацията посредством Qubit™ dsDNA HS. За мануално изчисляване на концентрацията се умножава определената от Qubit концентрация по фактора на разреждане (x10).

4. Еквимоларно обединяване на ампликоните: На този етап се обединяват само ампликоните на една и съща проба (не се обединяват различни проби).

4.1. Определя се средноаритметичната концентрация (ng/µl) на всеки локус на база репрезентативните измервания от точка 2.

4.2. От локуса с по-ниска средно аритметична концентрация се отпипетира количество между 1-5 µl (например 3 µl) в нова 96-ямкова PCR плака (за всички проби от съответния локус). По този начин концентрацията на съответния локус в ng е 3*X, където X е концентрацията на локуса в ng/µl. За да се определи количеството (в µl) необходимо да се изземе от втория локус, за постигане на еквимоларно обединяване на локусите, се изпълнява следната формула: (3*X)/ Y, където Y е концентрацията на втория локус в ng/µl. Отпипетира са съответното количество от втория локус и се накапва в ямката съдържаща ампликоните от първия локус на същата проба. По този начин различните локуси на една и съща проба са обединяват в еквимоларни концентрации.

4.3. Оптималната концентрация необходима за следващата фрагментационна стъпка е 250 ng. За да се определи какво количество е необходимо да се изземе от обединените ампликони е необходимо най-напред да се определи тяхната концентрация (ng/µl). Това може да се извърши чрез измерване на Qubit™ или мануално, като се раздели количество ng на общото количество µl след обединяването. След като се определи концентрацията на обединените ампликони (в ng/µl), получената стойност се разделя на таргетната концентрация: 250 ng. Получения резултат е количеството (в µl), необходимо да се изземе от всеки пул за следващата стъпка на фрагментация.

5. Фрагментация и поправка на краищата (End repair): За получаване на оптимални резултати, следващите стъпки на фрагментиране, лигиране на адапторите, обединяване на библиотеките и пречистване, се извършват последователно, без прекъсване. Извършва се върху леден блок.

5.1. В 1.5 ml Eppendorf епруветка се приготвя фрагментационна смес, както следва:

Реагент	Количество за 1 проба (µl)
Ампликони	Променлива (стъпка 3.3.)
Фрагментационен буфер	2
End Prep буфер	3.25
Фрагментационен ензим	1.5
End Prep Ензим	1.5
Вода без нуклеази	Променлива
Общо количество	32.5

5.2. Съответния обем за проба фрагментационна смес (без ампликоните) се накапва в нова 96-ямкова PCR плака, след което към него се прибавя изчисленото от т.3.3 количество обединени ампликони (250ng). Реакционната смес се вортексира и центрофугира за кратко.

5.3. Плаката се поставя в PCR апарата и се стартира следната програма:

Стъпка	Време (минути)	Температура
Фрагментация и поправка на краищата	20	25°C
Добавяне на поли (A) опашка	10	70°C
Охлаждане	*	15°C

5.4. След приключване на фрагментационната програма, незабавно се преминава към следващата стъпка.

6. Лигиране на адапторите: Преди използване NGSgo®-IndX индексите се вортексират старателно и центрофугират за най-малко 30 секунди.

6.1. Приготвя се реакционна смес за лигиране на адапторите, както следва:

Реагент	Количество за 1 проба (µl)
Лигазна смес	7.5
Лигиращ енхансер	0.5
Общо количество	8

6.2. Приготвената смес за лигиране на адапторите се вортексира внимателно, центрофугира се а кратко и се държи върху лед до момента на използване.

6.3. Към ДНК фрагментите от точка 4 (32,5 µl) се добавя по 8 µl от лигиращата смес и по 1,25 µl адаптори, като за всяка проба се използва различен адаптор. По този начин общото количество реакционна смес е 41,75 µl. Реакционната смес внимателно се вортексира и центрофугира за кратко.

6.4. Плаката се поставя в PCR апарата и се инкубира на 20°C за 15 минути, след което веднага се преминава към следващата стъпка от протокола.

7. Обединяване на библиотеките: След изваждане от PCR апарата, плаката се вортексира леко и се центрофугира за кратко. От всяка проба се отпипетират 10 µl и се обединяват в нова 1,5 ml Ependorf епруветка.
8. Пречистване и селекция на фрагментите по размер чрез използване на магнитни микросфери

8.1. Приготвя се реакционна смес за стъпката на селекция, като за N x 10 µl количество обединена библиотека, където N е броя на обединените проби се прибавя N x 10 x 0,45 µl количество магнитни микросфери (SPRI beads). Сместа се миксира много добре посредством вортексиране, след което се инкубира на стайна температура за 5 минути. Центрофугира се за кратко.

8.2. Епруветката се поставя на магнитен държател за около 5 минути, до наблюдаване на пълно разделяне на супернатантата от микросферите. Супернатантата се отделя.

8.3. Без да се премахва епруветката от магнитния държател, се прибавят 900 µl прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се на стайна температура за около 30 секунди и внимателно се премахва супернатантата. Тази стъпка се повтаря още два пъти за общо три измивания.

8.4. С цел изпарение на остатъчния етанол, епруветката се оставя с отворена капачка за около 3-5 минути.

8.5. За елуиране на таргетните фрагменти от микросферите, епруветката се премахва от магнитния държател и се прибавят 50 µl елуиращ буфер (10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween20, pH 8.0) или 0,1 TE буфер. Сместа се вортексира добре за около 30-60 секунди, центрофугира се за кратко, след което се инкубира на стайна температура за 2 минути.

8.6. Епруветката се поставя на магнитен държател за 5 минути, след което се прехвърлят 46 µl от супернатантата в нова 1,5 ml Ependorf епруветка.

9. Измерване на библиотеката и разреждане:

9.1. Концентрацията на библиотеката се измерва чрез използване на кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity (198 µl Qubit работен разтвор + 2 µl библиотека).

9.2. Необходимата таргетна концентрация за зареждане на Ion Chef™ апарата е 60 pM. За тази цел е необходимо най-напред конвертиране на концентрацията от ng/µl в nM, като се използва следната формула: (концентрация в ng/µl / (660 g/mol * 600 bp))*10^6, където 660 g/mol е средната молекулна маса на една базова двойка, а

600 bp е таргетния размер на фрагментите в библиотеката в базови двойки. За преобразуване на концентрацията от nM в pM се умножава по 1 000. Получената стойност е концентрацията на библиотеката в pM, която се разрежда до 60 pM в Low TE буфер в краен обем от 50 µl.

10. Емулсионен PCR: След подготовката на библиотеката, амплификационната реакция, при която се генерират милиони копия на ДНК фрагментите в библиотеката се извършва напълно автоматизирано от апарат Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Разредената библиотека, чипа (Ion 510, Ion 520 или Ion 530) и останалите консумативи необходими за осъществяване на реакцията се зареждат на апарата според инструкциите на производителя.
11. Секвениране: В рамките на един час след приключване работата на Ion Chef апарата, натовареният чип с намножени ДНК фрагменти се поставя в Ion GeneStudio S5 секвенционния апарат (Thermo Fisher Scientific, USA) и се задава начало на секвенционния рън.
12. Анализ – генерираните от Ion GeneStudio S5 секвенции са налични в интернет-базираната платформа. Анализа на генерираните секвенции се извърши на софтуер NGSengine (IMGT/HLA 3.38.0, Нидерландия).

2.3. Illumina TruSight HLA v2

Illumina TruSight HLA типизира с висока разграничителна способност 8 класически HLA локуса: HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1, -DPB1, -DQA1, -DPA1. Този метод също използва дълговерижен (Long Range) PCR за амплификация на дълги фрагменти характерни за HLA региона. Класическите HLA клас I гени, както и HLA-DQA1 и -DPA1 локусите на HLA клас II, се покриват изцяло, с изключение на 5`- и 3`-нетранслираните участъци на HLA-B локуса. За HLA-DRB1 и –DQB1 се покриват клинично значимите екзони, включително последователността на интроните. Не се покрива екзон 1 на HLA-DPB1 локуса поради дългия интрон 1. Необходимото количество ДНК за един тест е 400 ng.

Изпълнение на метода:

1. Амплификация:

1.1. Приготвят се две 96-ямкови 0.2 ml PCR плаки. В първата плака се прибавят по 5 µl локус специфични праймери за амплификацията на 7 HLA локуса (HLA-A, -B,

-C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DRB) според илюстрираната схема. Във втора плака се прибавят по 5 µl HLA-DQB1 локус специфични праймери.

1.2. Към всяка от ямките се прибавя по 5 µl ДНК. Всяка проба отговаря на една колона от плаката (12 проби за една плака).

1.3. В 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветки се приготвят локус-специфични реакционни смеси както следва:

Реагент	**Количество на 1 проба (µl)**
PCR смес	25
ДНК полимераза	2
Дейонизирана вода	13
Общо	40

1.4. Към съответните ямки на двете плаки се добавят по 40 µl от приготвените смеси. Плаките се центрофугират за кратко и след това се поставят в два PCR апарата (Veriti или GeneAmp 9700 с параметри на температурния блок PE 9600, Applied Biosystems);

1.5. За амплификация на HLA-DQB1 се използва програма 1, а за всички останали локуси се използва програма 2:

Програма 1 (DQB1)			
№	Температура	Време	Брой цикли
1	94°C	3 минути	1
2	94°C	30 секунди	10
3	55°C	2 минути	
4	72°C	15 минути	
5	94°C	30 секунди	20
6	60°C	2 минути	
7	72°C	15 минути	
8	72°C	10 минути	1
9	10°C	∞	1

Програма 2			
№	Температура	Време	Брой цикли
1	94°C	3 минути	1
2	94°C	30 секунди	30
3	60°C	2 минути	
4	68°C	15 минути	
5	68°C	10 минути	1
6	10°C	∞	1

2. Пречистване на HLA ампликоните:

2.1. 45 µl от амплификационните продукти от двете PCR плаки се прехвърлят в нова 96-ямкова 0.8 ml дълбокодънна (Midi) плака. Към всяка ямка се добавят 31,5 µl Sample Purification Beads (магнитни микросфери).

2.2. Плаката се поставя във висикоскоростна клатачка за микроплаки (BioShake iQ) и се клати за 2 минути на 1800 rpm. Инкубира се на стайна температура за 2 минути.

2.3. Плаката се поставя на магнитна поставка за 2 минути и след като разтворът се избистри супернатантата се премахва.

2.4.Към всяка ямка се прибавят 200 µl прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнита за 30 секунди и след това супернатантата се отстранява.

2.5.Стъпка 2.4. се повтаря за общо две стъпки на миене.

2.6.Плаката се оставя на магнитна поставка за 5 минути за да се изпари остатъчното количество етанол.

2.7.Към всяка ямка се прибавя 30 µl ресуспендиращ буфер и плаката се клати за 2 минути при 1800 rpm.

2.8.Инкубира се на стайна температура за 2 минути, след което плаката се поставя на магнитна поставка за 2 минути. В нова дълбокодънна плака (0,8 ml) се прехвърля 20 µl от супернатантата.

3. Нормализация на HLA ампликоните:

3.1.В 15 ml конична епруветка се смесват 4.4 ml Library Normalization Additives 1 (LNA1) и 400 µl нормализиращи микросфери - Library Normalization Beads 1 (LNB1). Чрез обръщане на епруветката е необходимо да се осигури пълна ресуспензия на микросферите.

3.2.Към всеки пречистен ампликон се добавя 45 µl от приготвената LNB1/LNA1 смес. Плаката се клати за 30 минути при 1800 rpm.

3.3.Поставя се на магнитна поставка за 2 минути до пълно избистряне и отделяне на магнитните микросфери, след което супернатантата се отстранява.

3.4.Към всяко гнездо се прибавя 45 µl ресуспендиращ буфер.

3.5.Плаката се клати за 5 минути при 1800 rpm. Поставя се на магнита за 2 минути и след избистряне на разтвора, супернатантата се премахва.

3.6.Към всяко гнездо се прибавя 40 µl HLA тагментационен буфер. Плаката се клати за 5 минути при 1800 rpm, след което цялото количество от нормализираните ампликони се прехвърля в 96-ямкова 0.2 ml PCR плака.

4. Тагментиране на HLA ампликоните - в хода на тагментационната реакция в една стъпка, амплифицираната ДНК се фрагменира до вериги с дължина между 800 и 2000 kb и едновременно с това към фрагментите се добавят адаптори. За тази цел се използва HLA тагментационна ензимна смес (HTM), която съдържа транспозоми. За удобство при капането е възможно предварително разпределение на HTM ензимната смес в PCR стрип от 8 епруветки.

4.1.Към всеки ампликон се добавят 10 µl тагментационна смес, след което плаката се поставя в PCR апарат за 12 минути при 58ºC.

4.2. PCR плаката се центрофугира за кратко и се поставя на магнитна поставка за 2 минути. След като разтворът се избистри, цялото количество супернатанта (~50 µl) се прехвърля в нова 96-ямкова PCR плака.

5. Обединяване и пречистване

5.1. За всяка проба се обединяват всички локуси на нов ред (ред A), в нова дълбокодънна 0,8ml плака. От всеки локус се иззема по 10 µl, с изключение на DRB, от който се отпипетират 20 µl.

5.2. Към всяка ямка се добавят 63 µl Sample Purification Beads (пречистващи микросфери). Плаката се клати за 2 минути на 1800 rpm, след което се инкубира на стайна температура за 2 минути.

5.3. Плаката се поставя на магнитната поставка за 5 минути. След избистряне на разтворът супернатантата се премахва.

5.4. Към всяка ямка се прибавят 200 µl прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнита за 30 секунди и след това супернатантата се отстранява.

5.5. Повтаря се стъпка 5.4 за общо две стъпки на миене.

5.6. Плаката се оставя на магнита за 5 минути за се изпари остатъчното количество етанол. Към всяка ямка се прибавят 22.5 µl ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 2 минути при 1800 rpm, след което се инкубира се на стайна температура за 2 минути.

5.7. Поставя се върху магнитна поставка за ~2 минути до избистряне на разтвора.

5.8. 20 µl от супернатантата се прехвърля в нова 96-ямкова PCR плака, както следва: проби от 1 до 6 се прехвърлят на ред A, колони 1- 6; а проби 7 до 12 се прехвърлят на ред B, в колони 1- 6. На този етап пробите могат да се съхранят за един ден на -25°C до -15°C.

6. Вторична амплификация - в тази стъпка тагментираните фрагменти се амплифицират и едновременно с това към фрагментите се добавят секвенционни адаптори необходими за генериране на клъстерите - индекс 1 (i7) и индекс 2 (i5). За тази цел се използва кит Nextera XT Index (24 индекса, 96 проби) и Nextera Library Amplification Mix (NLM). За да се гарантира уникална комбинация от индекс 1 (i7) и индекс 2 (i5) за всяка проба, обикновено различните индекс 1 (i7) адаптори се накапват в отделните колони на плаката (от 1 до 6), докато индекс 2 (i5) адапторите в отделните редове (от A до H в зависимост от броя проби). Към всяка ямка последователно се добавят по 5 µl от съответните адаптори индекс 1

и индекс 2 и 20 µl амплификационна смес (NLM). След кратко центрофугиране плаката се поставя в PCR апарат и се стартира следната програма:

Температура	Време	Брой цикли
72°C	3 мин.	1
98°C	30 сек.	1
98°C	10 сек.	10
60°C	30 сек.	
72°C	5 мин.	
72°C	5 мин.	1
10°C	∞	1

На този етап пробите могат да се съхранят до два дни на температура от 2°C до 8°C.

7. Пречистване на ДНК библиотеките: на този етап освен пречистване се осъществява и стъпка на селекция на фрагментите по размер, при която се премахват много късите фрагменти.

7.1. В нова 96-ямкова дълбокодънна 0.8 ml плака се прехвърлят 45 µl от PCR продуктите. Към всяка ямка се прибавят 31,5 µl Sample Purification Beads (съотношението PCR продукт : микросфери е 1 : 0.7).

7.2. Плаката се клати за 2 мин. на 1800 rpm., след което се инкубира се на стайна температура за 2 минути.

7.3. Плаката се поставя на магнитна поставка за 2 минути. След като разтворът се избистри супернатантата се премахва.

7.4. Към всяка ямка се прибавят 200 µl прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнитна поставка за 30 секунди и след това супернатантата се отстранява.

7.5. Повтаря се стъпка 7.4 за общо две стъпки на миене.

7.6. Плаката се оставя на магнитната поставка за 5 минути, за да се изпари остатъчното количество етанол. Към всяка ямка се добавя 32.5 µl ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 2 минути на 1800 rpm, след което се инкубира се на стайна температура за 2 минути.

7.7. Плаката се поставя на магнитната поставка за 2 минути, след което 30 µl от супернатантата се прехвърля в нова 96-ямкова 0.2 ml PCR плака.

На този етап пробите могат да се съхраняват до 1 седмица на 2°C до 8°C.

8. Обединяване на пробите в обща ДНК библиотека и секвениране - за подготовка на пробите за мостовата амплификация и секвениране се смесват равни обеми от всички създадени библиотеки. Общата библиотека се денатурира в NaOH и се

разрежда с хибридизационен буфер. Необходимите секвенционни реагенти се намират в касета (cartridge), към която в последствие се добавя и денатурираната ДНК библиотека. За секвенирането се използва апарат MiniSeq и поточна клетка v2.

8.1. В 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка се прибавя 5 µl от всяка библиотека.

8.2. Концентрацията на комбинираната библиотеката се измерва флуориметрично чрез Qubit™ 2.0 и кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific Corp., USA).

8.3. Прилага се следната формула: -0.67(X) + 11.9 = Y, където X е измерената концентрация на библиотеката (ng/µl), а Y е необходимият обем от библиотеката (µl), който ще се използва в следващата стъпка.

8.4. В нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка количеството Y се разрежда със стерилна дейонизирана вода до краен обем 10 µl.

8.5. Към епруветката се добавя 10 µl 1N NaOH и се разбърква добре. Инкубира се на стайна температура за 5 минути.

8.6. Към епруветката се добавя 980 µl хибридизационен буфер и се вортексира за няколко секунди.

8.7. В предварително размразената касета с реагенти се добавят 600 µl от денатурираната и разредена библиотека. Касетата се поставя в секвенатора и се задава начало на секвенционния рън.

9. Анализ на данните - за анализ на секвенциите беше използван софтуерния продукт TruSight HLA Assign 2.1. Програмата използва консенсусно генотипизиране чрез сравняване с база данни IPD-IMGT/HLA. В софтуера са заложени следните качествени параметри: качество на HLA секвенциите и покритие на отделните локуси.

2.4. Omixon Holotype HLA v2

Секвенционния панел на Omixon Holotype HLA позволява генотипизиране с висока разграничителна способност на 7 локуса: HLA-A, -B, -C, DRB1, -DQB1, -DPB1, -DQA1. HLA-A, -B, -C, -DQA1 и DQB1 локусите се покриват изцяло, -DPB1 локуса се покрива в участъка екзон 2 – 3`UTR, а за –DRB1 се покриват клинично значимите екзони включително и интронните последователности. Секвенирането се извършва на платформата на Illumina. За амплификация се използва геномна ДНК с

концентрация 20-30 ng/µl (минимален обем 45 µl). Необходимото количество геномна ДНК за дълго-верижната PCR амплификация е 100-150 ng.

Изпълнение на метода:

1. Амплификация:

1.1. Всички геномни ДНК се разреждат до концентрация 20-30 ng/µl (ако е необходимо) в краен, минимален обем от 45 µl.

1.2. Приготвят се 2 96-ямкови 0.2 ml PCR плаки. В първата плака се прибавя по 5 µl ДНК за всеки локус клас I, а във втората PCR плака се прибавя по 5 µl ДНК за всеки локус клас II.

1.3. Приготвя се комбиниран енхансер като към епруветката с енхансер 1 се прибавят 132 µl от епруветката с енхансер 2.

1.4. В 1.5 ml Eppendorf епруветки се приготвят отделни амплификационни смеси за HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DPB1 и DQA1 както следва:

Реагент	Количество на проба (µl)
Праймерна смес	2
10X Long Range PCR буфер	2.5
Смес на dNTP (всяко 10 mM)	1.25
Стерилна дейонизирана вода	13.85
ДНК полимераза	0.4
Общо	20

1.5. За HLA-DQB1 се приготвя отделна амплификационна смес, както следва:

Реагент	Количество на проба (µl)
Праймерна смес	2
10X Long Range PCR буфер	2.5
Смес от dNTPs (всяко 10 mM)	1.25
Комбиниран Enhancer	5.6
Стерилна дейонизирана вода	7.85
ДНК полимераза	0.8
Общо	20

1.6. Всяка амплификационна смес се вортексира внимателно и се центрофугира за кратка.

1.7. Към съответните ямки на двете плаки се прибавят по 20 µl от така приготвените локус-специфични амплификационни смеси. Плаките се центрофугират за кратко, след което се поставят в PCR апарат (Veriti™, Applied Biosystems Inc, USA).

1.8. За амплификация на локусите клас I се стартира програма 1, а за амплификация на локусите клас II се стартира програма 2:

Програма 1		
Температура	Време	Брой цикли
95ºC	3 минути	1
95ºC	15 секунди	35
65ºC	30 секунди	
68ºC	5 минути	
68ºC	10 минути	1
4ºC	∞	

Програма 2		
Температура	Време	Брой цикли
95ºC	3 минути	1
93ºC	15 секунди	35
60ºC	30 секунди	
68ºC	9 минути	
68ºC	10 минути	1
4ºC	∞	

2. Количествено определяне и нормализиране на ампликоните чрез използване на апарат qPCR: на този етап концентрацията на ампликоните се измерва чрез използване на флуоресцентно багрило, свързващо двойно-верижна ДНК (QuantiFluor dsDNA) и ДНК стандарти. Нормализацията на ампликоните се прави на база измерените концентрации.

2.1. Приготвят се падащи разреждания на стандарта за ламбда ДНК (100 ng/µl), както следва:

Етикет на епруветката	**Внесена ДНК**	**Обем на ДНК (µl)**	**Обем на 1x TE (µl)**	**Крайна конц. (ng/µl)**
Стандарт 1	Ламбда ДНК	7,5	492,5	1,5
Стандарт 2	Стандарт 1	250	250	0,75
Стандарт 3	Стандарт 2	250	250	0,38
Стандарт 4	Стандарт 3	250	250	0,19
Стандарт 5	Стандарт 4	250	250	0,09
Стандарт 6	Стандарт 5	250	250	0,05
Празна проба	Празна проба	0	250	0

2.2. Най-напред е необходимо разреждане на ампликоните. За тази цел в нови две 96-ямкови 0.2 ml PCR плаки се разпределят 99 µl 1x TE буфер и към тях се прибавят по 1 µl ампликони от съответните ямки в плаките с ампликони. Смесват се чрез пипетиране.

2.3. Приготвя се 1x багрилен разтвор на QuantiFluor, както следва: 0,5 µl багрило QuantiFluor (200X) + 99,5 µl 1× TE буфер. Приготвя се достатъчно количество 1× багрилен работен разтвор на QuantiFluor, за да може във всяка проба (общия брой проби в плаките с ампликони) и стандартите (общо 14 на брой) да се накапе по 50 µl от флуоресцентния разтвор.

2.4. Приготвят се нови две 96-ямкови 0.2 ml PCR плаки за количествено определяне на ампликоните. В първата плака се определя количеството ампликони клас I (при работа с 24 проби, за трите локуса HLA-A, -B, -C се заемат първите 9 колони на плаката) и стандартите (седем стандарта по две повторения, които се разполагат в колони 11 и 12), а във втората плака се

осъществява количествено определяне на клас II ампликоните. Към всяка от ямките, в които ще се извърши измерване се накапват по 50 µl от 1× багрилен работен разтвор QuantiFluor.

2.5. От разредените предварително ампликони и приготвените стандарти се накапват по 50 µl в съответните ямки, съдържащи 1× багрилния разтвор QuantiFluor.

2.6. Плаките се запечатват с оптично-пропускливо фолио за real-time PCR. Разбъркват се добре чрез вортекс и се центрофугират за кратко.

2.7. Плаката се пуска на real time PCR апарата за количествено определяне на стандартите и ампликоните.

2.8. Получените RFU данни за концентрацията на ампликоните от qPCR се конвертират в ng/µl.

2.9. ДНК в плаките с ампликони се разрежда със стерилна, дейонизирана H2O, за да се получи крайна концентрация на ДНК приблизително 67 ng/µl. За тази цел:

- Ако концентрацията на ДНК е 150 ng/µl или по-висока се добавят 25 µl H2O.
- Ако концентрацията на ДНК е 100-150 ng/µl се добавят 10 µl H2O.
- Ако концентрацията на ДНК е по-ниска от 100 ng/µl не се добавя никаква H2O.

3. Обединяване на ампликоните: На този етап се обединяват всички локуси на една проба. За тази цел от всеки локус на една проба се изземат по 5 µl нормализирани ампликони и се смесват в отделна ямка (една ямка=една проба) на нова 96-ямкова 0.2 ml PCR плака.

4. Пречистване на PCR продукти - към всяка ямка съдържаща обединените ампликони на една проба, се добавят по 4 µl ExoSAP-IT Express. Плаката се поставя в PCR апарата и се стартира следната програма за пречистване:

Температура	Време	Брой цикли
37ºC	4 минути	1
80ºC	1 минути	1
4ºC	∞	1

На този етап ампликоните могат да се съхраняват при температура 4 °C за едно денонощие или при температура -20 °C за по-дълго време.

5. Фрагментиране и поправка на краищата (End Repair): Реакцията на фрагментация е предназначена да осигури ДНК с идеален размер за секвениране на апарата Illumina MiSeq. За да се предотврати прекомерна фрагментация е важно реагентите да бъдат държани на студено до момента на поставяне на плаката в PCR апарата, както и навременното й изваждане от апарата, веднага след приключване на програмата.

5.1. В 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка се приготвя фрагментационна смес - за 1 реакция са необходими 2 µl фрагментиращ ензим и 2 µl фрагментиращ буфер.

5.2. Приготвя се нова 96-ямкова PCR плака и се поставя на охлаждащ статив. Прибавят се по 4 µl от приготвената фрагментационна смес. Към съответните ямки се добавят 16 µl от всяка проба.

5.3. След кратко центрофугиране плаката се поставя в PCR апарат и се стартира следната програма:

Температура	Време	Брой цикли
37ºC	10 минути	1
70ºC	15 минути	1
4ºC	∞	1

5.4. В нова 1.5 ml Eppendorf епруветка се приготвя реакционна смес за поправка на краищата, както следва:

Реагент	Количество на проба (µl)
Дейонизирана вода	1.25
Ензим за поправка на краищата	1.25
Буфер за поправка на краищата	2.5

5.5. Към съответните ямки на PCR плаката съдържаща фрагментираните обединени ампликони, се добавят по 5 µl от приготвената смес за поправка на краищата. Смесва се чрез пипетиране. Плаката се центрофугира за няколко секунди и след това се поставя в PCR апарат. Стартира се следната програма:

Температура	Време	Брой цикли
20ºC	30 минути	1
70ºC	5 минути	1
4ºC	∞	1

6. Добавяне на адаптори - необходимите индексирани адаптори са разпределени в 96-ямкова плака. Преди употреба плаката се темперира на стайна температура, след което се центрофугира за 3 минути при 3000 об/мин (rpm).

6.1. Към съответните ямки на плаката с индексираните адаптори се прехвърля цялото количество (~25 µl) от всяка проба с поправени краища. Смесва се чрез пипетиране.

6.2. Сместа от индексите и ампликоните се прехвърля изцяло, обратно в изходната PCR плака, спазвайки реда на пробите.

6.3. Приготвя се реакционна смес - за 1 реакция са необходими 2,5 µl лигазен ензим и 30 µl лигазен буфер.

6.4. Към съответните ямки на PCR плаката се добавят по 32.5 µl от така приготвената реакционна смес. След кратко центрофугиране плаката се поставя в PCR апарат и се стартира следната програма:

Температура	Време	Брой цикли
25ºC	10 минути	1
70ºC	10 минути	1
4ºC	∞	1

7. Комбиниране на пробите в обща ДНК библиотеката и пречистване:

7.1. При 16 или повече проби в нова 2.0 ml Eppendorf LoBind епруветка се смесват равни количества от всяка ДНК библиотека до краен обем 900 µl. При по-малко от 16 проби се прехвърлят по 60 µl от всяка библиотека.

7.2. Към епруветката се добавя еквивалентно количество AMPure XP Beads (900 µl за 16 или повече проби). Смесва се чрез вортексиране и се центрофугира за кратко.

7.3. Инкубира се на стайна температура за 10 минути. Епруветката се поставя на магнитен държател за 10 минути.

7.4. Докато епруветката стои на магнитния статив се премахва супернатантата. Към епруветката се добавя 2 ml прясно приготвен 80% етанол. Инкубира се на стайна температура за 30 секунди, след което внимателно се отстранява супернатантата.

7.5. Повтаря се стъпка 6.4.

7.6. След премахване на супернатантата епруветката се оставя върху магнитния държател за 5 минути, което цели да се изпари остатъчното количество етанол.

7.7. Към епруветката се добавя 31 µl стерилна дейонизирана вода. Микросферите се ресуспендират чрез вортексиране, след което епруветката се центрофугира за кратко. Инкубира се на стайна температура за 2 минути.

7.8. Епруветката се поставя на магнитния държател за 2 минути. Супернатантата се прехвърля в нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка.

На този етап библиотеката може да се съхрани при температура -20°C за продължителен период от време.

8. Селекция по размер на ДНК фрагментите – извършва се чрез Pippin Prep (Sage Science, Inc.), който прави автоматична селекция на ДНК фрагменти с дължина в определен диапазон и да ги елуира в събирателната камера Инструментът използва касета с 1.5% агарозен гел (без багрила) и разделя ДНК фрагментите чрез електрофореза. За настоящия метод инструментът се конфигурира за селекция на фрагменти с дължина между 650 и 1300 bp. Към пречистената библиотека (~31 µl) се добавя 10 µl багрило (маркер К) и общата смес се нанася в агарозната касета в отвора за проби. Инструментът се стартира и след изтичане на изследването (~ 45–50 минути), се иззема цялото количество (~40 µl) селектирана библиотека от елуиращата камера на касетата и се прехвърля в нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка.

   На този етап, селекционираната библиотека може да се съхрани при температура -20 °C за продължителен период от време.

9. Количествено определяне на ДНК библиотеката - използва се флуориметър Qubit™ 2.0 и кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific Corp., USA):

9.1. Приготвя се 1:200 работно разреждане на Qubit™ dsDNA HS реагент чрез Qubit™ dsDNA HS буфер.

9.2. Правят се две измервания на библиотеката, като за всяко измерване се смесват 2 µl библиотека и 198 µl работен разтвор. За приготвяне на стандартите: 10 µl стандарт и 190 µl работен разтвор. Смесва се добре, след което се инкубира на стайна температура за 2 минути.

9.3. Измерване на концентрацията (ng/µl) на библиотеката чрез Qubit™ 2.0.

10. Секвениране на MiniSeq™ (Illumina, USA):

10.1. В 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка ДНК библиотеката се разрежда със стерилна дейонизирана вода до концентрация 2 nM в обем 10 µl.

10.2. Приготвя се 1 nM денатурирана библиотека – към разредената библиотека се добавя 10 µl прясно приготвена 0.2N NaOH. Епруветката се вортексира и центрофугира за кратко. Инкубира се на стайна температура за 5 минути.

10.3. Приготвя се 20 pM денатурирана библиотека – към 20 µl 1 nM денатурирана библиотека се добавя 980 µl хибридизационен буфер HT1. Епруветката се вортексира и центрофугира за кратко.

10.4. Приготвя се 9 pM денатурирана библиотека - в нова 1.5 ml Eppendorf LoBind се смесват 550 µl буфер HT1 буфер и 450 µl 20 pM денатурирана библиотека. Епруветката се вортексира и центрофугира за кратко.

10.5. В предварително размразената касета с реагенти се добавя 600 µl от 9 pM денатурираната библиотека в Касетата се поставя в MiniSeq и се задава начало на секвенционния рън.

11. Анализ на данните се извърши на разработената от Omixon програма HLA Twin. Софтуера е снабден с два независими алгоритъма – консенсусно генотипизиране и статистическо генотипизиране – които осигуряват прецизността на високо-разделителното генотипизиране.

3. Методи за определяне на серумни нива на разтворими MIC молекули

3.1. Elisa кит за определяне на серумно ниво на човешки MICA молекули

Сандвич Елайза е твърдофазов метод за детекция на разтворими молекули в серум (възможна е работата също така с плазма и с клетъчни култури). В основата на метода е измерване на количеството таргетни молекули свързани от две специфични антитела. Таргет-специфични антитела са предварително свързани към дъното на всяка ямка на 96-ямкова микроплака. Следва прибавянето на стандарти и проби (пациенти и/или контроли) към всяка ямка и свързването на прицелните молекули към имобилизираните антитела. Сандвича се формира при прибавянето на второ биотинилирано антитяло. Следва добавянето на ензим (HRP) конюгиран за стрептавидин и добавянето на субстрат, който реагира с ензимния-антителен-таргетен комплекс, за да продуцира измерим сигнал (при 450nm дължина на вълната). Интензитета на този сигнал е правопропорционален на концентрацията на таргетната молекула.

Изпълнение на метода:

1. Приготвяне на 1x Assay Diluent: този разтвор се използва за разреждане на серумите и на една част от реагентите. В зависимост от броя проби, които ще бъдат анализирани се изчислява на необходимия краен обем от 1x Assay Diluent. Изходния разтвор е 5x Assay Diluent, който се разрежда 5 пъти до съответния краен обем.
2. Разреждане на серумите и подготовка на стандартите:

2.1. Серумите се разреждат в съотношение 1:1 (100 µl серум + 100 µl 1x Assay Diluent) в 1,5 ml Ependorf епруветки.

2.2. Епруветката съдържаща лиофилизирания стандарт се центрофугира за кратко, след което се добавят 400 µl 1X Assay Diluent – получената концентрация е 100 ng/ml разтвор на стандарт. Внимателно се разтваря чрез леко вортексиране. От него се изземат 50 µl и се прехвърлят в 1,5ml Ependorf епруветка с предварително накапан 450 µl 1x Assay Diluent – стандарт 1 с концентрация 10 000 pg/ml. В нови седем 1,5ml Ependorf епруветки се накапват по 400 µl 1x Assay Diluent. Правят се падащи разреждания, като от стандартния разтвор с концентрация 10 000 pg/ml (стандарт 1) се изземат 200 µl и се прехвърлят в първата епруветка съдържаща 400 µl 1x Assay Diluent – стандарт 2 с концентрация 3 333 pg/ml. Вортексира се силно, след което от него се изземат още 200 µl и се прехвърлят в следващата епруветка съдържаща 400 µl 1x Assay Diluent – стандарт 3 (1 111 pg/ml). По аналогичен начин се приготвят стандарти 4, 5, 6 и 7 с концентрации съответно 370.4 pg/ml, 123.5 pg/ml, 41.15 pg/ml и 13.72 pg/ml. Последния осми стандарт е нулев (0 pg/ml) и съдържа само 400 µl 1x Assay Diluent (в него не се прехвърля нищо).

3. Свързване на разтворимите MICA молекули за имобилизираните MICA антитела: във всяка ямка на микроплаката се накапват по 100 µl от предварително подготвените стандарти (8 стандарта) и по 100 µl от разредените серуми. Плаката се запечатва и се инкубира на стайна температура за 2,5 часа при леко разклащане.
4. Приготвяне на 1x измиващ буфер (Wash buffer): в рамките на протокола буфера се използва при 3 етапа на миене, всеки от които включва 4 последователни миенета. В зависимост от броя на пробите се изчислява необходимия краен обем 1x измиващ буфер. Изходния разтвор 20x измиващ буфер се разрежда 20 пъти до съответния краен обем.
5. Приготвяне на 1x биотинилирани антитела:

5.1. Най-напред се приготвя концентрат като епруветката съдържаща биотинилираните антитела се центрофугира за кратко и към нея се добави 100 µl 1x Assay Diluent. Миксират се чрез пипетиране нагоре и надолу (концентратът може да се съхранява при 4 ° C в продължение на 5 дни).

5.2. Концентратът се разрежда 80 пъти с 1x Assay Diluent, като най-напред се изчислява какъв е необходимия краен обем разредени биотинилирани антитела в зависимост от броя проби, които се анализират.

6. Миене: след инкубацията супернатантата се отстранява, чрез рязко обръщане на плаката.

6.1. Използвайки многоканална пипета, всяка от изследваните ямки се измива като се прибавя 300 µl 1x измиващ буфер, след което буфера се отстранява чрез рязко обръщане на плаката (пълното премахване на остатъчен буфер е препоръчително).

6.2. Стъпка 5.1 се повтаря 3 пъти, за общо 4 миенета. След последното миене, плаката се обръща и се потупва внимателно върху чиста хартия.

7. Прибавяне на 1x биотинилирани антитела: към всяка от анализираните ямки на плаката (стандарти + проби) се прибавя по 100 µl от предварително приготвените разредени биотинилирани антитела. Плаката се инкубира за 1 час на стайна температура при леко разклащане.

8. Приготвяне на разтвор на стрептавидин-HRP ензимен комплекс: епруветката съдържаща стрептавидин-HRP реагента се центрофугира за кратко, след което се миксира внимателно чрез пипетиране нагоре - надолу с цел разтваряне на евентуални образували се преципитати. Изчислява се необходимия краен обем от реагента, след което се разрежда 300 пъти с 1x Assay Diluent.

9. Миене: след приключване на инкубацията с разредените биотинилирани антитела, супернатантата се отстранява чрез рязко обръщане на плаката. Повтаря се стъпка 6.

10. Прибавяне на стрептавидин-HRP ензимния комплекс: към всяка от анализираните ямки на плаката се прибавя по 100 µl от предварително приготвения разреден стрептавидин-HRP реагент. Инкубира се на стайна температура за 45 минути при леко разклащане.

11. Миене: След приключване на инкубацията, супернатантата се премахва чрез рязко обръщане на плаката. Повтаря се стъпка 6.

12. Прибавяне на TMB субстрат (тетраметилбензидин): Към всяка от анализираните ямки се прибавя по 100 µl TMB субстрат. Плаката се инкубира за 30 минути на тъмно, на стайна температура при леко разклащане.

13. Спиране на реакцията: след приключване на инкубацията към всяка ямка се прибавя по 50 µl стоп буфер.

14. Спектрофотометричното измерване се извършва в рамките на 30 минути след спиране на реакцията. Абсорбцията се измерва на 450nm от ELISA четец на микроплаки Sunrise™ (Tecan) и софтуер Magellan™ (Tecan).

3.2.Човешки MICB Elisa кит

Изпълнение на метода:

1. Приготвяне на 1x Assay Diluent B: този разтвор се използва за разреждане само на реагентите (без серумите). Изходния разтвор 5x Assay Diluent B се разрежда 5 пъти до необходимия краен обем.
2. Разреждане на серумите и подготовка на стандартите:

2.1. Серумите и стандартите се разреждат посредством Assay Diluent A, за който не е необходимо предварително разреждане.

2.2. Серумите се разреждат в съотношение 1:1 (100 µl серум + 100 µl 1x Assay Diluent A) в 1,5 ml Ependorf епруветки.

2.3. Епруветката съдържаща лиофилизирания стандарт се центрофугира за кратко, след което се добавят 800 µl 1X Assay Diluent A, като внимателно се разтваря чрез леко вортексиране. Получава се стандарт 1 с концентрация 50 ng/ml. В нови седем 1,5ml Ependorf епруветки се накапват по 300 µl 1x Assay Diluent A. Правят се падащи разреждания, като от стандарт 1 се изземат 150 µl и се прехвърлят в първата епруветка съдържаща 300 µl 1x Assay Diluent A (16,67 ng/ml) – стандарт 2. Вортексира се силно, след което от него се изземат още 150 µl и се прехвърлят в следващата епруветка съдържаща 300 µl 1x Assay Diluent A (5,556 ng/ml) – стандарт 3. По аналогичен начин се приготвят стандарти 4, 5, 6 и 7 с концентрации съответно 1.852 ng/ml, 0.617 ng/ml, 0.206 ng/ml, 0.0686 ng/ml. Последния осми стандарт е нулев (0 ng /ml) и съдържа само 300 µl 1x Assay Diluent A (в него не се прехвърля нищо).

3. Свързване на разтворимите MICB молекули за имобилизираните MICB антитела: във всяка ямка на микроплаката се накапват по 100 µl от предварително подготвените стандарти (8 стандарта) и по 100 µl от разредените серуми. Плаката се запечатва и се инкубира на стайна температура за 2,5 часа при леко разклащане.
4. Приготвяне на 1x измиващ буфер (Wash buffer): в рамките на протокола буфера се използва при 3 етапа на миене, всеки от които включва 4 последователни

миенета. В зависимост от броя на пробите се изчислява необходимия краен обем 1х измиващ буфер. Изходния 20х измиващ буфер се разрежда 20 пъти до съответния краен обем.

5. Приготвяне на 1х биотинилирани антитела:

5.1. Най-напред се приготвя концентрат като епруветката съдържаща биотинилираните антитела се центрофугира за кратко и към нея се добави 100 µl от предварително приготвения 1х Assay Diluent B. Миксират се чрез пипетиране нагоре и надолу (концентратът може да се съхранява при 4 ° C в продължение на 5 дни).

5.2. Концентратът се разрежда 80 пъти с 1х Assay Diluent B, като най-напред се изчислява какъв е необходимия краен обем разредени биотинилирани антитела в зависимост от броя проби, които се анализират.

6. Миене: след инкубацията супернатантата се отстранява, чрез рязко обръщане на плаката.

6.1. Използвайки многоканална пипета, всяка от изследваните ямки се измива като се прибавя 300 µl 1х измиващ буфер, след което буфера се отстранява чрез рязко обръщане на плаката (пълното премахване на остатъчен буфер е препоръчително).

6.2. Стъпка 5.1 се повтаря 3 пъти, за общо 4 миенета. След последното миене, плаката се обръща и се потупва внимателно върху чиста хартия.

7. Прибавяне на 1х биотинилирани антитела: към всяка от анализираните ямки на плаката (стандарти + проби) се прибавя по 100 µl от предварително приготвените разредени биотинилирани антитела. Плаката се инкубира за 1 час на стайна температура при леко разклащане.

8. Приготвяне на разтвор на стрептавидин-HRP ензимен комплекс: епруветката съдържаща стрептавидин-HRP реагента се центрофугира за кратко, след което се миксира внимателно чрез пипетиране нагоре - надолу с цел разтваряне на евентуални образували се преципитати. Изчислява се необходимия краен обем от реагента, след което се разрежда 200 пъти с 1х Assay Diluent B.

9. Миене: след приключване на инкубацията с разредените биотинилирани антитела, супернатантата се отстранява чрез рязко обръщане на плаката. Повтаря се стъпка 6.

10. Прибавяне на стрептавидин-HRP ензимния комплекс: към всяка от анализираните ямки на плаката се прибавя по 100 µl от предварително приготвения разреден

стрептавидин-HRP реагент. Инкубира се на стайна температура за 45 минути при леко разклащане.

11. Миене: След приключване на инкубацията, супернатантата се премахва чрез рязко обръщане на плаката. Повтаря се стъпка 6.
12. Прибавяне на TMB субстрат (тетраметилбензидин): Към всяка от анализираните ямки се прибавя по 100 µl TMB субстрат. Плаката се инкубира за 30 минути на тъмно, на стайна температура при леко разклащане.
13. Спиране на реакцията: след приключване на инкубацията към всяка ямка се прибавя по 50 µl стоп буфер.
14. Спектрофотометричното измерване се извършва в рамките на 30 минути след спиране на реакцията. Абсорбцията се измерва на 450nm от ELISA четец на микроплаки Sunrise™ (Tecan) и софтуер Magellan™ (Tecan).

III. Статистически анализ

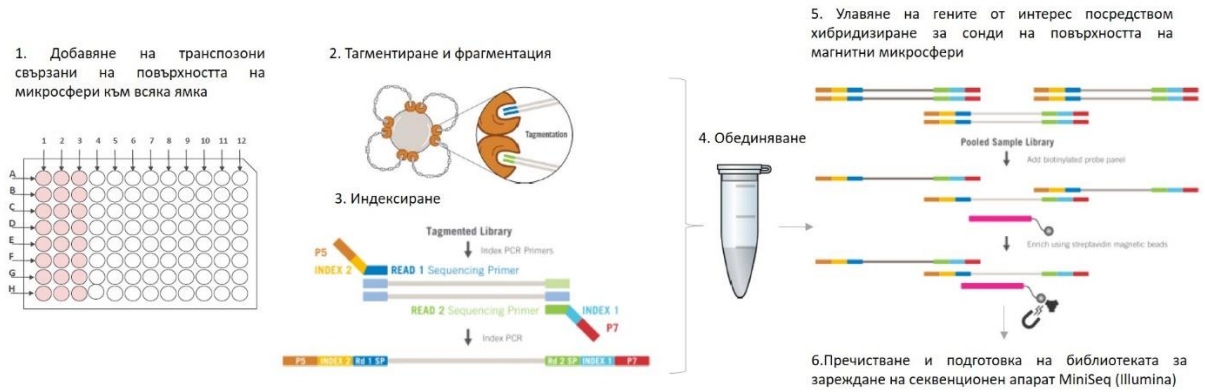
Алелните и дву-локусните хаплотипни честоти бяха определени чрез използване на т.н. алгоритъмът за максимизиране на очакванията (expectation–maximization / EM) заложен в програмата Gene[Rate] (219). Тестване за отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг (Hardy–Weinberg equilibrium / HWE) се осъществи като се използва тест за съотношение на вероятностите (Likelihood ratio test / LRT) (220). Неравновесната скаченост между отделни двойки алели, за всеки наблюдаван хаплотип са представени като стандартизирани остатъци, които отразяват силата на разликата между наблюдаваната и очакваната хаплотипна честота. Стойности по-големи от 1.96 отразяват, че наблюдаваната честота на хаплотипа е по-голяма от очакваната и се считат за статистически значими (219,221). Разгърнатите хаплотипни честоти бяха определени чрез използване на EM алгоритъм заложен в софтуера за популационен анализ Arlequin (версия 3.5.1.2). Софтуер Arlequin бе използван и за оценка на дву-локусната глобална неравновесна скаченост на гените (global linkage disequilibrium / GLD) посредством LRT тест. Сравнителният анализ между отделните изследвани групи е извършен чрез $\chi 2$ тест (Chi-square test) и/или точен тест на Фишер (Fischer exact test) чрез използване на статистически софтуерен пакет SPSS (222). На тестовете за сравнителен анализ на алелни честоти е приложена корекцията на Бонферони за множественост (Bonferroni correction), като за статистически значими се приемат коригирани P със стойности равни или по-малки от 0.05. При сравнителния анализ на хаплотипни честоти е представена P стойност, като в зависимост от приложения тест е използвана или корекция на Yates (за Chi-square теста) или two-tailed P стойност (за Fischer exact). За статистически значими се приемат стойности на P по-малки или равни на 0.05. ANCOVA тест на анализ на ковариацията в нивата на разтворими MIC молекули с ковариабилни фактори пол и възраст, бе извършен чрез SPSS софтуерен пакет. Графичното представяне на данните се извърши чрез софтуер GraphPad Prism версия 9.00 (San Diego California USA)(223), програмата Gene[Rate] и Microsoft Excel версия 2103 (224).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Въвеждане на нов метод за HLA генотипизиране с висока разграничителна способност (NGS)

За целите на настоящия дисертационен труд за пръв път бе въведена нова технология секвениране от следващо поколение (AlloSeq Tx17 – CareDx), която позволява едновременно типизиране с висока разграничителна способност на класическите HLA клас I и клас II гени (HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1, -DPB1, -DQA1, -DPA1), както и 6 некласически HLA клас I гени: HLA-E, -F, -G, -H, MICA и MICB. Тази нова технология се различава от стандартното NGS секвениране, по това, че таргетните гени не се амплифицират чрез PCR, а се улавят посредством хибридизиране за къси фрагменти (сонди) на повърхността на магнитни микросфери, които са комплементарни на силно консервативни участъци в рамките на изследваните гени. AlloSeq Tx17 осигурява пълно покритие за HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H и пълно екзонно покритие за HLA-DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA, MICB гените.

Подготовка на библиотеката е многостъпателен процес, който в най-общ вариант включва следните етапи (фигура 4): геномната ДНК се свързва, фрагментира и тагментира от транспозони свързани на повърхността на микросфери. Последва индексиране на пробите, миене и селекция по размер чрез използването на магнитни микросфери. Следва обединяване на индексираните проби в една библиотека, където таргетните региони се улавят посредством хибридизация за олигонуклеотидни сонди. След финални стъпки на концентриране и пречистване, концентрацията на подготвената библиотека се определя флуориметрично и се денатурира преди зареждане на секвенционния апарат MiniSeq, който използва патентовата технология на „Illumina", наречена секвениране чрез синтеза.



Фигура 4. Работен процес за изпълнение на новата технология секвениране от следващо поколение (NGS AlloSeq Tx17 – CareDx)

Оценка на метода се извърши на базата качествените показатели на генерираните секвенции и софтуерния анализ на данните. AlloSeq Tx17 бе използван за генотипизиране на 62 от пробите в настоящата работа. Важни параметри за определяне качеството на генерираните секвенции са качество на прочитите, алелен баланс и дълбочина на покритието. Всички изследвани локуси се характеризират с високо качество на прочитите (Q30 над 89%), висок процент среден алелен баланс (между 41 и 46%) и почти еднакво разпределение на прочитите със средни стойности над 180 прочита (фигура 5).

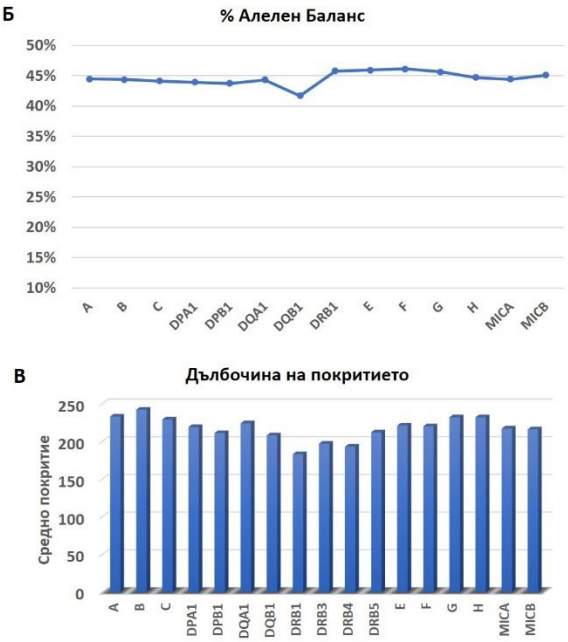
Анализа на секвенционните данни генерирани чрез новата хибридизационна технология се извърши на софтуер AlloSeq™ Assign (Tx17 v1.0., IMGT/HLA 3.37.0), който използва базата данни на IMGT/HLA за референтните секвенции. Анализа включва подравняване на прочитанията, определяне на фазата, IMGT/HLA референтно подравняване и HLA типизиране.

Честота на получените неразграничими алелни комбинации е важен критерий за оценка на метода (фигура 6). Не се установяват неразграничими алелни комбинации за HLA-B, -DPA1, -DQB1, -DQA1 и -DRB3,4,5 локусите. Малкия процент неразграничими алелни комбинации за HLA- DRB1 локуса (7.1%) са главно във второ и трето поле. Неразграничими алелни комбинации във второ поле означават различия в клинично значимия екзон 2 на HLA-DRB1 локуса, докато в поле три нямат клинично значение и попадат в G група. Най-голям процент неразграничими комбинации се установява за HLA-DPB1 локуса (при 45% от типизираните проби), които основно са в резултат на загуба на фаза между екзон 2 и екзон 3, което води до затруднения в определянето на ориентацията на полиморфните участъци. Всички DPB1 неразграничими алелни комбинации попадат в G група. Относително нисък процент неразграничими

комбинации се наблюдават за некласическите HLA локуси – за HLA-F, -G, -H локусите не се установяват такива, а за HLA-E всички 5.4% неразграничими комбинации са в трето поле и са резултат на синонимни замени в кодиращите региони. За MICA и MICB процента неразграничими алелни комбинации са 8.8% и 11.4% съответно, като всички са в резултат на загуба на фаза.

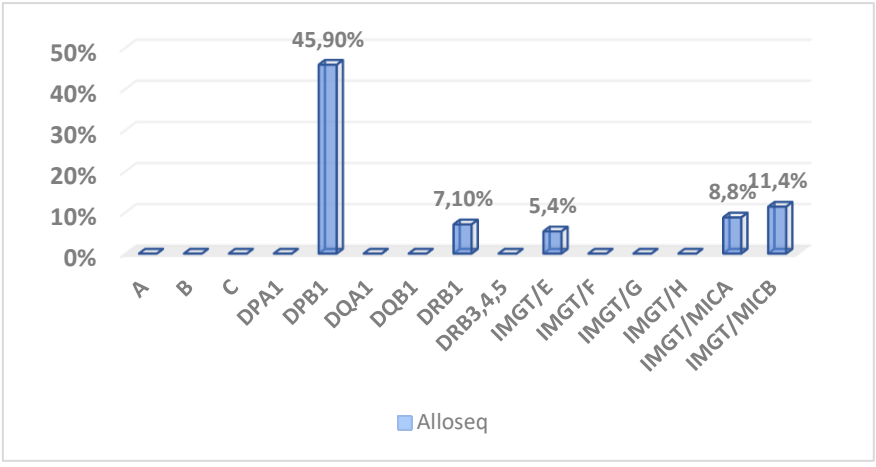
А

HLA локус	%Q30
A	91%
B	90%
C	90%
DPA1	90%
DPB1	89%
DQA1	90%
DQB1	89%
DRB1	90%
DRB3	90%
DRB4	90%
DRB5	90%
E	89%
F	90%
G	90%
H	90%
MICA	89%
MICB	89%



Фигура 5. Качествени параметри на генерираните секвенции чрез методологията на CareDx - AlloSeq Tx17

За всеки анализирани локуси са определени А) средния процент бази с качество на прочитите над 30 (%Q30); Б) Среден алелен баланс; В) Средна дълбочина на покритието



Фигура 6. Процент неразграничими алелни комбинации от AlloSeq Tx 17 за всички анализирани локуси

Интересно е наблюдението, че в настоящия дисертационен труд откриваме висока честота на MICB*018 и MICB*019 алелите, която не се описва в нито една друга популация в света. Мнозинството от проучванията изучаващи MIC гените използват типизиране от ниска разграничителна способност (SSP, SSO) или класическо секвениране (SBT), концентрирайки се върху изследване на полиморфизмите намиращи се само в кодиращите последователности - екзони 2-6. Основните недостатъци на тези методи са свързани с невъзможността за определяне на полиморфизми извън амплифицираните екзони, получаването на неразграничими комбинации в следствие на различия намиращи се извън тези региони, ограничени възможности за идентифициране на нови алели и трудности при разграничаването на близки алелни комбинации. Допълнително, прецизното, не-двусмислено характеризиране на полиморфизма на тези гени се явява сериозно предизвикателство, като се вземе в предвид сложния секвенционен характер на MIC гените, които освен че притежават характерната за класическите HLA сложна генетична организация, но и често се наблюдават трудности свързани с правилно определяне на ориентацията на единични нуклеотидни замени по дължината на ампликона.

Скорошно проучване от 2020 г (225), използващо високо-производителното секвениране от следващо поколение, описва проблем при разграничаването на алелните комбинации MICB*002, MICB*005 и MICB*018, MICB*019, които се характеризират с различия в интронните последователности при идентична секвенция на екзоните. Използвания в проучването NGS подход се основава на мултиплексен PCR амплифициращ кодиращите последователности - екзони 2-5. В резултат на липса на покритие на интронните последователности и липсваща секвенционна информация, при анализа на данните се наблюдава т.н. проблем с фазирането. Така някой наблюдавани секвенционни комбинации се описват с повече от една двойка алели, какъвто е и случая за най-често наблюдаваната в проучването неразграничима алелна комбинация MICB*002,MICB∗005|MICB*018,MICB*019 (225). В настоящия дисертационен труд 65 проби с определен MICB полиморфизъм бяха типизирани посредством генотипизиращата система на GenDx. Праймерните сетове на GenDx (NGSgo-AmpX MICA,MICB) осигуряват пълно покритие на MIC гените, резултирайки в ампликони с дължина приблизително 13 kb. Подготовка на библиотеката в най-общ вариант включва следните етапи: ензимно фрагментиране на таргетната ДНК до вериги с дължина 200-400 базови двойки, поправка на краищата, добавяне на адаптори, обединяване на библиотеките, стъпка на пречистване и селекция на

фрагментите по размер чрез използване на магнитни микросфери и намножаване на селектираните фрагменти чрез т.н. емулсионен PCR, което се извърши напълно автоматизирано от апарат Ion Chef™. Процеса на същинско секвениране се осъществи на Ion GeneStudio S5 секвенционен апарат, а анализа на генерираните секвенции се извърши на NGSengine софтуер (IMGT/HLA 3.38.0, Нидерландия), който е включва два независими алгоритъма за фазиране: класически и групов (клъстер). На база статистически анализи на прочитанията, класическия алгоритъм определя за всяка позиция от секвенцията дали е хомозиготна или хетерозиготна. За всяка хетерозиготна позиция се определя нейната фаза (ориентация) като се сравнява с позицията на съседни хетерозиготни позиции. Груповия (клъстерен) алгоритъм за фазиране, разделя прочитанията на две групи на основа вероятност дадена група от прочитания да произлиза от един алел. Двата алгоритъма гарантират >95% точност на типизирането, като на база натрупания опит на работа със софтуера и валидиране на резултатите, като основен алгоритъм за анализ сме приели груповия алгоритъм. На 62 проби бе определен MICB алелния полиморфизъм посредством генотипизиращата система на CareDx – AlloSeq Tx17, която както бе описано по-рано, осигурява пълно екзонно покритие на MICA и MICB гените.

На фигура 7 е представен анализа свързан с разграничаването на алелните двойки MICB*002,MICB*005 и MICB*018,MICB*019 извършен на двата софтуера: AlloSeq Assign и NGSengine. Както ясно е представено на фигура 7 Б, в резултат на липса на покритие на цялата геномна секвенция и липсваща секвенционна информация за некодиращите последователности, при извършения анализ с AlloSeq Assign софтуер се проявява описания проблем с фазирането и софтуера изпитва затруднение в разграничаването на двете алелни комбинации. Използването на секвенционните китове осигуряващи покритие на цялата геномна секвенция, в конкретния случай на MICB гена, позволява правилното определяне на ориентацията на екзонните и интронни хетерозиготни позиции (фиг. 7В), осигурявайки важна фазова информация, а от там и възможност за разграничаване на неразграничими алелни комбинации и идентифицирането на нови или редки до този момент алели, чиито различия се намират извън кодиращите последователности.

Важно е да се отбележи, че данните включени в настоящия дисертационен труд са анализирани чрез използване на референтни секвенции от базата данни IMGT/HLA версия 3.38.0. (2019-10). Определените полиморфизми са на база наличната секвенционна информация към съответната дата, като попълването на някой липсващи

интронни секвенции би могло да доведе до промяна на определените генотипи или да генерира други неразграничими алелни комбинации.

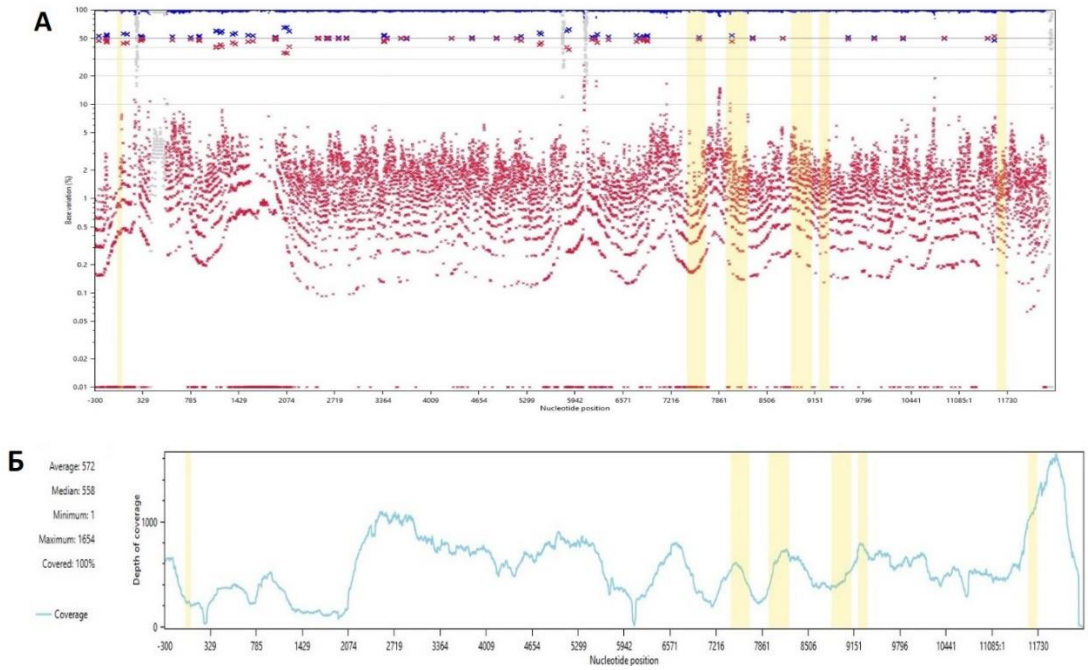


Фигура 7. Изглед от NGS софтуерите за анализ AlloSeq Assign (Б) и NGSengine (В), показващи анализа свързан с разграничаване на алелната комбинация MICB*002:01, MICB*005:02/MICB*018, MICB*019

А) *Покритие на MIC гените от различните секвенционни технологии GenDx и AlloSeq.* ***Б)*** *AlloSeq Assign софтуер даващ неразграничима алелна комбинация MICB*002:01, MICB*005:02/MICB*018, MICB*019 в резултат проблем с фазирането.* ***1 Б****, т.н. Доверителен участък: черните интервали индикират липса на покритие – ампликона не покрива цялата геномна секвенция на анализирания ген; белите участъци отговарят на покритите секвенции на гена.* ***2 Б****, екзон-интронна организация на локуса.* ***3 Б****, т.н. Фазов дисплей: в бяло са представени участъци, на които за всяка хетерозиготна позиция е определена нейната фаза (ориентация); в черно са представени участъци, където фазирането се губи.* ***4 Б****, Несъответствия във фазирането на Алел 1 и Алел 2. Несъответствия във фазирането се калкулират само за алелни двойки с най-малко секвенционни несъответствия.* ***В)*** *NGSengine® софтуер определящ секвенцията като MICB*018, MICB*019 с нула екзон-интронни различия.* ***1 В****, екзон-интронна организация на локуса.* ***2 В****, сивата хистограма изобразява всички прочитания, които покриват гена, като хетерозиготните позиции са представени с вертикални линии. Хоризонталната черна линия отдолу, представя хомозиготните позиции, докато хетерозиготните позиции са означени с букви отговарящи на съответните бази. Червената линия представя фазираните*

участъци, като свързва хетерозиготните позиции, чиято ориентация е определена заедно. ***3 B****, Два панела разделени от дебела черна линия, отразяващи всички прочитания покриващи двата алела (горен панел – прочитания принадлежащи към първия алел; долен панел – към втория алел).* ***4 B****, т.н. Класиране по генотип: отразява най-добре съвпадащия генотип със секвенцията, както и други алтернативни алели. Броя на несъвпаденията в екзоните е представен под колона Ex+, а несъвпаденията в некодиращите последователности под In колоната. В случая с MICB*018, MICB*019 други алтернативни алели не бяха представени.*

Качеството на генерираните секвенции също е важен индикатор за правилно генотипизиране. На фигура 8 са представени графики отразяващи базовата вариация (фиг. 8А) и дълбочината на базово покритие (фиг. 8 Б) за проба определена като MICB*018, MICB*019 генотип от NGSengine® софтуер. Два важни параметъра за определяне качеството на секвенцията са баланса между двата алела и нивото на шум – колкото по-ниско е нивото на шума (в случая под 10% за почти всички позиции), толкова е по-високо качеството на прочитанията. Важно наблюдение, което се извежда от графиката е наличието на ясно разграничаване между реалните базови прочити и шума, което е индикатор за високо качество на секвенциите и намалява вероятността за неправилна идентификация на хетерозиготни позиции между консенсусните секвенции на двата алела, в резултат на което се генерира хубава секвенция за изследване фазата на ампликона. Допълнително, баланса между двата алела също е добре представен със приблизително съотношение около 50% за всички хетерозиготни позиции. Наблюдава се сравнително равномерно покритие по цялата дължина на ампликона, със средната дълбочина на базово покритие 572 прочита.



Фигура 8. Изглед от NGS софтуера за анализ NGSengine отразяващ качествените параметри базовата вариация (А) и дълбочината на базово покритие (Б) за проба определена като MICB*018, MICB*019 генотип

А) *Базова вариация; На х оста са представени геномните позиции, като екзоните са представени в жълти ивици; на у-оста е представена базовата вариация в проценти (%). Сините символи представят най-често представената в секвенцията база за всяка позиция. Червените символи съответно представят останалите три бази за всяка позиция. Хомозиготните позиции са представени със син символ на равнището на 100%. Те са съпроводени обикновено и с червен символ на ниво под 10%, което представлява шум. Хетерозиготните позиции са представени със син и с червен символ на или около 50% линия. Добър алелен баланс се наблюдава, за хетерозиготни позиции, при които двете бази се срещат в съотношение равно или близко до 50%.* ***4 Б)*** *Дълбочина на базово покритие; На хоста са представени геномните позиции, като екзоните отново са отбелязани с жълта ивица; на у-оста са представени броя прочити.*

Ограничение на PCR-базираните NGS подходи е неспособността за обхващане на цели гени при наличието на дълги интрони между екзоните (какъвто е случая за гените в HLA комплекса), по-висока честота на отпадане на алели и алелен дисбаланс, както и вероятност за образуване на т.нар. хибридни алели в резултат на погрешно свързване на праймерите за сходна секвенция извън таргетния регион. По отношение работния процес, ограничения на PCR-базираните методи са висока чувствителност по отношение на изходната ДНК концентрация, необходимост от залагане на няколко отделни амплификационни реакции за една проба и съответно по-висок риск от замърсяване. Предимствата на новата хибридизационна NGS технология са свързани с преодоляване на част от тези ограничения, които се изразяват в по-ниска чувствителност към концентрацията на изходната ДНК, възможност за улавяна на всички таргетни гени за дадена проба в една реакция, липса на PCR артефакти и

хибридни алели, като за някой от локусите установяваме и намален процент неразграничими алелни комбинации (HLA-B, -DRB1/3/4/5, -DQB1, -DPA1) в сравнение с PCR-базираните подходи. Като недостатък на метода следва да се отчете липсата на пълно покритие на част от изследваните гени (HLA-DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA, MICB), което е предпоставка за генериране на неразграничими алелни комбинации.

Изследване на равновесието на Харди-Уайнбърг и глобалната неравновесна скаченост на изследваните класически и некласически HLA гени

Изследване на равновесието на Харди-Уайнбърг

Изследването на закона на Харди-Уайнбърг има за цел главно да провери дали определени сили оказват влияние върху популацията. За да се намира една популация в равновесие, то при нея трябва да са изпълнени няколко основни допускания: отсъствие на мутации (нови алели); случайно кръстосване; липса на миграция; голям размер на популацията и алелите в състава на популацията да не са подложени на естествен подбор. Тогава една популация е в съответствие с закона на Харди-Уайнбърг и може да се твърди, че не търпи еволюция. Когато някое от тези условия не е изпълнено, алелните и генотипни честоти в рамките на популацията търпят промени. Стандартните статистически подходи използвани за изследване на отклонения от равновесието на Харди-Уайнбърг (Хи-квадрат, точен тест на Фишер и Марковски вериги) се повлияват от проблеми характерни за работата с HLA данни каквито са например отпадането на алели и неразграничими алелни комбинации. LRT теста преодолява тези проблеми, като сравнява логаритъм от вероятностите на два модела – модел на изчислените честоти намиращи се в равновесие и модел, в който е включен параметър отговарящ за отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг (инбридинг коефициент) (220).

При изследване равновесието на Харди-Уайнбърг за всички анализирани локуси в различните изследвани групи здрави индивиди от българската популация с изключение на един (MICB), не се установява отклонение от равновесието (таблица 8). За MICB се наблюдава отклонение при две от изследваните групи – контролната група от млади индивиди и при цялостната група от изследвани здрави индивиди от българската популация (млади и стари). Описаните по-горе правила за намиране на една популация в равновесие са абсолютно в сила и при разглеждане на отделни гени в популацията. Интересно е наблюдението, че отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг в настоящата работа се установява именно в групите от здрави индивиди от

българската популация, при които се установяват и високи нива на срещане на малко описаните до този момент MICB*018, MICB*019 алели. В контекста на получените резултати, вероятно именно високата честота на срещане на тези MICB алели е и причината за наблюдаваното отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг.

Таблица 8. Изследване за отклонения от равновесието на Харди-Уайнбърг за всички локуси, при всички изследвани групи от българската популация

Локус	*Изследвани индивиди*	*Брой изследвани*	*p*
A	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	1
	Българи (млади)	541	1
B	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	0,641
	Българи (млади)	541	1
C	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	0,286
	Българи (млади)	541	1
DRB1	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	1
	Българи (млади)	541	1
DQA1	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	0,510
	Българи (млади)	541	1
DQB1	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	0,441
	Българи (млади)	541	1
DPB1	Българи	635	1
	Българи (стари)	94	1
	Българи (млади)	541	1
MICA	Българи	132	1
	Българи (стари)	40	0,731
	Българи (млади)	92	1
MICB	Българи	**118**	**0,039**
	Българи (стари)	40	1
	Българи (млади)	**78**	**0,022**
E	Българи	62	1
	Българи (стари)	40	1
	Българи (млади)	22	0,229
F	Българи	62	1
	Българи (стари)	40	1
	Българи (млади)	22	0,750
G	Българи	62	1
	Българи (стари)	40	1
	Българи (млади)	22	1
H	Българи	62	0,424
	Българи (стари)	40	0,747
	Българи (млади)	22	0,554

Локуси, за които се наблюдава отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг (p≤0.05) са означени с удебелен шрифт.

Глобална неравновесна скаченост

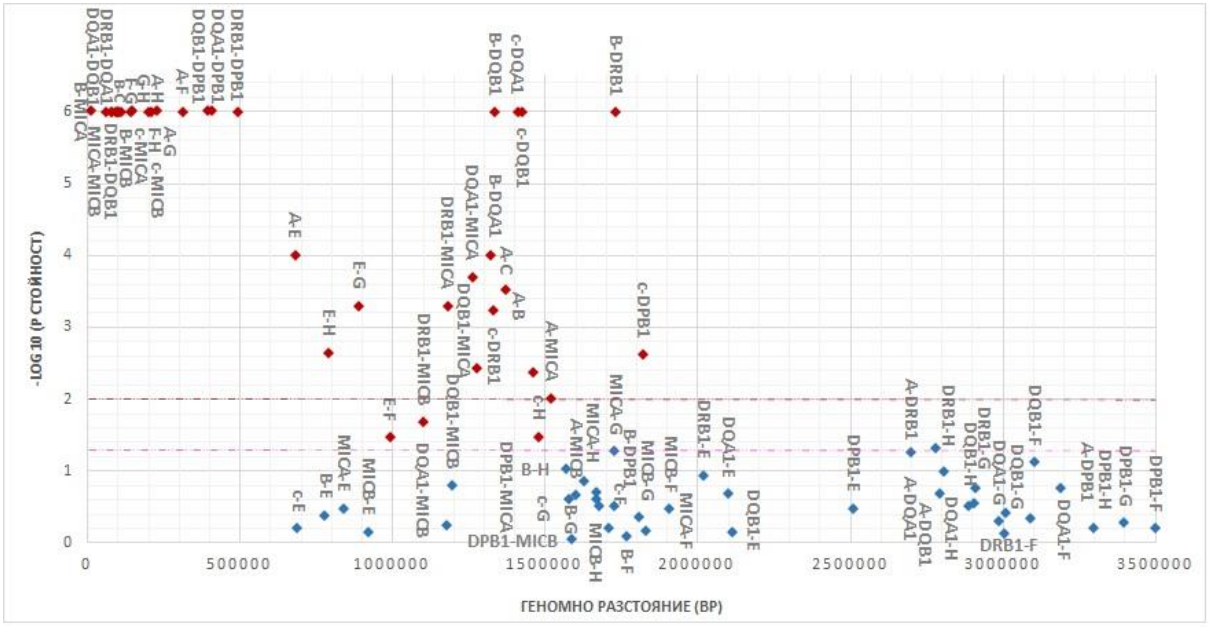
Поради уникалната генетична характеристика на HLA региона - състой се от множество мултиалелни локуси, освен изследването на скаченост между отделните алели в състава на всеки индивидуален хаплотип, от важно значение е и да се определи наличието/липсата на условна зависимост между отделните локуси (глобална неравновесна скаченост/ГНС). При изследването за глобална неравновесна скаченост се взимат в предвид всички възможни хаплотипи между два локуса. В някой случаи е възможно да се наблюдава липса на глобална неравновесна скаченост между два дадени локуса, но някой от техните хаплотипи да проявяват силно изразена неравновесна връзка.

	A	B	C	DRB1	DQA1	DQB1	DPB1	MICA	MICB	E	F	G	H
A	-	0,004	0,000	0,055	0,049	0,212	0,173	0,010	0,221	0,000	**0,000**	**0,000**	**0,000**
	B	-	**0,000**	0,000	0,000	0,000	0,315	0,000	0,000	0,420	0,838	0,255	0,094
		C	-	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,637	0,310	0,249	0,033
			DRB1	-	**0,000**	**0,000**	0,000	0,001	0,021	0,116	0,389	0,178	0,101
				DQA1	-	**0,000**	0,000	0,000	0,575	0,213	0,461	0,497	0,317
					DQB1	-	0,000	0,004	0,158	0,727	0,076	0,737	0,287
						DPB1	-	0,198	0,879	0,338	0,626	0,527	0,632
							MICA	-	0,000	0,345	0,677	0,053	0,139
								MICB	-	0,733	0,337	0,450	0,618
									E	-	0,033	0,001	0,002
										F	-	**0,000**	**0,000**
											G	-	**0,000**
												H	-

Фигура 9. Heat Map графика отразяваща силата на неравновесна скаченост между класически и некласически гени от HLA комплекса

Както става ясно от heat map графиката (фигура 9), класическите HLA клас I и клас II гени се намират в добре изразена ГНС помежду си, като тя е най-слабо представена между HLA-A локуса и HLA клас II гените, които съответно се намират и на най-голямо физическо разстояние. Сред некласическите MHC клас I свързани гени, MICA проявява по-добре изразена ГНС, като се намира в значима скаченост с почти всички класически HLA локуси с изключение на HLA-DPB1. MICB от своя страна се намира в ГНС с най-близко разположените HLA-B, -C, -DRB1 и MICA гени. Некласическите HLA клас I гени (HLA-E, -F, -G, -H) се намират в добре изразена ГНС

помежду си и с класическия HLA-A локус. Сред тях HLA-E локуса се откроява с по-слабо изразена връзка с останалите некласически HLA клас I гени , което се изразява в малко по-високи p стойности в сравнение с останалите локуси. ГНС се установява и между HLA-C и H локусите. Резултатите от проведения анализ показват силна изразена зависимост между физическото разстояние делящо отделните локуси и силата на ГНС помежду им – колкото по-голямо е физическото разстояние делящо два локуса, толкова по-малко вероятно е те да се намират в ГНС (фигура 10).



Фигура 10. Графика отразяваща връзката между силата на глобалната неравновесна скаченост (ГНС) и разстоянието между два локуса. *На X оста е представено разстоянието между два локуса (в базови двойки), а на Y оста отрицателен десетичен логаритъм от P стойностите на LRT теста. За статистически значими се считат стойности на P по-малки или равни на 0.01. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над и на линията са със стойности на p ≤ 0.01, а съответно точки под линията са с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над и на линията са със стойности на p ≤ 0.05. Не са представени хаплотипи със p стойности на LRT теста равни на 1.*

КЛАСИЧЕСКИ HLA

I. Изследване на алелния полиморфизъм на класически HLA клас I и клас II гени при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

В настоящото проучване изследвахме разпределението на класическите HLA клас I гени при 635 здрави индивиди от българската популация (таблица 9). Очаквано, най-висока степен на полиморфизъм се установява за HLA-B локуса с 59 наблюдавани алела. Най-често представените класически клас I алели в здравата българска популация са както следва: HLA-A*02:01:01 (28.9%), -B*51:01:01 (12.04%) и -

C*04:01:01 (17.63%). Честотата на срещане на тези алели в българската популация е съпоставима с алелната честота наблюдавана в съседни Балкански популации и някой страни от централна и западна Европа.

Таблица 9. HLA клас I алелно разпределение при здрави индивиди от българската популация (n=635)

Алел	АЧ	Брой	Алел	АЧ	Брой	Алел	АЧ	Брой
A*02:01:01	0,2891	366,0	**B*51:01:01**	0,1204	151,9	**C*04:01:01**	0,1763	219,0
A*24:02:01	0,1319	167,0	**B*18:01:01**	0,1141	144,0	**C*07:01:01**	0,1643	204,1
A*01:01:01	0,1224	155,0	**B*35:01:01**	0,0721	91,0	**C*12:03:01**	0,1095	136,0
A*03:01:01	0,0979	123,9	**B*08:01:01**	0,0578	72,9	**C*02:02:02**	0,095	118,0
A*11:01:01	0,079	100,0	**B*35:03:01**	0,0523	66,0	**C*06:02:01**	0,0813	101,0
A*32:01:01	0,0529	67,0	**B*38:01:01**	0,0428	54,0	**C*07:02:01**	0,0451	56,0
A*26:01:01	0,045	57,0	**B*44:02:01**	0,0396	50,0	**C*15:02:01**	0,0411	51,0
A*25:01:01	0,0237	30,0	**B*07:02:01**	0,0372	46,9	**C*01:02:01**	0,0378	46,9
A*23:01:01	0,0229	29,0	**B*13:02:01**	0,0317	40,0	**C*05:01:01**	0,033	41,0
A*31:01:02	0,0166	21,0	**B*27:05:02**	0,0261	32,9	**C*14:02:01**	0,0306	38,0
A*68:01:02	0,0158	20,0	**B*27:02:01**	0,0246	31,0	**C*03:03:01**	0,029	36,0
A*33:01:01	0,0142	18,0	**B*35:02:01**	0,0238	30,0	**C*08:02:01**	0,0209	26,0
A*30:01:01	0,0134	17,0	**B*14:02:01**	0,0222	28,0	**C*03:04:01**	0,0177	22,0
A*68:01:01	0,0111	14,1	**B*40:02:01**	0,0214	27,0	**C*07:04:01**	0,0161	20,0
A*29:02:01	0,0095	12,0	**B*44:03:01**	0,0206	26,0	**C*12:02:02**	0,0137	17,0
A*69:01:01	0,0079	10,0	**B*35:08:01**	0,0206	26,0	**C*07:18:01**	0,0137	17,0
A*33:03:01	0,0055	7,0	**B*49:01:01**	0,0206	26,0	**C*16:02:01**	0,0129	16,0
A*30:02:01	0,0055	7,0	**B*57:01:01**	0,0198	25,0	**C*17:01:01**	0,0113	14,0
A*30:04:01	0,0055	7,0	**B*41:01:01**	0,019	24,0	**C*07:01:02**	0,0105	13,0
A*24:03:01	0,0039	4,9	**B*44:05:01**	0,0174	22,0	**C*16:01:01**	0,0056	7,0
A*29:01:01	0,0039	4,9	**B*55:01:01**	0,0166	20,9	**C*16:04:01**	0,0056	7,0
A*68:02:01	0,0032	4,1	**B*15:01:01**	0,0158	19,9	**C*07:06**	0,004	5,0
A*02:17:02	0,0032	4,1	**B*52:01:01**	0,0158	19,9	**C*15:05:02**	0,004	5,0
A*02:11:01	0,0024	3,0	**B*39:01:01**	0,0151	19,1	**C*17:03:01**	0,0024	3,0
A*02:05:01	0,0016	2,0	**B*58:01:01**	0,0151	19,1	**C*15:05:01**	0,0024	3,0
A*68:57	0,0016	2,0	**B*40:01:02**	0,0127	16,0	**C*15:04:01**	0,0024	3,0
A*24:07:01	0,0016	2,0	**B*50:01:01**	0,0127	16,0	**C*15:13:01**	0,0024	3,0
A*02:06:01	0,0016	2,0	**B*37:01:01**	0,0095	12,0	**C*03:02:02**	0,0024	3,0
A*26:08:01	0,0008	1,0	**B*44:27:01**	0,0079	10,0	**C*12:12**	0,0024	3,0
A*02:09:01	0,0008	1,0	**B*56:01:01**	0,0079	10,0	**C*15:06:01**	0,0016	2,0
A*31:01:02N	0,0008	1,0	**B*47:01:01**	0,0063	8,0	**C*03:04:02**	0,0008	1,0
A*03:02:01	0,0008	1,0	**B*15:17:01**	0,0063	8,0	**C*08:01:01**	0,0008	1,0
A*31:28	0,0008	1,0	**B*18:03:01**	0,0055	6,9	**C*12:03:06**	0,0008	1,0
A*02:02:01	0,0008	1,0	**B*44:03:02**	0,004	5,0	**C*04:04:01**	0,0008	1,0
A*29:10:01	0,0008	1,0	**B*07:05:01**	0,004	5,0	**C*15:08:01**	0,0008	1,0
A*01:04:01	0,0008	1,0	**B*40:06:01**	0,004	5,0	**C*03:19**	0,0008	1,0
A*66:01:01	0,0008	1,0	**B*51:05**	0,0024	3,0			

B*15:08:01	0,0024	3,0
B*39:06:02	0,0024	3,0
B*73:01:01	0,0024	3,0
B*51:08:01	0,0024	3,0
B*39:24:01	0,0024	3,0
B*18:04:01	0,0024	3,0
B*41:02:01	0,0024	3,0
B*18:05:01	0,0016	2,0
B*39:31:01	0,0016	2,0
B*15:73:01	0,0016	2,0
B*53:01:01	0,0016	2,0
B*15:10:01	0,0016	2,0
B*40:01:01	0,0016	2,0
B*48:01:01	0,0008	1,0
B*15:24:01	0,0008	1,0
B*51:07:01	0,0008	1,0
B*27:19:01	0,0008	1,0
B*39:01:24	0,0008	1,0
B*78:02:01	0,0008	1,0
B*18:33	0,0008	1,0
B*15:09:01	0,0008	1,0
B*15:27:01	0,0008	1,0

АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; n, Брой изследвани индивиди

Сред класическите HLA клас II гени, най-висока степен на полиморфизъм се установява за HLA-DRB1 локуса с установени 53 алела (таблица 10). Най-често представените клас II алели при здрави индивиди от българската популации са както следва: HLA-DRB1*11:04:01 (13.3%), -DQA1*05:05:01 (26.1%), -DQB1*03:01:01 (28.0%) и -DPB1*04:01:01 (36%).

Таблица 10. HLA клас II алелно разпределение при здрави индивиди от българската популация (n=635)

Алел	АЧ	Брой	Алел	АЧ	Брой	Алел	АЧ	Брой
DRB1*11:04:01	0,133	167,8	**DQA1*05:05:01**	0,2605	322,0	**DPB1*04:01:01**	0,3598	449,0
DRB1*16:01:01	0,1122	141,6	**DQA1*01:02:02**	0,1335	165,0	**DPB1*04:02:01**	0,1923	240,0
DRB1*03:01:01	0,0862	108,8	**DQA1*05:01:01**	0,093	114,9	**DPB1*02:01:02**	0,1915	239,0
DRB1*11:01:01	0,082	103,5	**DQA1*01:03:01**	0,0858	106,0	**DPB1*03:01:01**	0,043	53,7
DRB1*07:01:01	0,0786	99,2	**DQA1*01:02:01**	0,0825	102,0	**DPB1*01:01:01**	0,0296	36,9
DRB1*13:01:01	0,0656	82,8	**DQA1*03:01:01**	0,0801	99,0	**DPB1*10:01:01**	0,0208	26,0
DRB1*01:01:01	0,0604	76,2	**DQA1*02:01:01**	0,072	89,0	**DPB1*14:01:01**	0,0208	26,0
DRB1*15:01:01	0,0544	68,7	**DQA1*01:01:01**	0,0623	77,0	**DPB1*104:01**	0,0195	24,3
DRB1*13:02:01	0,032	40,4	**DQA1*01:04:01**	0,0453	56,0	**DPB1*17:01:01**	0,0176	22,0
DRB1*04:02:01	0,0293	37,0	**DQA1*03:03:01**	0,0275	34,0	**DPB1*13:01:01**	0,0149	18,6
DRB1*04:03:01	0,0268	33,8	**DQA1*01:05:01**	0,0129	15,9	**DPB1*23:01:01**	0,0144	18,0

DRB1*14:54:01	0,0242	30,5	**DQA1*01:01:02**	0,0113	14,0	**DPB1*05:01:01**	0,0112	14,0
DRB1*15:02:01	0,0199	25,1	**DQA1*04:01:01**	0,0097	12,0	**DPB1*06:01:01**	0,0112	14,0
DRB1*11:03:01	0,0164	20,7	**DQA1*03:02:01**	0,0049	6,1	**DPB1*09:01:01**	0,0072	9,0
DRB1*04:01:01	0,0155	19,6	**DQA1*05:09**	0,0049	6,1	**DPB1*11:01:01**	0,0064	8,0
DRB1*14:01:01	0,0155	19,6	**DQA1*01:04:02**	0,004	4,9	**DPB1*107:01**	0,0059	7,4
DRB1*04:05:01	0,0138	17,4	**DQA1*04:01:02**	0,004	4,9	**DPB1*15:01:01**	0,0056	7,0
DRB1*10:01:01	0,013	16,4	**DQA1*06:01:01**	0,0024	3,0	**DPB1*19:01:01**	0,0056	7,0
DRB1*13:03:01	0,013	16,4	**DQA1*05:03**	0,0016	2,0	**DPB1*02:01:01**	0,0032	4,0
DRB1*01:02:01	0,013	16,4	**DQA1*04:02**	0,0008	1,0	**DPB1*34:01**	0,0032	4,0
DRB1*12:01:01	0,0121	15,3	**DQA1*06:04:01**	0,0008	1,0	**DPB1*124:01**	0,0024	3,0
DRB1*16:02:01	0,0121	15,3				**DPB1*416:01**	0,0024	3,0
DRB1*04:04:01	0,0112	14,1				**DPB1*105:01**	0,0024	3,0
DRB1*08:01:01	0,0104	13,1				**DPB1*51:01**	0,0016	2,0
DRB1*14:04:01	0,0052	6,6	**Алел**	**АЧ**	**Брой**	**DPB1*116:01**	0,0008	1,0
DRB1*09:01:02	0,0052	6,6	**DQB1*03:01:01**	0,2797	334,0	**DPB1*20:01:01**	0,0008	1,0
DRB1*04:07:01	0,0035	4,4	**DQB1*05:02:01**	0,1357	162,0	**DPB1*414:01**	0,0008	1,0
DRB1*08:04:01	0,0035	4,4	**DQB1*02:01:01**	0,0913	109,0	**DPB1*164:01**	0,0008	1,0
DRB1*08:03:02	0,0026	3,3	**DQB1*05:01:01**	0,0879	105,0	**DPB1*442:01**	0,0008	1,0
DRB1*03:01:08	0,0026	3,3	**DQB1*03:02:01**	0,0737	88,0	**DPB1*46:01:01**	0,0008	1,0
DRB1*03:147	0,0019	2,4	**DQB1*06:03:01**	0,0704	84,1	**DPB1*26:01:02**	0,0008	1,0
DRB1*04:06:02	0,0017	2,1	**DQB1*02:02:01**	0,0678	81,0	**DPB1*02:02:01**	0,0008	1,0
DRB1*13:14:01	0,0017	2,1	**DQB1*05:03:01**	0,0536	64,0	**DPB1*16:01:01**	0,0008	1,0
DRB1*13:05:01	0,0017	2,1	**DQB1*06:02:01**	0,0377	45,0			
DRB1*15:07:01	0,0017	2,1	**DQB1*06:04:01**	0,0235	28,1			
DRB1*11:01:02	0,0017	2,1	**DQB1*04:02:01**	0,0209	25,0			
DRB1*11:04:17	0,0017	2,1	**DQB1*03:03:02**	0,0151	18,0			
DRB1*04:10:01	0,0017	2,1	**DQB1*06:01:01**	0,0151	18,0			
DRB1*04:15	0,0009	1,1	**DQB1*03:05:01**	0,0075	9,0			
DRB1*11:12:01	0,0009	1,1	**DQB1*06:09:01**	0,005	6,0			
DRB1*14:07:01	0,0009	1,1	**DQB1*05:02:02**	0,0025	3,0			
DRB1*03:06	0,0009	1,1	**DQB1*03:04:01**	0,0025	3,0			
DRB1*04:02:02	0,0009	1,1	**DQB1*05:04**	0,0017	2,0			
DRB1*16:05:02	0,0009	1,1	**DQB1*03:01:02**	0,0008	1,0			
DRB1*16:01:07	0,0009	1,1	**DQB1*02:03**	0,0008	1,0			
DRB1*16:02:09	0,0009	1,1	**DQB1*05:03:02**	0,0008	1,0			
DRB1*04:08:01	0,0009	1,1	**DQB1*02:01:02**	0,0008	1,0			
DRB1*13:01:19	0,0009	1,1	**DQB1*03:01:09**	0,0008	1,0			
DRB1*14:54:07	0,0009	1,1	**DQB1*03:03:03**	0,0008	1,0			
DRB1*14:04:07	0,0009	1,1	**DQB1*06:03:04**	0,0008	1,0			
DRB1*15:02:02	0,0009	1,1	**DQB1*06:03:02**	0,0008	1,0			
DRB1*11:04:20	0,0009	1,1	**DQB1*03:12**	0,0008	1,0			
DRB1*11:01:30	0,0009	1,1	**DQB1*05:159**	0,0008	1,0			

АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; n, Брой изследвани индивиди

Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

При млади индивиди най-често срещаните класически HLA алели са както следва: HLA-A*02:01:01, HLA-B*51:01:01, HLA-C*04:01:01, HLA-DRB1*11:04:01, HLA-DQB1*03:01:01, HLA-DQA1*05:05:01 и HLA-DPB1*04:01:01. Това разпределение, не се различава от наблюдаваното при дълголетници от българската популация, с изключение на HLA-C локуса, за който най-често представения алел при възрастни индивиди е HLA-C*07:01:01, следван от HLA-C*04:01:01 алела.

Таблица 11. Класически HLA клас I и клас II алели наблюдавани със значими различия в алелните честоти между възрастни и млади от българската популация

Класически HLA клас I и клас II алел	Брой Млади	Брой Стари	P	Pc	OR	95% CI долна граница	95% CI горна граница
A*01:01:01	123,0	32,0	**0,03**	0,9	1,62	1,06	2,47
C*01:02:01	35,0	12,0	**0,04**	1,38	2,01	1,03	3,96
C*07:01:02	**7,0**	**6,0**	**0,001**	**0,05**	**5,02**	**1,67**	**15,13**
DRB1*14:54:01	28,0	0,0	**0,04**	1,81			
DRB1*04:10:01	**0,0**	**2,0**	**0,0002**	**0,01**			
DPB1*01:01:01	36,0	1,0	**0,04**	1,26	0,16	0,02	1,15
DPB1*02:01:02	190,0	49,0	**0,005**	0,19	1,67	1,16	2,40

Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; n, брой изследвани индивиди; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). Корекцията на Бонферони е извършена с коефициент равен на броя извършени независими сравнения. Коригирани P стойности (Pc) ≤ 0.05 се считат за статистически значими

При извършения сравнителен анализ се установяват няколко статистически значими различия в алелното разпределения на класическите HLA при дълголетници и млади индивиди (таблица 11). След прилагане корекция на Бонферони за множественост, **HLA-C*07:01:02** и **-DRB1*04:10:01** алелите се открояват със статистически значима повишена честота при възрастни. В съответствие с предходни проучвания на изследователския колектив върху дълголетници от българската популация (161), **HLA-A*01:01:01**, **-C*07:01:02** и **-B*15:17:01** алелните специфичности се наблюдават с по-високата честота при дълголетници в сравнение с изследваната група от млади индивиди, като след прилагане корекцията на Бонферони, статистическата значимост на наблюдаваните разлики се губи, а за C*07:01:02 статистическата значимост придобива гранични стойности. Алелната група HLA-C*07 е описана като протективна за аксиален спондилоартрит, независимо от HLA-B*27

(един от главните асоциирани генетични детерминанти на групата заболявания спондилоартрити (СпА)) в германската популация (226). Интересно е да се отбележи, че самата HLA-B*27 алелна група се наблюдава с по-висока честота в групата от млади индивиди в сравнение с дълголетниците [p= 0.575; OR: 0.81, 95% CI (0.38 – 1.72)]. Допълнително, HLA-C*07 е описана с по-добро представяне на пептиди получени от широко разпространения при всички човешки популации CMV на Т клетките и съответно по-голяма устойчивост на инфекцията (226). HLA-A*01:01 от своя страна е един от най-често представените HLA-A алели в Кавказоидната раса. Редица проучвания сочат за HLA-A*01:01 свързано Т-клетъчно представяне на консервативни епитопи, срещани при вирусни протеини (аденовируси), както и при туморни антигени каквито са WT1 (при хематологични и солидни злокачествени заболявания) и MAGE-1 (меланомен антигенен) (227–231). При носителите на този алел се наблюдава предизвикване на силен, цитотоксичен Т клетъчен отговор и висока имуногенност. От друга страна съществуват сведения за слаб Т-клетъчно медииран имунен отговор при носители на HLA-A*01 алелната група срещу грипен вирус тип А (H7N9) и EBV инфекция (232,233). Алела е описан и като предразполагащ за псориатичен артрит при китайци (234). Сравнителния анализ на HLA II алелните честоти разкри статистически значима повишена честота при възрастни за сравнително рядко срещания алел **DRB1*04:10:01**, който не се среща в изследваната група от млади индивиди. DRB1*04 алелната група е описана като протективен алел за диабет тип 1 в една от популациите с най-висока честота на дълголетници – Сардиния (235). HLA-DRB1*11:04:01 е най-често представената алелна специфичност и в двете изследвани групи, като съставлява по 13% от HLA-DRB1 алелния репертоар.

II. Дву-локусни хаплотипи

1. HLA клас I дву-локусни хаплотипни асоциации (HLA-A, -B, -C) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

Най-често представените дву-локусни HLA клас I хаплотипи при млади индивиди от българската популация са: A*02:01:01~B*51:01:01 (5.4%), A*02:01:01~C*02:02:02 (5.4%) и B*18:01:01~C*07:01:01 (7.4%). 90% от представените в таблица 12 дву-локусни хаплотипи при млади индивиди от българската популация, се намират в статистически значима неравновесна скаченост. Най-добре представена е

неравновесната връзка в състава на хаплотипните асоциации между HLA-B и –C локусите, като всички представени хаплотипи (ХЧ>3%) са скачени и се характеризират със стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 9.971 и 27.762.

Таблица 12. Най-често срещани реални, дву-локусни HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Класически HLA клас I хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*02:01:01~B*51:01:01	**0,0542**	**0,0332**	**3,726**	**58,6**	**5,4**
A*02:01:01~B*18:01:01	**0,0490**	**0,0324**	**2,977**	**53,0**	**4,9**
A*01:01:01~B*08:01:01	**0,0421**	**0,0064**	**14,577**	**45,6**	**4,2**
A*02:01:01~C*02:02:02	**0,0538**	**0,0283**	**4,924**	**58,2**	**5,38**
A*02:01:01~C*07:01:01	0,0513	0,0462	0,761	55,5	5,13
A*01:01:01~C*07:01:01	**0,0476**	**0,0183**	**7,042**	**51,5**	**4,76**
A*24:02:01~C*04:01:01	**0,0373**	**0,0250**	**2,530**	**40,4**	**3,73**
A*11:01:01~C*04:01:01	**0,0323**	**0,0138**	**5,128**	**34,9**	**3,23**
B*18:01:01~C*07:01:01	**0,0743**	**0,0182**	**13,558**	**80,4**	**7,4**
B*35:01:01~C*04:01:01	**0,0702**	**0,0135**	**15,950**	**76,0**	**7,0**
B*08:01:01~C*07:01:01	**0,0539**	**0,0091**	**15,382**	**58,3**	**5,4**
B*35:03:01~C*04:01:01	**0,0396**	**0,0097**	**9,971**	**42,8**	**4,0**
B*38:01:01~C*12:03:01	**0,0388**	**0,0044**	**17,032**	**42,0**	**3,9**
B*07:02:01~C*07:02:01	**0,0386**	**0,0019**	**27,762**	**41,8**	**3,9**
B*51:01:01~C*15:02:01	**0,0315**	**0,0042**	**13,903**	**34,1**	**3,2**
B*44:02:01~C*05:01:01	**0,0312**	**0,0015**	**25,289**	**33,8**	**3,1**
B*51:01:01~C*14:02:01	**0,0305**	**0,0037**	**14,402**	**33,0**	**3,1**
B*13:02:01~C*06:02:01	**0,0295**	**0,0024**	**18,275**	**31,9**	**3,0**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

При дълголетници най-често наблюдаваните хаплотипи са както следва: A*02:01:01~B*18:01:01 (5.9%), A*02:01:01~B*51:01:01 (5.8%), A*02:01:01~C*07:01:01 (9.4%) и B*18:01:01~C*07:01:01 (8.7%) (таблица 13). Аналогично на наблюдението описано при млади индивиди и при възрастни, всички HLA-B-C хаплотипи наблюдавани с честота равна или по-голяма от 3% се намират в неравновесна скаченост.

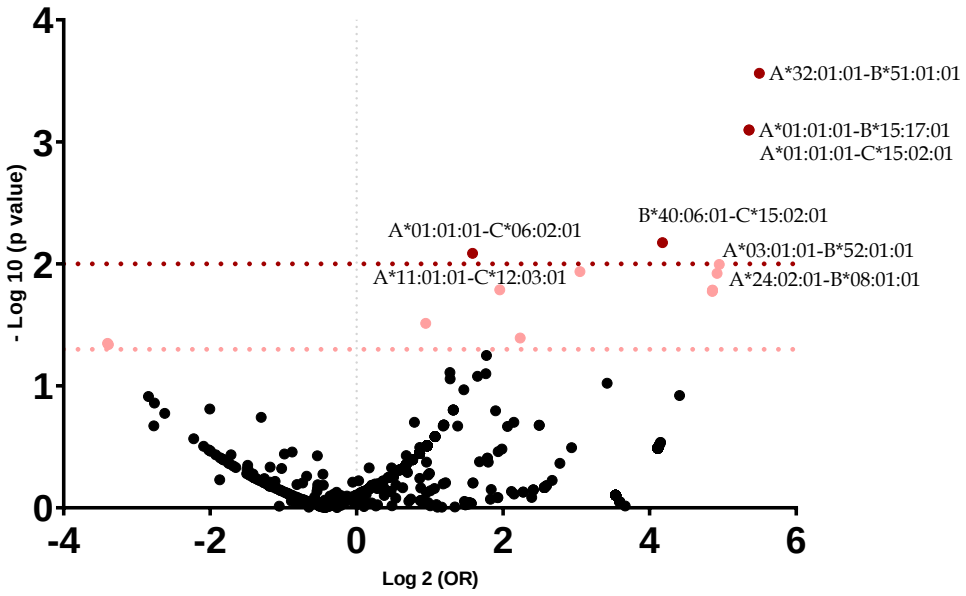
Таблица 13. Най-често срещани класически HLA клас I дву-локусни хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Класически HLA клас I хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*02:01:01~B*18:01:01	0,0589	0,0356	1,660	11,1	5,9
A*02:01:01~B*51:01:01	0,0579	0,0437	0,911	10,9	5,8
A*11:01:01~B*35:01:01	**0,0372**	**0,0052**	**6,071**	**7,0**	**3,7**
A*01:01:01~B*08:01:01	**0,0367**	**0,0111**	**3,314**	**6,9**	**3,7**
A*02:01:01~B*38:01:01	0,0325	0,0162	1,746	6,1	3,3
A*02:01:01~C*07:01:01	**0,0942**	**0,0539**	**2,316**	**17,7**	**9,4**
A*01:01:01~C*06:02:01	**0,051**	**0,0172**	**3,502**	**9,6**	**5,1**
A*01:01:01~C*07:01:01	0,0426	0,0308	0,909	8,0	4,3
A*11:01:01~C*04:01:01	**0,0413**	**0,0153**	**2,865**	**7,8**	**4,1**
A*02:01:01~C*12:03:01	0,0403	0,0349	0,393	7,6	4,0
A*02:01:01~C*02:02:02	0,0397	0,0222	1,593	7,5	4,0
A*02:01:01~C*01:02:01	**0,0392**	**0,0190**	**1,989**	**7,4**	**3,9**
A*24:02:01~C*07:01:01	0,0319	0,0164	1,653	6,0	3,2
B*18:01:01~C*07:01:01	**0,0873**	**0,0216**	**6,054**	**16,4**	**8,7**
B*08:01:01~C*07:01:01	**0,0548**	**0,0118**	**5,397**	**10,3**	**5,5**
B*51:01:01~C*15:02:01	**0,0532**	**0,0101**	**5,835**	**10,0**	**5,3**
B*38:01:01~C*12:03:01	**0,0532**	**0,0064**	**8,033**	**10,0**	**5,3**
B*35:01:01~C*04:01:01	**0,0495**	**0,0087**	**5,988**	**9,3**	**5,0**
B*35:03:01~C*04:01:01	**0,0385**	**0,0069**	**5,175**	**7,2**	**3,9**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на HLA клас I дву-локусните хаплотипи при двете изследвани групи

От извършения сравнителен анализ пет класически HLA клас I дву-локусни хаплотипа се открояват със сила, статистически значима ($p \leq 0.01$) повишена честота при дълголетници (фигура 11). HLA клас I алелни специфичности в състава на тези хаплотипи са HLA-A*01:01, *03:01, *32:01; -B*15:17, *40:06, B*51:01, *52:01, -C*06:02, *15:02.



Фигура 11. Разпределение на HLA клас I дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

Хаплотипи, които се установяват с повишена честота в изследваната група от дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост ($0.01 \leq p \leq 0.05$) са както следва: ***A*11:01:01-C*12:03:01*** (ХЧ стари: 0.0195, ХЧ млади: 0.0024, p= 0.011), ***A*03:01:01-C*12:02:02*** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.016), ***A*32:01:01-C*01:02:01*** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.016), ***A*02:01:01-C*07:01:01*** (ХЧ стари: 0.0513, ХЧ млади: 0.0942, p= 0.03), ***B*15:17:01-C*07:01:02*** (ХЧ стари: 0.0191, ХЧ млади: 0.0046, p= 0.04), ***A*24:02:01-B*08:01:01*** (ХЧ стари: 0.0112, ХЧ млади: 0, p= 0.011), ***A*02:01:01-B*38:01:01*** (ХЧ стари: 0.0325, ХЧ млади: 0.0086, p= 0.016), ***A*26:01:01-B*15:01:01*** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.016).

Срещат се и хаплотипи, които се наблюдават само в изследваната група от млади здрави индивиди и гранични стойности на статистическа значимост: ***A*02:01:01-C*05:01:01*** (ХЧ стари=0, ХЧ млади=0.0458, p=0.03), ***B*27:02:01-C*02:02:02*** (ХЧ стари=0, ХЧ млади=0.0448, p=0.03).

2. HLA клас II дву-локусни хаплотипни асоциации (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

DRB1*11:04:01, DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01 и DPB1*04:02:01 алелите са в основата на най-често наблюдаваните дву-локусни, класически HLA клас II хаплотипи при млади индивиди: DQA1*05:05:01~DQB1*03:01:01 (25.2%), DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01 (13.5%), DRB1*11:04:01~DQB1*03:01:01 (13.4%), DQA1*05:05:01-DPB1*04:02:01 (9.4%), DQB1*03:01:01~DPB1*04:02:01 (9.7%) и DRB1*11:04:01-DPB1*04:02:01 (7.3%). 100% от представените най-често срещани (ХЧ > 3%) HLA-DQA1-DQB1, HLA-DRB1-DQA1, HLA-DRB1-DQB1 се намират в силно изразена неравновесна скаченост със стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 12.083 и 29.604 (таблица 14). По-слабо изразена е скачеността на HLA клас II локусите с HLA-DPB1 локуса, със стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 2.118 и 9.286, като 16 от представените 22 хаплотипа се намират в неравновесна скаченост.

Таблица 14. Най-често срещани реални, дву-локусни HLA клас II хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Класически HLA клас II хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
DQA1*05:05:01~DQB1*03:01:01	0,2515	0,0705	21,532	269,6	25,2
DQA1*01:02:02~DQB1*05:02:01	0,1303	0,0186	26,576	139,7	13
DQA1*05:01:01~DQB1*02:01:01	0,0874	0,0086	27,788	93,7	8,7
DQA1*01:03:01~DQB1*06:03:01	0,067	0,006	25,713	71,8	6,7
DQA1*03:01:01~DQB1*03:02:01	0,0653	0,0056	26,183	70	6,5
DQA1*02:01:01~DQB1*02:02:01	0,0625	0,0051	26,114	67	6,3
DQA1*01:01:01~DQB1*05:01:01	0,0603	0,0055	24,147	64,6	6
DQA1*01:04:01~DQB1*05:03:01	0,0438	0,0025	27,232	47	4,4
DQA1*01:02:01~DQB1*06:02:01	0,0423	0,0035	21,279	45,3	4,2
DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01	0,1351	0,0347	17,412	146,2	13,5
DRB1*16:01:01-DQA1*01:02:02	0,1086	0,0149	25,069	117,5	10,9
DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01	0,0856	0,0081	28,263	92,6	8,6
DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01	0,0743	0,0208	12,083	80,4	7,4
DRB1*07:01:01-DQA1*02:01:01	0,0739	0,0057	29,572	80,0	7,4
DRB1*13:01:01-DQA1*01:03:01	0,0666	0,0058	26,069	72,1	6,7
DRB1*01:01:01-DQA1*01:01:01	0,0581	0,0036	29,604	62,9	5,8
DRB1*15:01:01-DQA1*01:02:01	0,0489	0,0050	19,859	52,9	4,9
DRB1*13:02:01-DQA1*01:02:01	0,0334	0,0029	18,669	36,1	3,3

DRB1*11:04:01~DQB1*03:01:01	**0,1341**	**0,0377**	**16,005**	144,8	13,4
DRB1*16:01:01~DQB1*05:02:01	**0,1072**	**0,0152**	**24,322**	115,8	10,7
DRB1*03:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0857**	**0,0081**	**28,273**	92,6	8,6
DRB1*11:01:01~DQB1*03:01:01	**0,0790**	**0,0226**	**12,204**	85,3	7,9
DRB1*13:01:01~DQB1*06:03:01	**0,0662**	**0,0048**	**29,195**	71,5	6,6
DRB1*07:01:01~DQB1*02:02:01	**0,0638**	**0,0054**	**25,957**	68,9	6,4
DRB1*01:01:01~DQB1*05:01:01	**0,0567**	**0,0053**	**23,059**	61,2	5,7
DRB1*15:01:01~DQB1*06:02:01	**0,0406**	**0,0024**	**25,498**	43,8	4,1
DQA1*05:05:01-DPB1*04:02:01	**0,0942**	**0,0498**	**6,369**	101,5	9,4
DQA1*03:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0498**	**0,028**	**4,207**	53,7	5
DQA1*05:05:01-DPB1*02:01:02	0,0464	0,0455	0,137	50	4,6
DQA1*01:02:02-DPB1*04:02:01	**0,0386**	**0,0264**	**2,439**	41,6	3,9
DQA1*01:02:01-DPB1*04:01:01	0,033	0,0307	0,42	35,6	3,3
DQA1*01:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0327**	**0,022**	**2,356**	35,3	3,3
DQB1*03:01:01~DPB1*04:02:01	**0,0968**	**0,0541**	**5,862**	104,2	9,7
DQB1*05:01:01~DPB1*04:01:01	**0,0491**	**0,0321**	**3,065**	52,8	4,9
DQB1*05:02:01~DPB1*04:02:01	**0,0413**	**0,0269**	**2,831**	44,4	4,1
DQB1*03:02:01~DPB1*04:01:01	**0,0407**	**0,0254**	**3,112**	43,8	4,1
DRB1*11:04:01-DPB1*04:02:01	**0,0734**	**0,02665**	**9,286**	79,2	7,34
DRB1*11:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0404**	**0,02922**	**2,117**	43,6	4,04
DRB1*16:01:01-DPB1*04:02:01	**0,0351**	**0,02158**	**2,990**	37,9	3,51
DRB1*01:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0324**	**0,02131**	**2,47**	34,9	3,24
DRB1*15:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0304**	**0,02095**	**2,123**	32,8	3,04

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

По-голямо разнообразие от алели стоят в основата на най-често представените HLA клас II хаплотипи при дълголетници: DQA1*05:05:01~DQB1*03:01:01 (27.7%), DRB1*11:04:01~DQA1*05:05:01 (12.4), DRB1*11:04:01~DQB1*03:01:01 (12.3%), DQA1*05:05:01~DPB1*04:02:01 (10.4%), DQB1*03:01:01~DPB1*02:01:02 (12.1%) и DRB1*11:04:01~DPB1*02:01:02 (6.7%). Асоциацията на HLA-DQA1, -DQB1, -DRB1 локусите с HLA-DPB1 локуса е най-слабо представена (таблица 15).

Таблица 15. Най-често срещани реални, дву-локусни HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
DQA1*05:05:01~DQB1*03:01:01	**0,2766**	**0,0842**	**8,704**	**52,0**	**27,7**
DQA1*01:02:02~DQB1*05:02:01	**0,1277**	**0,0176**	**11,288**	**24,0**	**12,8**
DQA1*03:01:01~DQB1*03:02:01	**0,0957**	**0,0088**	**12,625**	**18,0**	**9,6**

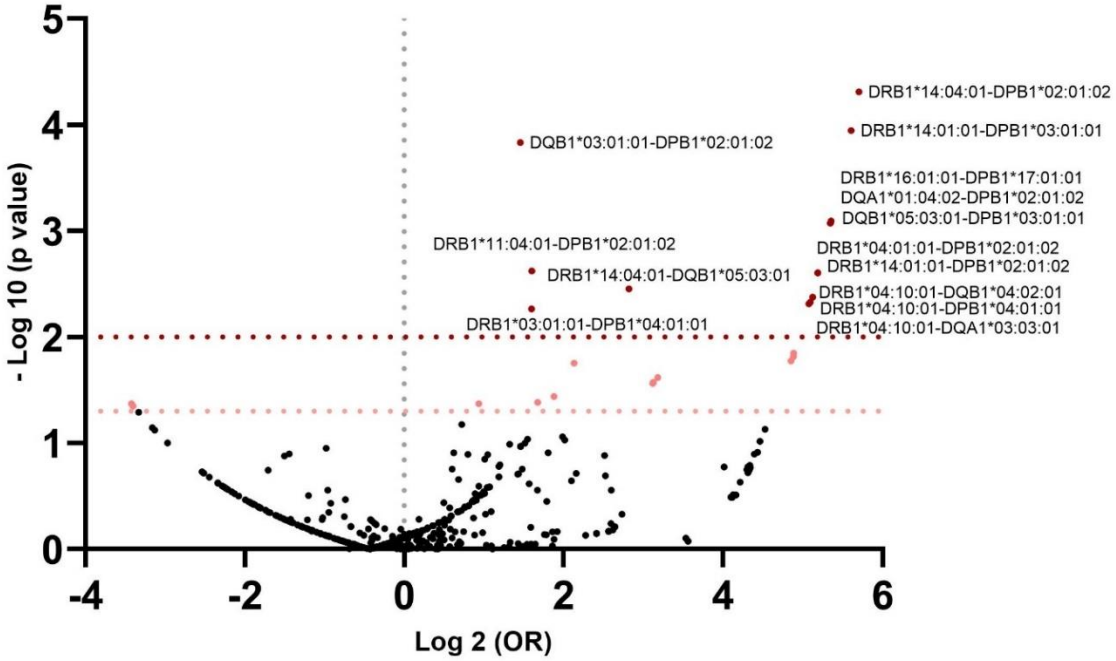
DQA1*05:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0904**	**0,0078**	**12,784**	**17,0**	**9,0**
DQA1*01:01:01~DQB1*05:01:01	**0,0638**	**0,0056**	**10,675**	**12,0**	**6,4**
DQA1*01:03:01~DQB1*06:03:01	**0,0605**	**0,0050**	**10,688**	**11,4**	**6,1**
DQA1*02:01:01~DQB1*02:02:01	**0,0479**	**0,0044**	**9,010**	**9,0**	**4,8**
DQA1*01:04:01~DQB1*05:03:01	**0,0426**	**0,0027**	**10,540**	**8,0**	**4,3**
DRB1*11:04:01~DQA1*05:05:01	**0,1235**	**0,0367**	**6,063**	**23,0**	**12,4**
DRB1*11:01:01~DQA1*05:05:01	**0,1170**	**0,0330**	**6,195**	**21,8**	**11,7**
DRB1*16:01:01~DQA1*01:02:02	**0,1019**	**0,0127**	**10,726**	**19,0**	**10,2**
DRB1*03:01:01~DQA1*05:01:01	**0,0914**	**0,0090**	**11,793**	**17,0**	**9,1**
DRB1*01:01:01~DQA1*01:01:01	**0,0699**	**0,0055**	**11,801**	**13,0**	**7,0**
DRB1*07:01:01~DQA1*02:01:01	**0,0699**	**0,0050**	**12,417**	**13,0**	**7,0**
DRB1*13:01:01~DQA1*01:03:01	**0,0529**	**0,0042**	**10,184**	**9,8**	**5,3**
DRB1*04:02:01~DQA1*03:01:01	**0,0352**	**0,0030**	**8,001**	**6,5**	**3,5**
DRB1*14:01:01~DQA1*01:04:01	**0,0307**	**0,0014**	**10,615**	**5,7**	**3,1**
DRB1*11:04:01~DQB1*03:01:01	**0,1230**	**0,0387**	**5,670**	**22,4**	**12,3**
DRB1*11:01:01~DQB1*03:01:01	**0,1165**	**0,0348**	**5,803**	**21,2**	**11,7**
DRB1*16:01:01~DQB1*05:02:01	**0,1041**	**0,0131**	**10,640**	**18,9**	**10,4**
DRB1*03:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0879**	**0,0082**	**11,815**	**16,0**	**8,8**
DRB1*01:01:01~DQB1*05:01:01	**0,0641**	**0,0061**	**9,957**	**11,7**	**6,4**
DRB1*13:01:01~DQB1*06:03:01	**0,0519**	**0,0032**	**11,580**	**9,4**	**5,2**
DRB1*07:01:01~DQB1*02:02:01	**0,0484**	**0,0044**	**8,914**	**8,8**	**4,8**
DRB1*04:02:01~DQB1*03:02:01	**0,0359**	**0,0031**	**7,929**	**6,5**	**3,6**
DRB1*14:01:01~DQB1*05:03:01	**0,0336**	**0,0020**	**9,500**	**6,1**	**3,4**
DQA1*05:05:01~DPB1*04:02:01	0,1044	0,0486	3,384	19,6	10,4
DQA1*05:05:01~DPB1*02:01:02	0,0837	0,0744	0,449	15,7	8,4
DQA1*03:01:01~DPB1*04:01:01	**0,0689**	**0,0343**	**2,519**	**13,0**	**6,9**
DQA1*01:01:01~DPB1*04:01:01	0,0478	0,0262	1,802	9,0	4,8
DQA1*05:01:01~DPB1*02:01:02	0,0430	0,0243	1,621	8,1	4,3
DQA1*01:03:01~DPB1*02:01:02	0,0362	0,0215	1,365	6,8	3,6
DQA1*01:03:01~DPB1*04:01:01	**0,0336**	**0,0302**	**0,261**	**6,3**	**3,4**
DQB1*03:01:01~DPB1*02:01:02	0,1207	0,0784	1,988	22,7	12,1
DQB1*03:01:01~DPB1*04:02:01	0,0829	0,0512	1,869	15,6	8,3
DQB1*03:02:01~DPB1*04:01:01	0,0687	0,0354	2,380	12,9	6,9
DQB1*05:01:01~DPB1*04:01:01	0,0462	0,0292	1,344	8,7	4,6
DQB1*02:01:01~DPB1*02:01:02	**0,0337**	**0,0222**	**1,047**	**6,3**	**3,4**
DRB1*11:04:01-DPB1*02:01:02	**0,0667**	**0,0342**	**2,368**	**12,5**	**6,7**
DRB1*11:01:01-DPB1*04:01:01	0,0633	0,0434	1,283	11,9	6,3
DRB1*03:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0573**	**0,0361**	**1,499**	**10,8**	**5,7**
DRB1*11:01:01-DPB1*02:01:02	0,0430	0,0308	0,940	8,1	4,3
DRB1*11:04:01-DPB1*04:02:01	0,0386	0,0223	1,475	7,3	3,9
DRB1*01:01:01-DPB1*04:01:01	0,0340	0,0289	0,405	6,4	3,4
DRB1*07:01:01-DPB1*04:01:01	0,0321	0,0265	0,466	6,0	3,2
DRB1*01:01:01-DPB1*04:02:01	**0,0307**	**0,0134**	**2,036**	**5,8**	**3,1**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ,

очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на HLA клас II дву-локусните хаплотипи при двете изследвани групи

Анализ на разпределението на HLA клас II дву-локусните хаплотипни честоти между двете изследвани групи, разкри наличието на редица хаплотипи наблюдавани със силно изразена статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници (фигура 12). Хаплотипите представляват асоциации на следните HLA клас II алелни специфичности: HLA-DRB1*03:01, *04:01/10, *11:04, *14:01/04, *16:01; HLA-DQB1*03:01, *04:02, *05:03; HLA-DQA1*01:04, *03:03; HLA-DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *17:01.



Фигура 12. Разпределение на HLA клас II дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

HLA клас II дву-локусни хаплотипи, които се наблюдават с повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост ($0.05 > p < 0.01$)

са: **DRB1*04:01:01-DQA1*03:01:01** (ХЧ млади: 0.0078, ХЧ стари: 0.0281, P= 0.04, OR: 3.7), **DRB1*14:04:01-DQA1*01:04:02** (ХЧ млади: 0.0018, ХЧ стари: 0.0161, P= 0.02, OR: 9.1), **DRB1*04:01:01-DQB1*03:02:01** (ХЧ млади: 0.0067, ХЧ стари: 0.0287, P= 0.02, OR: 4.4), **DQA1*01:04:02-DQB1*05:03:01** (ХЧ млади: 0.0019, ХЧ стари: 0.0160, P= 0.03, OR: 8.7), **DQB1*05:02:01-DPB1*17:01:01** (ХЧ млади: 0.0019, ХЧ стари: 0.0160, P= 0.03, OR: 8.7), **DQB1*05:03:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ млади: 0.0102, ХЧ стари: 0.0319, P= 0.04, OR: 3.2), **DQB1*06:04:01-DPB1*04:02:01** (ХЧ млади: 0.0019, ХЧ стари: 0.0160, P= 0.03, OR: 8.7), **DRB1*11:04:01-DPB1*104:01:01** (ХЧ млади:0, ХЧ стари:0.0106, P=0.02), **DRB1*04:08:01-DQA1*04:01:02** (ХЧ млади:0, ХЧ стари:0.0108, P=0.015).

HLA клас II хаплотипи, които се срещат само при здрави млади индивиди и с гранични стойности на статистическа значимост са: **DRB1*16:01:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ млади:0.0268, ХЧ стари:0, **P=0.04**) и **DRB1*14:54:01-DQA1*01:04:01** (ХЧ млади:0.0275, ХЧ стари:0, **P=0.04**).

3. HLA клас I (HLA-A, -B, -C) и клас II дву-локусни хаплотипни асоциации (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

3.1 Асоциация на HLA-A локуса с HLA клас II гените и анализ на неравновесната скаченост между тях

За възрастни и млади индивиди, голяма част от най-често представените HLA-A-HLA клас II хаплотипи се припокриват, като преобладават тези в асоциация с HLA-A*02:01:01 алела: A*02:01:01~DQA1*05:05:01 (процент млади: 8.7%, процент стари: 10.4%), A*02:01:01~DQB1*03:01:01 (процент млади: 9.2%, процент стари: 12.4%) и A*02:01:01-DPB1*04:01:01 (процент млади: 10.6%, процент стари: 13.4%). Най-често представените асоциации на HLA-A и DRB1 локуса, се различават при двете изследвани групи: при млади индивиди най-често срещан е A*02:01:01-DRB1*16:01:01 хаплотипа (5.6%), следван от A*02:01:01-DRB1*11:04:01 (5.5%), докато при възрастни най-представен е A*01:01:01~DRB1*11:04:01 хаплотип (7.6%), следван от A*02:01:01~DRB1*16:01:01 (6.6%). Сред представените най-често срещани хаплотипи при дълголетници и млади (таблици 16 и 17), най-голям процент хаплотипи намиращи се в скаченост се установява за асоциациите между HLA-A и -DRB1 локусите.

Таблица 16. Най-често срещани реални HLA-A – HLA клас II хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*02:01:01-DRB1*16:01:01	**0,0561**	**0,0317**	**4,440**	**60,7**	**5,6**
A*02:01:01-DRB1*11:04:01	**0,0554**	**0,0391**	**2,654**	**59,9**	**5,5**
A*01:01:01-DRB1*03:01:01	**0,0334**	**0,0099**	**7,699**	**36,1**	**3,3**
A*02:01:01~DQA1*05:05:01	0,0874	0,0731	1,675	94,6	8,7
A*02:01:01~DQA1*01:02:02	**0,0576**	**0,0387**	**3,095**	**62,3**	**5,8**
A*24:02:01~DQA1*05:05:01	0,0416	0,0354	1,069	45,0	4,2
A*01:01:01~DQA1*05:01:01	**0,0341**	**0,0105**	**7,512**	**36,9**	**3,4**
A*02:01:01~DQB1*03:01:01	0,092	0,0794	1,413	99,5	9,2
A*02:01:01~DQB1*05:02:01	**0,0555**	**0,0395**	**2,586**	**60,1**	**5,6**
A*24:02:01~DQB1*03:01:01	0,0494	0,0384	1,807	53,5	4,9
A*01:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0357**	**0,0105**	**8,022**	**38,6**	**3,6**
A*02:01:01-DPB1*04:01:01	0,1063	0,1028	0,343	115,0	10,6
A*02:01:01-DPB1*04:02:01	0,0655	0,0561	1,267	70,9	6,6
A*24:02:01-DPB1*04:01:01	**0,0638**	**0,0497**	**2,021**	**69,0**	**6,4**
A*03:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0496**	**0,0368**	**2,152**	**53,7**	**5,0**
A*24:02:01-DPB1*04:02:01	**0,0379**	**0,0272**	**2,116**	**41,0**	**3,8**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Таблица 17. Най-често срещани реални HLA-A – HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*01:01:01~DRB1*11:04:01	**0,076**	**0,022**	**4,887**	**14,2**	**7,6**
A*02:01:01~DRB1*16:01:01	**0,066**	**0,029**	**2,926**	**12,4**	**6,6**
A*02:01:01~DRB1*01:01:01	**0,056**	**0,023**	**2,908**	**10,5**	**5,6**
A*02:01:01~DRB1*11:01:01	0,045	0,035	0,720	8,4	4,5
A*01:01:01~DRB1*03:01:01	**0,044**	**0,017**	**2,907**	**8,3**	**4,4**
A*02:01:01~DQA1*05:05:01	0,1039	0,0842	0,892	19,5	10,4
A*02:01:01~DQA1*01:02:02	**0,0768**	**0,0388**	**2,589**	**14,4**	**7,7**
A*01:01:01~DQA1*05:05:01	0,0707	0,0481	1,379	13,3	7,1
A*02:01:01~DQA1*01:01:01	0,0404	0,0211	1,808	7,6	4,0
A*01:01:01~DQA1*05:01:01	**0,035**	**0,0157**	**2,091**	**6,6**	**3,5**
A*02:01:01~DQB1*03:01:01	0,1235	0,0887	1,529	23,2	12,4
A*02:01:01~DQB1*05:02:01	**0,081**	**0,0402**	**2,738**	**15,2**	**8,1**
A*01:01:01~DQB1*03:01:01	0,0643	0,0507	0,808	12,1	6,4
A*02:01:01~DQB1*05:01:01	0,0362	0,0234	1,129	6,8	3,6
A*01:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0339**	**0,0143**	**2,222**	**6,4**	**3,4**
A*02:01:01-DPB1*04:01:01	0,1343	0,1105	0,925	25,2	13,4

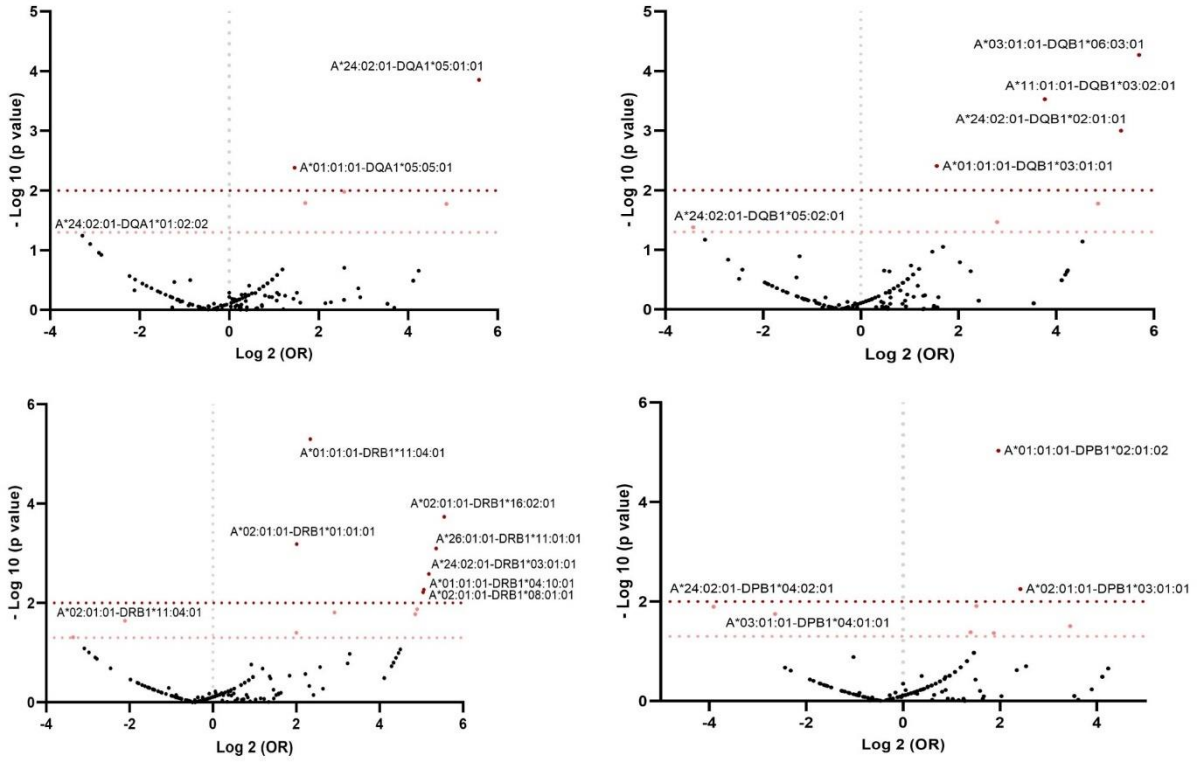
A*01:01:01-DPB1*02:01:02	**0,0943**	**0,0448**	**3,133**	**17,7**	**9,4**
A*02:01:01-DPB1*04:02:01	0,0767	0,0512	1,502	14,4	7,7
A*11:01:01-DPB1*04:01:01	0,0522	0,0355	1,193	9,8	5,2
A*32:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0444**	**0,0197**	**2,383**	**8,3**	**4,4**
A*11:01:01-DPB1*02:01:02	0,0307	0,0252	0,469	5,8	3,1
A*02:01:01-DPB1*03:01:01	0,0298	0,0168	1,359	5,6	3,0

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Сравнителен анализ на HLA-A - HLA клас II дву-локусните хаплотипни честоти при двете изследвани групи

Сравнителния анализ на разпределението на дву-локусните хаплотипни честоти между здрави възрастни и млади индивиди от българската популация разкри наличието на няколко HLA-A – HLA клас II хаплотипа, откроряващи се със силно изразена ($p \leq 0.01$) статистически значима повишена честота при дълголетници (фигура 13). Сред тях HLA-A-DRB1 асоциациите се отличават с най-голям брой дву-локусни хаплотипи установени със значително повишена честота при дълголетници. В състава на тези хаплотипи се установяват следните HLA-A и HLA клас II алелни специфичности: A*01:01, *03:01, *11:01, *24:02, *26:01; DQA1*05:01/05; DQB1*02:01, *03:01/02, *06:03; DRB1*03:01, *04:10, *08:01, *11:01/04, *16:02; DPB1*02:01.

Хаплотипи, за които се установява негативна асоциация с дълголетието са: **HLA-A*24:02:01-DPB1*04:02:01** (ХЧ стари=0, ХЧ млади=0.0379, p=0.013, OR: 0.06), -**A*03:01:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.0083, ХЧ: 0.0496, p=0.018, OR: 016), -**A*24:02:01-DQB1*05:02:01** (ХЧ стари=0, ХЧ млади=0.0274, p=0.04), -**A*02:01:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ млади: 0.0554, ХЧ стари: 0.0134, p=0.02, OR: 0.2316), -**A*24:02:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ млади: 0.0260, ХЧ стари: 0, p= 0.05).



Фигура 13. Разпределение на HLA-A - HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

HLA-A – HLA клас II дву-локусни хаплотипи, които се наблюдават с повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост (0.05 > p < 0.01) и не са представени на фигура 13, са както следва: **HLA-A*11:01:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.0522, ХЧ млади: 0.0189, p= 0.012, OR: 2.8589), -**A*68:01:02-DPB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.0140, ХЧ млади: 0.0013, p= 0.031, OR: 10.9079), -**A*32:01:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.0444, ХЧ млади: 0.0169, p= 0.042, OR: 2.6272), -**A*26:01:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0266, ХЧ млади: 0.0073, p= 0.043, OR: 3.6686), -**A*11:01:01-DQA1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.0244, ХЧ млади: 0.0042, p= 0.011, OR: 5.92), -**A*02:01:01-DQA1*01:01:01** (ХЧ стари: 0.0404, ХЧ млади: 0.0128, p= 0.016, OR: 3.24), -**A*03:01:01-DQA1*01:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*32:01:01-DQA1*03:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*33:01:01-DQB1*05:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*68:01:02-DQB1*06:04:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*01:01:01-DQB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.0170, ХЧ млади: 0.0025, p= 0.034, OR: 6.90), -**A*11:01:01-DRB1*14:04:01**

(ХЧ стари: 0.011, ХЧ млади: 0, p= 0.013), -**A*11:01:01-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.019, ХЧ млади: 0.003, p= 0.016, OR: 7.5), -**A*26:01:01-DRB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.011, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*68:01:02-DRB1*13:02:01** (ХЧ стари: 0.011, ХЧ млади: 0, p= 0.017), -**A*02:01:01-DRB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.025, ХЧ млади: 0.006, p= 0.040, OR: 4.0).

3.2 Асоциация на HLA-B локуса с HLA клас II гените и анализ на неравновесната скаченост между тях

B*18:01:01-DRB1*11:04:01 (процент млади: 5.7%), **B*08:01:01~DRB1*03:01:01** (процент стари: 5.8%), B*18:01:01~DQA1*05:05:01 (процент млади: 6.4%, процент стари: 8.5%), B*18:01:01~DQB1*03:01:01 (процент млади: 6.2%, процент стари: 8.2%) и B*51:01:01-DPB1*04:01:01 (процент млади: 6.5%), B*51:01:01~DPB1*04:01:01 (процент стари: 6.9) са най-често срещаните HLA-B-HLA клас II хаплотипи при здрави, възрастни и млади индивиди от българската популация (таблици 18 и 19). Асоциацията на HLA-B локуса с класическите клас II гени е по-добре изразена в сравнение с тази при HLA-A локуса, със стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 3.385 и 18.019.

Таблица 18. Най-често срещани реални HLA-B – HLA клас II хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

HLA-B - HLA клас II хаплотипи	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
B*18:01:01-DRB1*11:04:01	**0,0565**	**0,0154**	**10,809**	**61,1**	**5,7**
B*08:01:01-DRB1*03:01:01	**0,0445**	**0,0049**	**18,019**	**48,1**	**4,5**
B*18:01:01~DQA1*05:05:01	**0,0644**	**0,0288**	**6,806**	**69,7**	**6,4**
B*08:01:01~DQA1*05:01:01	**0,0437**	**0,0052**	**17,460**	**47,3**	**4,4**
B*51:01:01~DQA1*05:05:01	0,0322	0,0295	0,516	34,8	3,2
B*18:01:01~DQB1*03:01:01	**0,0621**	**0,0313**	**5,648**	**67,192**	**6,21**
B*08:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0449**	**0,0052**	**18,005**	**48,582**	**4,49**
B*51:01:01~DQB1*03:01:01	0,0344	0,0320	0,434	37,221	3,44
B*51:01:01~DQB1*05:02:01	**0,0338**	**0,0159**	**4,615**	**36,572**	**3,38**
B*51:01:01-DPB1*04:01:01	**0,0649**	**0,0414**	**3,713**	**70,2**	**6,5**
B*18:01:01-DPB1*04:02:01	**0,0434**	**0,0221**	**4,663**	**47,0**	**4,3**
B*35:01:01-DPB1*04:01:01	0,0308	0,0269	0,781	33,3	3,1

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

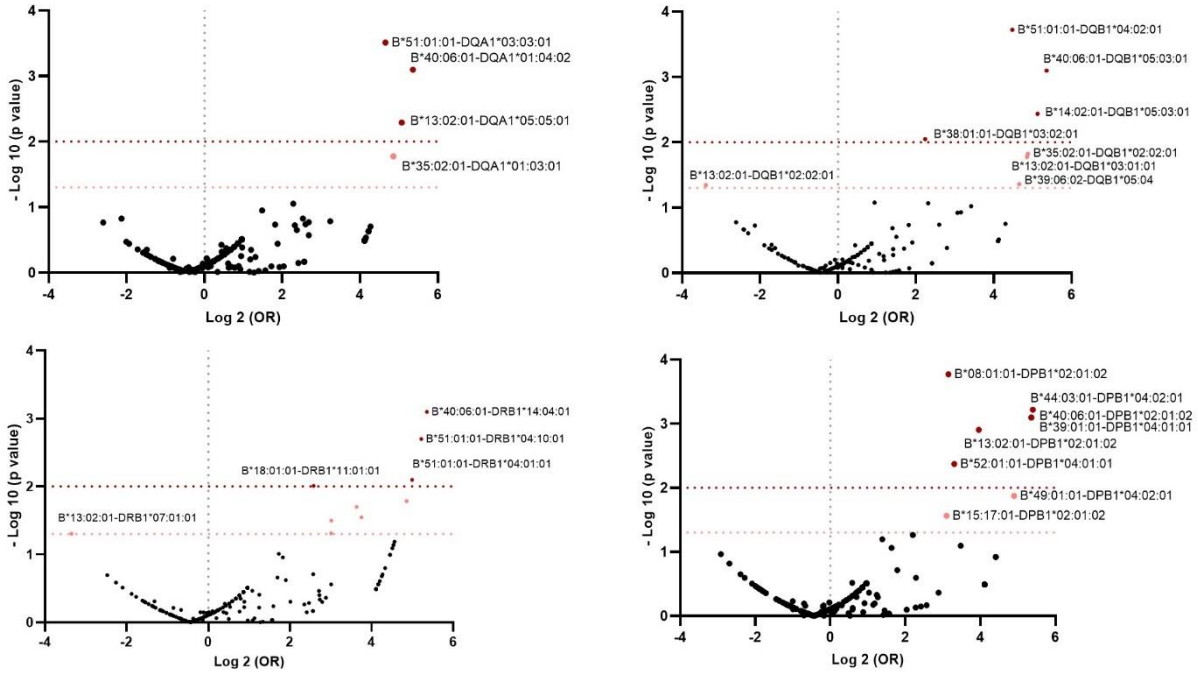
Таблица 19. Най-често срещани реални HLA-B – HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
B*18:01:01-DQA1*05:05:01	**0,0851**	**0,0334**	**3,809**	**16,0**	**8,5**
B*08:01:01-DQA1*05:01:01	**0,0585**	**0,0060**	**9,304**	**11,0**	**5,9**
B*51:01:01-DQA1*05:05:01	0,0468	0,0410	0,382	8,8	4,7
B*18:01:01~DQB1*03:01:01	**0,0824**	**0,0352**	**3,385**	**15,5**	**8,2**
B*51:01:01~DQB1*03:01:01	0,0639	0,0432	1,332	12,0	6,4
B*08:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0574**	**0,0054**	**9,636**	**10,8**	**5,7**
B*51:01:01~DQB1*05:02:01	0,0337	0,0196	1,371	6,3	3,4
B*38:01:01~DQB1*03:02:01	**0,0304**	**0,0051**	**4,820**	**5,7**	**3,0**
B*08:01:01~DRB1*03:01:01	**0,0580**	**0,0063**	**8,918**	**10,9**	**5,8**
B*18:01:01~DRB1*11:04:01	**0,0516**	**0,0154**	**3,977**	**9,7**	**5,2**
B*35:01:01~DRB1*01:01:01	**0,0314**	**0,0046**	**5,402**	**5,9**	**3,1**
B*51:01:01~DPB1*04:01:01	0,0665	0,0539	0,726	12,5	6,7
B*18:01:01~DPB1*04:02:01	**0,0636**	**0,0203**	**4,115**	**12,0**	**6,4**
B*08:01:01~DPB1*02:01:02	0,0344	0,0170	1,817	6,5	3,4
B*35:03:01~DPB1*04:01:01	0,0322	0,0180	1,444	6,1	3,2

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Сравнителен анализ на HLA-B - HLA клас II хаплотипите честоти при двете изследвани групи

В състава на хаплотипите наблюдавани със силно изразена ($p \leq 0.01$) статистически значима повишена честота при дълголетници се установява широк спектър от HLA-B алелни специфичности: B*08:01, *13:02, *14:02, *18:01, *38:01, *39:01, *40:06, *44:03, *51:01, *52:01 (фигура 14). Осем от седемнадесетте хаплотипа характеризиращи се със стойности на статистическа значимост по-голяма или равна на 0.01, представляват асоциации на HLA-B*40:06 и B*51:01 алелните специфичности. HLA клас II алелите установени в състава на същите хаплотипи са: HLA-DQA1*01:04, *03:03, *05:05, -DQB1*03:02, *04:02, *05:03; -DRB1*04:01/10, *11:01, *14:04; -DPB1*02:01, *04:01/02.



Фигура 14. Разпределение на HLA-B - HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

HLA-B – HLA клас II дву-локусни хаплотипи, които се наблюдават с повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост (0.05 > p < 0.01) и не са представени на фигура 14, са както следва: **HLA-B*49:01:01-DPB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.011, ХЧ млади: 0, P=, 0.013), **-B*15:17:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.016, ХЧ млади: 0.0019, P=, 0.027, OR: 8.5), **-B*13:02:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.0108, ХЧ млади: 0, p= 0.015), **-B*35:02:01-DQB1*02:02:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), **-B*39:06:02-DQB1*05:04** (ХЧ стари: 0.0089, ХЧ млади: 0, p= 0.044), **-B*35:02:01-DQA1*01:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), **-B*15:17:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ стари: 0.0111, ХЧ млади: 0, p= 0.016), **-B*27:05:02-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.0147, ХЧ млади: 0.0012, p= 0.02, OR: 12.4), **-B*44:03:01-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.0133, ХЧ млади: 0.0010, p= 0.028, OR: 13.5), **-B*35:03:01-DRB1*16:01:01** (ХЧ стари: 0.0159, ХЧ млади: 0.0020, p= 0.032, OR: 8.1), **-B*51:01:01-DRB1*11:03:01** (ХЧ стари: 0.0143, ХЧ млади: 0.0018, p= 0.049, OR: 8.0).

Негативна асоциация с дълголетието се установява за два HLA-B – HLA клас II хаплотипа, които не се наблюдават в изследваната група от здрави, възрастни

индивиди от българската популация: **HLA-B*13:02:01-DRB1*07:01:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0259, p= 0.050) и **-B*13:02:01-DQB1*02:02:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0267, p= 0.045). И двата хаплотипа представляват асоциации на HLA-B*13:02:01 алелната специфичност.

3.3 Асоциация на HLA-C локуса с HLA клас II гените и анализ на неравновесната скаченост между тях

Най-често представените HLA-C-HLA клас II хаплотипи при млади индивиди са както следва: C*07:01:01~DRB1*11:04:01 (5.1%), C*07:01:01~DQA1*05:05:01 (6.3%), C*04:01:01~DQA1*05:05:01 (6.2%), C*07:01:01~DQB1*03:01:01 (6.5%), C*04:01:01~DQB1*03:01:01 (6.4%) и C*04:01:01~DPB1*04:01:01 (6.8%) (таблица 20). От представените HLA-C-DRB1 хаплотипи (ХЧ > 3%), всички се намират в силно изразена неравновесна скаченост. Между HLA-C и –DQA1, -DQB1 локусите също се наблюдава добре изразена скаченост за най-често представените хаплотипи. Най-слаба е асоциацията с HLA-DPB1 локуса.

Таблица 20. Най-често срещани реални HLA-C – HLA клас II хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

HLA-C - HLA клас II хаплотипи	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
C*07:01:01~DRB1*11:04:01	**0.0509**	**0.0213**	**6.464**	**52.9**	**5.09**
C*07:01:01~DRB1*03:01:01	**0.0408**	**0.0141**	**7.225**	**42.4**	**4.1**
C*04:01:01~DRB1*11:04:01	**0.0397**	**0.0245**	**3.092**	**41.3**	**4.0**
C*02:02:02~DRB1*16:01:01	**0.0372**	**0.0110**	**8.000**	**38.7**	**3.7**
C*06:02:01~DRB1*07:01:01	**0.0325**	**0.0061**	**10.838**	**33.8**	**3.3**
C*07:01:01~DQA1*05:05:01	**0.0631**	**0.0410**	**3.514**	**68.3**	**6.3**
C*04:01:01~DQA1*05:05:01	**0.0615**	**0.0458**	**2.354**	**66.5**	**6.2**
C*02:02:02~DQA1*01:02:02	**0.0414**	**0.0133**	**7.969**	**44.8**	**4.1**
C*07:01:01~DQA1*05:01:01	**0.0407**	**0.0149**	**6.904**	**44.0**	**4.1**
C*06:02:01~DQA1*02:01:01	**0.0332**	**0.0057**	**11.919**	**35.9**	**3.3**
C*12:03:01~DQA1*05:05:01	0.0306	0.0275	0.605	33.1	3.1
C*07:01:01~DQB1*03:01:01	**0.0653**	**0.0445**	**3.164**	**70.7**	**6.5**
C*04:01:01~DQB1*03:01:01	**0.0635**	**0.0498**	**1.975**	**68.7**	**6.4**
C*07:01:01~DQB1*02:01:01	**0.0416**	**0.0149**	**7.145**	**45.0**	**4.2**
C*02:02:02~DQB1*05:02:01	**0.0404**	**0.0136**	**7.523**	**43.7**	**4.0**
C*02:02:02~DQB1*03:01:01	0.0341	0.0272	1.347	36.9	3.4
C*12:03:01~DQB1*03:01:01	0.0316	0.0299	0.324	34.2	3.2
C*06:02:01~DQB1*02:02:01	**0.031**	**0.0054**	**11.381**	**33.5**	**3.1**
C*04:01:01~DPB1*04:01:01	0.0677	0.0644	0.411	73.1	6.8
C*07:01:01~DPB1*04:02:01	**0.0492**	**0.0315**	**3.231**	**53.1**	**4.9**
C*04:01:01~DPB1*04:02:01	0.0439	0.0352	1.503	47.4	4.4

C*12:03:01~DPB1*04:01:01	0.0432	0.0387	0.741	46.7	4.3
C*04:01:01~DPB1*02:01:02	0.0328	0.0321	0.121	35.4	3.3
C*06:02:01~DPB1*04:01:01	0.0326	0.0278	0.928	35.2	3.3
C*02:02:02~DPB1*04:02:01	**0.0305**	**0.0193**	**2.637**	**32.9**	**3.1**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

HLA-C*07:01:01~DRB1*03:01:01 (5.8%), -C*07:01:01~DQA1*05:05:01 (6.9%), -C*07:01:01~DQB1*03:01:01 (8.7%) и -C*04:01:01~DPB1*04:01:01 (9.5%) са най-често срещаните хаплотипи при дълголетници, като в състава само на първия хаплотип се установява наличие на неравновесна (таблица 21). Подобно на описаното при млади индивиди, най-слаба асоциация се наблюдава между HLA-C и HLA-DPB1 локусите, докато асоциацията с останалите класически HLA клас II локуси и добре представена.

Таблица 21. Най-често срещани реални HLA-C – HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

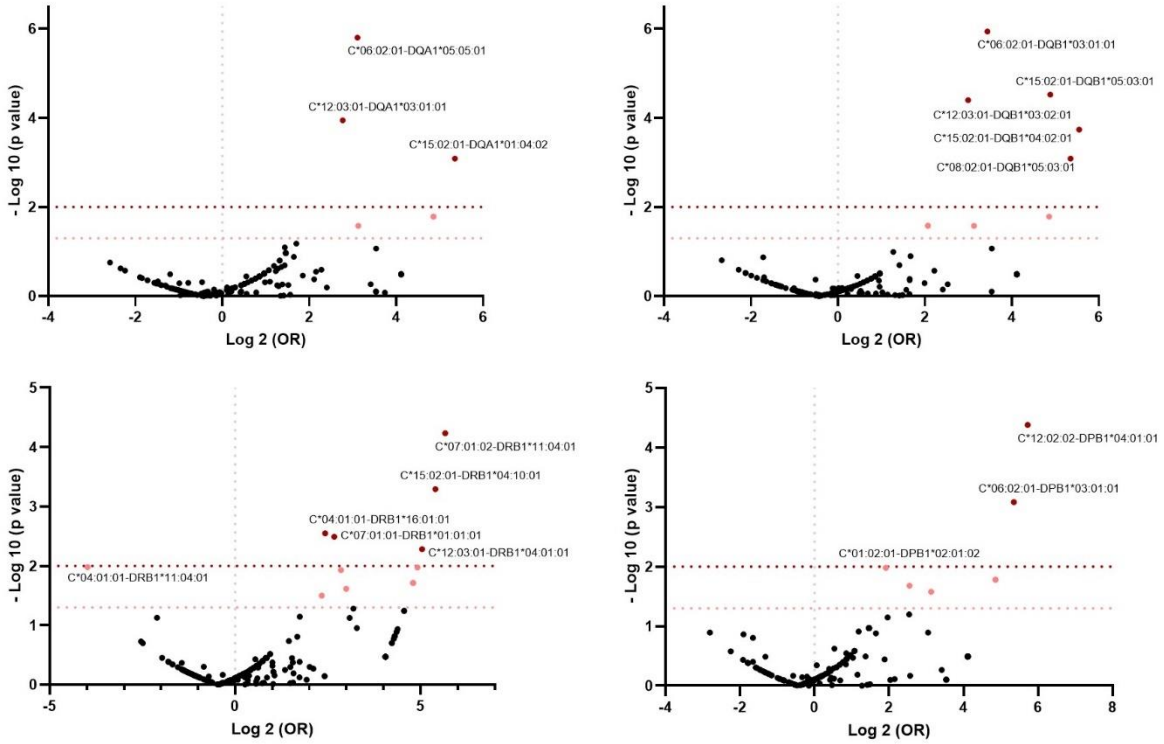
Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
C*07:01:01~DRB1*03:01:01	**0,0583**	**0,0176**	**4,165**	**11,0**	**5,8**
C*07:01:01~DRB1*11:04:01	0,0408	0,0235	1,529	7,7	4,1
C*04:01:01~DRB1*16:01:01	**0,0340**	**0,0155**	**2,014**	**6,4**	**3,4**
C*06:02:01~DRB1*07:01:01	**0,0316**	**0,0072**	**3,920**	**5,9**	**3,2**
C*04:01:01~DRB1*11:01:01	0,0313	0,0187	1,257	5,9	3,1
C*07:01:01~DQA1*05:05:01	0,0689	0,0511	1,050	13,0	6,9
C*07:01:01~DQA1*05:01:01	**0,0585**	**0,0167**	**4,394**	**11,0**	**5,9**
C*06:02:01~DQA1*05:05:01	0,0515	0,0286	1,833	9,7	5,2
C*04:01:01~DQA1*05:05:01	0,0453	0,0451	0,012	8,5	4,5
C*12:03:01~DQA1*03:01:01	**0,0446**	**0,0108**	**4,432**	8,4	4,5
C*02:02:02~DQA1*01:02:02	**0,0368**	**0,0097**	**3,750**	**6,9**	**3,7**
C*04:01:01~DQA1*03:01:01	**0,0330**	**0,0147**	**2,046**	**6,2**	**3,3**
C*06:02:01~DQA1*02:01:01	**0,0327**	**0,0071**	**4,129**	6,1	3,3
C*07:01:01~DQB1*03:01:01	**0,0870**	**0,0539**	**1,904**	**16,4**	**8,7**
C*06:02:01~DQB1*03:01:01	0,0491	0,0301	1,478	9,2	4,9
C*12:03:01~DQB1*03:02:01	**0,0434**	**0,0112**	**4,157**	**8,2**	**4,3**
C*07:01:01~DQB1*02:01:01	**0,0396**	**0,0152**	**2,683**	**7,4**	**4,0**
C*12:03:01~DQB1*03:01:01	0,0366	0,0348	0,127	6,9	3,7
C*02:02:02~DQB1*05:02:01	**0,0363**	**0,0100**	**3,575**	**6,8**	**3,6**
C*04:01:01~DQB1*03:02:01	**0,0350**	**0,0152**	**2,178**	**6,6**	**3,5**
C*04:01:01~DPB1*04:01:01	0,0949	0,0592	1,951	17,8	9,5
C*07:01:01~DPB1*04:02:01	**0,0635**	**0,0311**	**2,478**	**11,9**	**6,4**
C*12:03:01~DPB1*04:01:01	0,0546	0,0434	0,720	10,3	5,5

C*15:02:01~DPB1*04:01:01	0,0361	0,0256	0,885	6,8	3,6
C*04:01:01~DPB1*04:02:01	0,0351	0,0275	0,624	6,6	3,5
C*01:02:01~DPB1*02:01:02	0,0351	0,0168	1,920	6,6	3,5

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. Представени са най-често срещаните (ХЧ > 3%) реални, дву-локусни, класически HLA клас I хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация.

Сравнителен анализ на HLA-C - HLA клас II хаплотипите честоти при двете изследвани групи

Сравнителния анализ разкри наличието на 16 хаплотипа със силна, статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници (фигура 15). HLA-C алелните специфичности в състава на тези хаплотипи са: HLA-C*01:02, *04:01, *06:02, *07:01, *12:02/03, *15:02, като прави впечатление, че преобладават асоциациите на HLA-C*06:02, *15:02 и *12:03 алелите. HLA клас II алелните специфичности участващи в състава на хаплотипите установени с повишена честота при дълголетници са както следва: HLA-DQA1*01:04, *06:02, *12:03; -DQB1*03:01/02, *04:02, *05:03; -DRB1*04:01, *07:01, *12:03, *15:02; -DPB1*02:01, *03:01, *04:01.



Фигура 15. Разпределение на HLA-C - HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя*

съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.

HLA-C – HLA клас II дву-локусни хаплотипи, които се наблюдават с повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост (0.05 > p < 0.01) и не са представени на фигура 15, са както следва: **HLA-C*02:02:02-DPB1*10:01:01** (ХЧ стари: 0.0115, ХЧ млади: 0, p= 0.017), **-C*06:02:01-DPB1*104:01:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.017), **-C*15:02:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0224, ХЧ млади: 0.0040, p= 0.021, OR: 5.8), **-C*07:01:02-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0160, ХЧ млади: 0.0022, p= 0.027, OR: 8.7), **-C*02:02:02-DQA1*01:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.016), **-C*16:02:01-DQA1*03:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.016), **-C*07:01:02-DQA1*05:05:01** (ХЧ стари: 0.0159, ХЧ млади: 0.0020, p= 0.026, OR: 8.8), **-C*02:02:02-DQB1*06:03:01** (ХЧ стари: 0.0094, ХЧ млади: 0, p= 0.016), **-C*01:02:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.0266, ХЧ млади: 0.0067, p= 0.026, OR: 4.2), **-C*07:01:01-DQB1*05:02:01** (ХЧ стари: 0.0283, ХЧ млади: 0.0067, p= 0.026, OR: 4.2), **-C*07:02:01-DQB1*02:01:01** (ХЧ стари: 0.0147, ХЧ млади: 0.0020, p= 0.026, OR: 8.8), **-C*01:02:01-DRB1*16:01:01** (ХЧ стари: 0.0213, ХЧ млади: 0.0030, p= 0.012, OR: 7.2), **-C*01:02:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.019), **-C*14:02:01-DRB1*11:03:01** (ХЧ стари: 0.0106, ХЧ млади: 0, p= 0.019), **-C*15:02:01-DRB1*01:01:01** (ХЧ стари: 0.0173, ХЧ млади: 0.0022, p= 0.024, OR: 8.0), **-C*04:01:01-DRB1*14:01:01** (ХЧ стари: 0.0218, ХЧ млади: 0.0044, p= 0.032, OR: 5.0).

Негативна асоциация се установява за **HLA-C*04:01:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0397, p= 0.01) хаплотипа, който не се наблюдава при здрави дълголетници от българската популация.

III. Разгърнати хаплотипи

1. Разгърнат HLA-B-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българката популация

При извършения сравнителен анализ следните HLA-B-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи се установяват със статистически значима повишена честота при дълголетници: **HLA-B*18:01:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.019677, ХЧ млади: 0.002833, OR: 7.06**, p=0.017**), **B*15:17:01-DRB1*11:04:01-**

DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01 (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**), **B*18:01:01-DRB1*04:01:01-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02:01** (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**), **B*40:06:01-DRB1*14:04:01-DQA1*01:04:02-DQB1*05:03:01** (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**), **B*49:01:01-DRB1*14:04:01-DQA1*01:04:01-DQB1*05:03:01** (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**), **B*51:01:01-DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**) и **B*51:01:01-DRB1*14:01:01-DQA1*01:04:01-DQB1*05:03:01** (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ млади: 0, **p=0.016**).

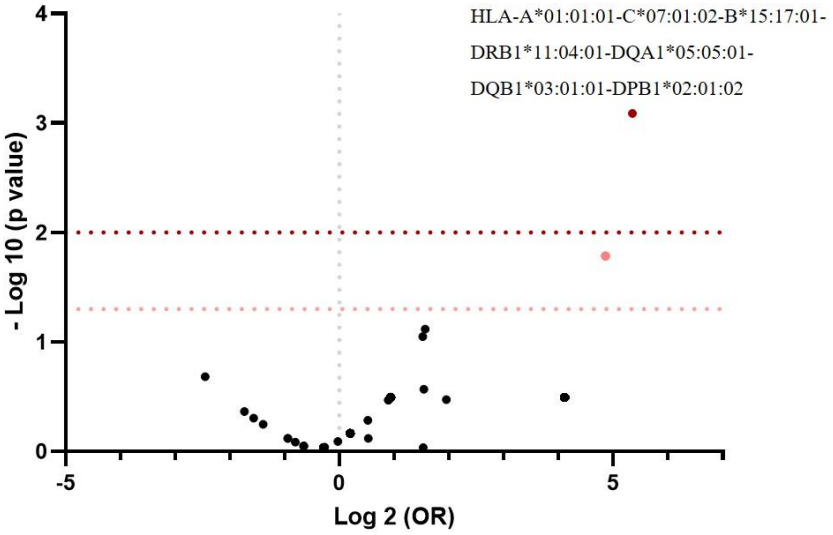
2. Разгърнати HLA-A-C-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

HLA-A*02:01:01-C*07:01:01-B*18:01:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*04:02:01 (ХЧ: 0.02169; 2.2%) и HLA-A*01:01:01-C*07:01:01-B*08:01:01-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01-DPB1*01:01:01 (ХЧ: 0.01386; 1.4%) са двата хаплотипа представени с честота над 1% в изследваната група от млади индивиди от българската популация.

При дълголетници разгърнати хаплотипи, които се наблюдават с хаплотипна честота над 1% са както следва: *A*02:01:01-C*07:01:01-B*18:01:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*04:02:01* (0.021277, 2.1%), *A*01:01:01-C*07:01:01-B*08:01:01-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01-DPB1*04:01:01* (0.015957, 1.6%), A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02* (0.015957, 1.6%), *A*01:01:01-C*15:02:01-B*51:01:01-DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01-DPB1*04:01:01* (0.010638, 1.1%), *A*02:01:01-C*01:02:01-B*51:01:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02* (0.010638, 1.1%), *A*02:01:01-C*01:02:01-B*51:01:01-DRB1*16:01:01-DQA1*01:02:02-DQB1*05:02:01-DPB1*04:01:01* (0.010638, 1.1%), A*02:01:01-C*07:01:01-B*18:01:01-DRB1*01:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*05:01:01-DPB1*04:01:01* (0.010638, 1.1%), *A*02:01:01-C*12:03:01-B*38:01:01-DRB1*04:02:01-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02:01-DPB1*04:01:01* (0.010638, 1.1%), *A*32:01:01-C*04:01:01-B*35:01:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*04:01:01* (0.010638, 1.1%).

Сравнителен анализ на HLA-A-C-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипните честоти при изследваните групи от здрави дълголетници и млади индивиди от българската популация

Извършения разгърнат хаплотипен анализ включващ класическите HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1 локуси, разкрива силна, позитивна асоциация с дълголетието за **HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02** разгърнатия хаплотип (**P=0.0008**) (фигура 16). Допълнително разгърнати хаплотипи, които се установяват с повишена честота при дълголетници са A*01:01:01-C*15:02:01-B*51:01:01-DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01-DPB1*04:01:01 (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ: млади, p= **0.016**), A*02:01:01-C*01:02:01-B*51:01:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02 01 (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ: млади, p= **0.016**), A*02:01:01-C*01:02:01-B*51:01:01-DRB1*16:01:01-DQA1*01:02:02-DQB1*05:02:01-DPB1*04:01:01 01 (ХЧ стари: 0.010638, ХЧ: млади, p= **0.016**).



Фигура 16. Разпределение на HLA-A-C-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

В настоящия дисертационен е определено алелното и хаплотипно разпределение на класическите HLA клас I и II в голяма група (541 млади и 94 възрастни) от здрави индивиди от българската популация. Една от основните ни цели е освен откриване на

нови и потвърждаване на стари наблюдавани асоциации с дълголетието при възрастни индивиди от българската популация е и идентифицирането на разширени HLA профили, което ще допринесе за по-добро разбиране на генетичната основа на процесите на „успешно стареене“.

В състава на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със силна, статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници от българската популация, предоминантни (срещат се в състава на повече от един хаплотип) се явяват няколко класически HLA клас I алелни специфичности: A*01:01, *03:01; B*40:06, *51:01, *52:01; C*06:02, *12:03, *15:02. Както бе описано по-рано, HLA-A*01:01 специфичността е описана с по-добро представяне на вирусни и туморни антигени. Въпреки асоциацията на HLA-B*51 и -C*06 алелните групи съответно със синдром на Бехчет и псориазис, съществуват сведения описващи HLA-B*51, *52, HLA-C*06, *12, *15 специфичностите, като силно асоциирани протективни алели за синдрома на придобитата имунна недостатъчност (СПИН), като резултат от генерирането на силно афинитетни ХИВ-специфични цитотоксични Т клетки (236,237). Няколко HLA-A*01:01:01 дву-локусни хаплотипа, част от горе изложения разгърнат хаплотип се установява с повишена честота при дълголетници: A*01:01:01-B*15:17:01, A*01:01:01-DQA1*05:05:01, A*01:01:01-DPB1*02:01:02, A*01:01:01-DQB1*03:01:01 и A*01:01:01-DRB1*11:04:01. Силна, статистически значима повишена честота при дълголетници се установява за неравновесната асоциация на HLA-C*07:01:02, описан като позитивно асоцииран с процесите на дълголетие на алелно ниво, с DRB1*11:04:01 алелната специфичност. Други асоциации на HLA-C*07:01:02 наблюдавани с повишена честота при възрастни и гранични стойности на статистическа значимост са C*07:01:02-DQA1*05:05:01 и C*07:01:02-DPB1*02:01:02.

Негативна асоциация с дълголетието се установява за няколко дву-локусни класически HLA хаплотипа, всички характеризиращи се със стойности на статистическа значимост вариращa между $0.05 > p < 0.01$. В състава им се отличават следните HLA клас I алелни специфичности, част от които не се установяват в състава на нито един от описаните с повишена честота при дълголетници хаплотипи: HLA-A*02:01, 24:02; -B*27:02, *13:02; -C*05:01, *02:02, *04:01. HLA-B*27 е един от главните генетични детерминанти за анкилозиращ спондилит, като B*27:02 е един от субтиповете също асоцииран със заболяването (238). Хаплотипната асоциация на B*27:02 алелната специфичност наблюдавана с повишена честота в изследваната група от млади индивиди и гранични стойности на статистическа значимост е B*27:02:01-

C*02:02:02. HLA-C*02:02 от своя страна е описан като предразполагащ алел за развитието на В-клетъчната неоплазия - множественият миелом (239).

В състава на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със силна, статистически значима повишена честота при дълголетници от българската популация, предоминантни се явяват няколко класически HLA клас II алелни специфичности: DRB1*03:01, *04:01/10, *11:01/04, *14:01/04; DQA1*01:04, *05:05, *03:03; DQB1*03:01/02, *04:02, *05:03; DPB1*02:01, *03:01, *04:01. Сред тях в състава на разгърнатия хаплотип, обхващащ всички класически HLA клас I и клас II гени, и установен със силна статистически значима повишена честота при дълголетници се установяват HLA-DRB1*11:04:01, -DQA1*05:05:01, -DQB1*03:01:01 и DPB1*02:01:02 алелните специфичности. HLA-DRB1 алели кодиращи аспарагиновата киселина (D) на позиция 70 (част от третия хипервариабилен регион на DRB1 веригата), каквато е HLA-DRB1*11:04:01 алелната специфичност, са описани като придаващи протекция срещу развитието на РА (240). Допълнително, съществуват сведения за повишена защита при носители на HLA-DRB1*11 алелната група срещу развитието на тежки чернодробни увреждания при пациенти с хронична хепатит С инфекция и защита от развитието на множествена склероза при индивиди от Бразилската популация (241,242). Описана е и протективната роля на този алел при развитието на астма (243), както и на ювенилен идиопатичен артрит при Мексиканци (244). При възрастни жени от Мексиканската, Френската и Холандската популации, DR*11 е описан като полово-специфичен генетичен маркер асоцииран с дълголетието. Допълнително, DRB1*11:04:01 асоциирани хаплотипи, са наблюдавани с повишена честота и при възрастни Румънци (245). В настоящото проучване, при изследваните здрави индивиди от българската популация най-разпространена са явява HLA-DRB1*11:04:01 алелната специфичност. Като цяло, характерно за страните от югоизточна Европа е по-високата честота на срещане на DRB1*11:04 в сравнение с DRB1*11:01 алела. HLA-DRB1*11:04 се различава от DRB1*11:01 с замяна на АК - глицин с валин при кодон 86. Този диморфизъм повлиява специфичността на пептид-свързващата ямка на β-веригата на HLA-DR молекулата, а от там вероятно се проявява и разликата в различното ниво на защита, което предоставят различните DR*11 субтипове. В българската популация при пациенти със инсулин зависим захарен диабет е установена протективна роля на HLA-DRB1*11:04 и -DRB1*14:01 алелните специфичности (246).

HLA-DQB1*03:01 алелната специфичност при пациенти от българската популация е описана като протективна за диабет тип 1, множествена склероза и

системен лупус (246). HLA-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01 известен още като DQ7.5 хаплотип, в асоциация с DRB1*11 алелно груповата специфичност е описан като протективен за диабет тип 1 (ДТ1) при две френски етнически групи (247), а в съседна Гърция е описан като протективен за цьолиакия (глутенова ентеропатия) при деца (248). За българската популация HLA-DRB1*11-DQB1*03:01-DQA1*05 е описан като протективен за редица автоимунни заболявания в частност инсулин зависим захарен диабет, системен лупус еритроматозус, множествена склероза и пемфигус (246). В други популации, обаче са описани данни за предразполагащ ефект на горе-описания хаплотип – така например в проучване изследващо индивиди от не-скандинавски произход, е описан повишен риск от развитие на цьолиакия при носители на DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01 хаплотипа (249), както и при носители на DQ7.5 в комбинация с DQA1*02:01-DQB1*02:02 (DQ2.2) хаплотип (т.нар. DQ2.5-транс генотип), което е описано и при индивиди от Италианската популация (250) и при деца от Етиопски произход (251). Алелния и хаплотипен HLA полиморфизъм варира между отделните популации, което до голяма степен е обособено от обитаемата географска територия и позитивна селекция на полиморфизми осигуряващи адаптивност към ендемични видове (бактерии, вируси и паразити) и заболявания. По тази причина, извършването на популационно специфични проучвания, изследващи алелния/хаплотипен HLA полиморфизъм и определящи разгърнати хаплотипни профили, е от изключително значение, за правилната интерпретация на наблюдаваните асоциации.

Изследването на HLA-DPB1 асоциирани хаплотипи е сравнително по-слабо застъпено в сравнение с останалите класически HLA клас II локуси, вероятно заради наличието на т. нар. „гореща“ точка на висока рекомбинация (хотспот), разделяща DPB1 локуса от останалите локуси. Последните години все повече проучвания изследват ролята на DPB1 локуса за развитието на различни заболявания (ревматоиден артрит, проказа, множествена склероза), натрупани са и много данни относно значението на DPB1 съвместимостта за общата преживяемост след трансплантации. Извършения сравнителен анализ на дву-локусни хаплотипни честоти, потвърди описаната позитивна асоциация с дълголетието за HLA-DPB1 локуса на алелно ниво, като с по-висока честота на срещане при дълголетници се установяват няколко HLA-DPB1*02:01:02 асоциирани хаплотипа: DQA1*05:05:01-DPB1*02:01:02, DRB1*11:04:01-DPB1*02:01:02 и DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02. В гръцката

популация, HLA-DPB1*02:01 е описан като протективен срещу развитието на възрастово обособената множествена склероза (252).

НЕКЛАСИЧЕСКИ HLA ГЕНИ

Алелно и хаплотипно разпределение на некласическите HLA-E, -F, -G, -H гени при здрави, възрастни индивиди от българската популация

I. Изследване на HLA-E, -F, -G, -H полиморфизма на алелно ниво при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

3. HLA-E, -F, -G, -H полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

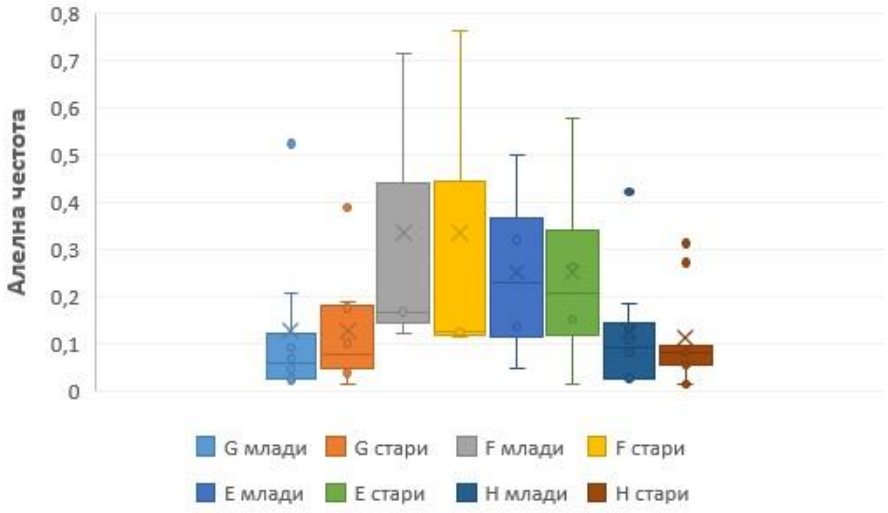
В настоящия дисертационен труд за пръв път се изследва алелния полиморфизъм на некласическите HLA клас Ib гени при здрави индивиди от българската популация. Най-висока степен на полиморфизъм е установена за HLA-H с установени 9 алела, следван от HLA-G - 8 алела (таблица 22). Най-ниска степен на полиморфизъм е установена за HLA-F с едва три наблюдавани алела. За всеки от некласическите клас I гени се установява по един преобладаващ алел (HLA-G*01:01:01, -H*01:01:01, -F*01:01:01, -E*01:01:01) всеки с алелна честота по-голяма от 34.8%. Наблюдават се пет основни алелни групи: HLA-E*01, -F*01, -G*01, -H*01 и -H*02.

Таблица 22. HLA-E, -F, -G, -H полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

HLA-E (n=62)	АЧ	Брой	%		HLA-F (n=62)	АЧ	Брой	%
E*01:01:01	0,5484	68	54,8		**F*01:01:01**	0,7459	92,5	74,6
E*01:03:02	0,2823	35	28,2		**F*01:03:01**	0,1393	17,3	13,9
E*01:03:01	0,1452	18	14,5		**F*01:01:02**	0,1148	14,2	11,5
E*01:06	0,0161	2	1,6					
E*01:03:05	0,0081	1	0,8					
HLA-G (n=62)	**АЧ**	**Брой**	**%**		**HLA-H (n=62)**	**АЧ**	**Брой**	**%**
G*01:01:01	0,4355	54	43,6		**H*01:01:01**	0,3482	43,2	34,8
G*01:01:02	0,1935	24	19,4		**H*02:01:01**	0,2143	26,6	21,4
G*01:06	0,129	16	12,9		**H*01:02**	0,125	15,5	12,5
G*01:04:01	0,0726	9	7,3		**H*02:04**	0,0982	12,2	9,8
G*01:01:03	0,0645	8	6,5		**H*02:05**	0,0714	8,9	7,1
G*01:01:22	0,0403	5	4,0		**H*02:07**	0,0625	7,8	6,3
G*01:05N	0,0323	4	3,2		**H*02:03:02**	0,0536	6,6	5,4
G*01:04:04	0,0323	4	3,2		**H*02:02**	0,0179	2,2	1,8
					H*02:08	0,0089	1,1	0,9

АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се среща/преброява съответния алел в изследваната група; n, Брой изследвани индивиди

4. Сравнителен анализ на HLA-E, -F, -G, -H алелните честоти при двете изследвани групи



Фигура 17. Разпределение на некласическите HLA клас I алелни честоти при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *На X оста се представените отделните гени за всяка от двете изследвани групи, а на Y оста са представени алелните честоти. Средната линия отговаря на медианата (числото, което е точно в средата, така че 50% от стойностите са над и 50% - под нея). Мустачките представят съответно най-ниската и най-високата стойности, докато екстремните стойности са представени с точици.*

Моделът на алелното разпределение на некласическите HLA клас I гени е подобен и при двете изследвани групи, с изключение на HLA-H локуса, който при дълголетници се наблюдава с по-малък диапазон на разпределение на алелните честоти в сравнение с младите индивиди (фигура 17). Причината за това е, че при дълголетници H*01:01:01 и H*02:01:01 алелите отговарят за 58.1% от HLA-H алелното разнообразие, а останалите 49.1% са представени от седем алела. При млади индивиди седем (от осем) алела отговарят за 57.9% от HLA-H алелното разнообразие, а H*01:01:01 представлява 42.1%.

При извършения сравнителен анализ не са установени статистически значими различия в алелните честоти на некласически HLA клас I гени. При изследваните групи от здрави възрастни и млади индивиди, преобладаващо се наблюдават следните некласически HLA алели: G*01:01:01 (АЧ стари: 0.3875, АЧ млади:0.5227), F*01:01:01 (АЧ стари: 0.7625, АЧ млади: 0.7143), E*01:01:01 (АЧ стари: 0.575, АЧ млади:0.5) и H*01:01:01 (АЧ стари: 0.3108, АЧ млади:0.4211). *За* ***HLA-G*01:06*** (АЧ стари:0.175, АЧ млади: 0.0455, P=0.04, Pc=0.3) и ***H*02:01:01*** (АЧ стари:0.2703, АЧ млади: 0.1053, P=0.03, Pc=0.3) се наблюдават с повишена честота при дълголетници, но

статистическата значимост на разликата се губи при прилагане на корекцията за множественост на Бонферони.

В настоящият дисертационен труд за пръв път бяха определени алелните и хаплотипни честоти на некласическите HLA клас Ib гени (HLA-E, -F, -G и -H) и бяха определени разгърнати хаплотипи включващи класическите HLA локуси, при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация чрез използване на следваща генерация секвениране. Предвид малката бройка на изследваните индивиди, получените данни биха могли да се приемат за предварителни и очертаващи определени зависимости, които следва да бъдат потвърдени в по-голяма група.

При извършения сравнителен анализ на алелните честоти на некласическите HLA клас Ib при възрастни и млади индивиди от българската популация, два алела се установяват с повишена честота при дълголетници: **HLA-G*01:06** и **HLA-H*02:01:01,** но статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи след прилагане корекцията на Бонферони. HLA-G*01:06, който се характеризира с -725C полиморфизъм, Met258Thr вариация и 14 bp инсерция в 3‘нетранслирания регион (UTR), се среща със сравнително висока честота в (АЧ>0.07) в Европейските популации, за които има данни. Някой популационни проучвания, описват HLA-G*01:06 като предразполагащ за усложнения при бременност (преeклампсия) и спонтанни аборти (253,254). Други изследвания обаче не установяват такава зависимост (255–257). HLA-H*02:01 се среща с висока честота в Европейската (АЧ: 0.129) и южно азиатските популации (АЧ: 0.158), като в африканската, американската и източно азиатските популации се наблюдава с по-ниска честота вариращa между 0.021 – 0.044 (258,259). Между HLA-G*01:06 и -H*02:01:01 се установява наличие на силна неравновесна скаченост (стн. остатък: 5.125), като тяхната асоциация също се установява с повишена честота при дълголетници: **G*01:06-H*02:01:01** (ХЧ стари: 0.175, ХЧ млади: 0.0455, OR: 4.4, **P=0.04**). Тези резултати могат да се обяснят с наличието на силна, неравновесна връзка между HLA-A*01:01:01 и всеки от HLA-G*01:06 (стн. остатък: 5.992) и H*02:01:01 алелните специфичности (стн. остатък: 5.771).

II. Дву-локусни хаплотипи, засягащи класическите HLA клас I , клас II локуси и некласическите HLA клас I гени

1. Асоциация между некласическите HLA-клас I гени (HLA- E, -F, -G, -H) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

От извършения анализ се установява слаба асоциация на HLA-E локуса с всички останали некласически клас I гени. Най-често представените хаплотипи отговарят на алелното разпределение на некласическите HLA клас I гени в изследваната група: G*01:01:01~H*01:01:01(36.6%), F*01:01:01~H*01:01:01 (41.6%), F*01:01:01~G*01:01:01 (39.2%), E*01:03:02~H*01:01:01 (25.7%), E*01:03:02~G*01:01:01 (29.1%) и E*01:01:01~F*01:01:01 (34.8%). От тях единствено E*01:03:02~H*01:01:01 хаплотипа се намира в значима неравновесна скаченост (таблица 23). Най-голям брой хаплотипи намиращи се в неравновесна връзка се установяват за асоциациите на HLA-H локуса с HLA-G и -F локусите.

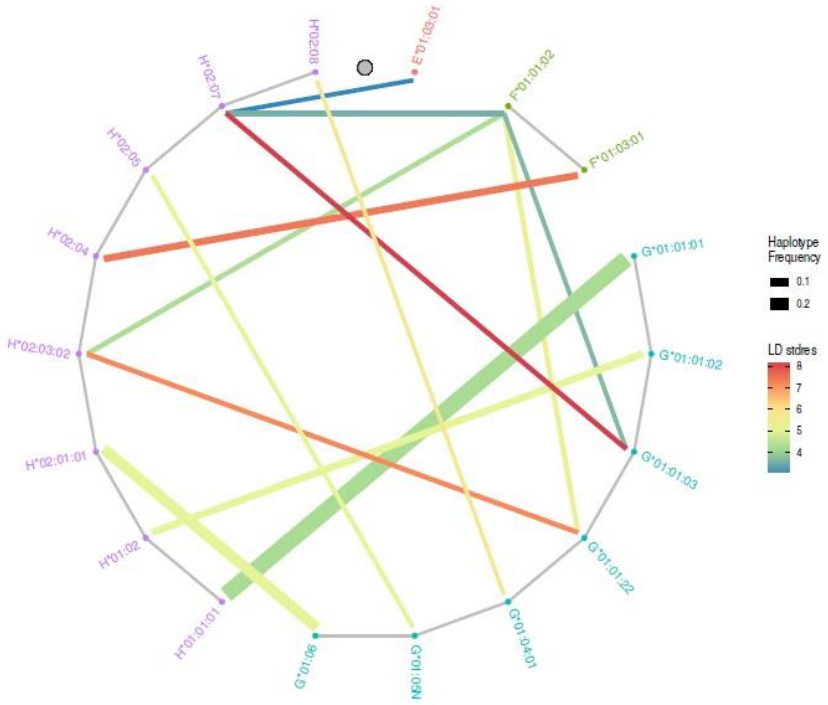
Таблица 23. Хаплотипни асоциации на HLA-E, -F, -G, -H локусите при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
G*01:01:02~H*01:02	0,1591	0,0377	4,071	7,0	15,9
G*01:01:03~H*02:07	0,0909	0,0072	6,535	4,0	9,1
G*01:06~H*02:01:01	0,0455	0,0048	3,892	2,0	4,6
G*01:05N~H*02:05	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
G*01:01:22~H*02:03:02	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
F*01:03:01~H*02:04	0,1591	0,0219	6,075	7,0	15,9
F*01:01:02~H*02:07	0,0682	0,0094	4,007	3,0	6,8
F*01:01:02~G*01:01:03	0,0659	0,0108	3,494	2,9	6,6
E*01:06~H*02:03:02	0,0455	0,0012	8,490	2,0	4,6
E*01:06~G*01:01:22	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

Наблюдаваните с висока честота при дълголетници некласически HLA клас I хаплотипи отговарят на алелното разпределение на гените в съответната изследвана

група: G*01:01:01~H*01:01:01 (29.7%), F*01:01:01~H*01:01:01 (30.8%), F*01:01:01~G*01:01:01 (32.3%), E*01:01:01~H*02:01:01 (18.3%), E*01:03:02~G*01:01:01 (20.6%) и E*01:01:01~F*01:01:01 (43.5%). От изброените хаплотипи само два се намират в значима скаченост: G*01:01:01~H*01:01:01 и E*01:03:02~G*01:01:01 (фигура 18). Най-голяма степен на асоциация се наблюдава между HLA-G и –H локусите.



Фигура 18. Кръгова диаграмата представяща асоциациите между некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на некласическите HLA клас I дву-локусни хаплотипи при двете изследвани групи

Извършения сравнителен анализ, потвърждава част от описаните до тук зависимости, като установява следните HLA клас I дву-локусни хаплотипи с повишена честота при възрастни и с гранични p стойности: **G*01:06-H*02:01:01** (ХЧ стари=0.175, ХЧ млади=0.0455, OR=4.4, p=0.04), **F*01:01:01-H*02:01:01** (ХЧ стари=0.2542, ХЧ млади=0.1039, OR=2.9, p=0.05), **F*01:01:01-G*01:06** (ХЧ стари=0.175, ХЧ млади=0.0341, OR=6.0, p=0.02). Това са вторите по честота представени хаплотипи в

изследваната група от дълголетници, като в състава само на първия хаплотип се установява наличие на неравновесна връзка.

2. Асоциация на некласическите HLA-клас I гени (HLA- E, -F, -G, -H) с класическите HLA-клас I гени (HLA-A, -B, -C)

2.1.Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с HLA-A локуса

Слаба асоциация между HLA-A и HLA-E локусите се наблюдава при двете изследвани групи. Преобладаващи хаплотипи и в двете изследвани групи са както следва: A*02:01:01~F*01:01:01 (ХЧ млади:0.3182, ХЧ стари: 0.2875), A*02:01:01~G*01:01:01 (ХЧ млади:0.3182, ХЧ стари: 0.2875) и A*02:01:01~H*01:01:01 (ХЧ млади:0.3182, ХЧ стари: 0.2875). На-голяма степен на асоциация се наблюдава между HLA-A и некласическите HLA-G и –H локуси, със съответно девет и единадесет скачени хаплотипа, характеризиращи се със стойности на стандартизирани остатъци между 2.099 и 6.535.

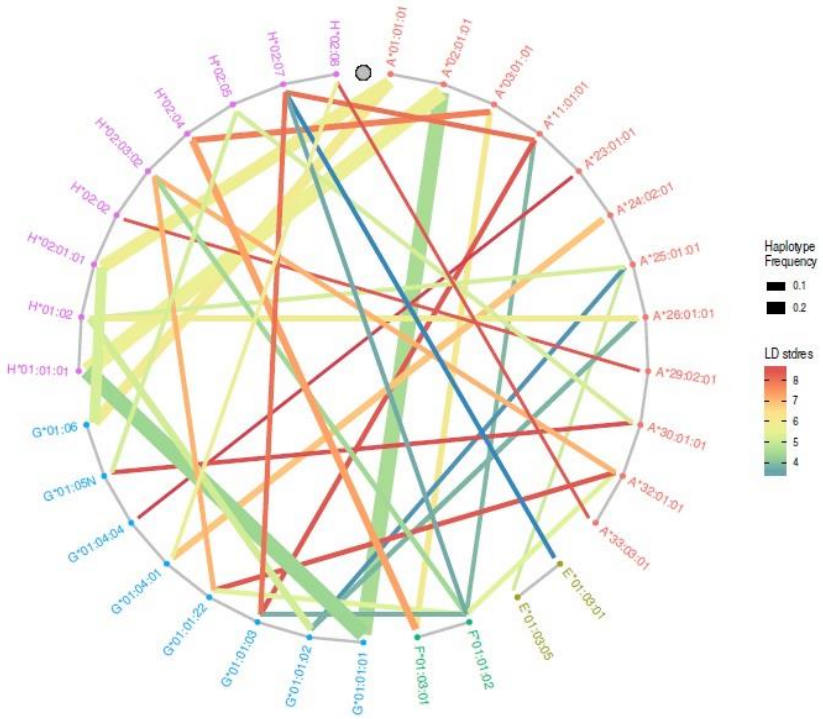
Таблица 24. Хаплотипни асоциации на HLA-A локуса с HLA-E, -F, -G, -H при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	stdres	Брой	%
A*11:01:01~G*01:01:03	0,0909	0,0083	6,005	4,0	9,1
A*26:01:01~G*01:01:02	0,0909	0,0186	3,485	4,0	9,1
A*23:01:01~G*01:04:04	0,0682	0,0047	6,166	3,0	6,8
A*25:01:01~G*01:01:02	0,0682	0,0139	3,026	3,0	6,8
A*01:01:01~G*01:06	0,0455	0,0031	5,041	2,0	4,6
A*30:01:01~G*01:05N	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
A*24:02:01~G*01:04:01	0,0227	0,0021	3,010	1,0	2,3
A*32:01:01~G*01:01:22	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
A*03:01:01~F*01:03:01	0,1136	0,0189	4,520	5,0	11,4
A*11:01:01~F*01:01:02	0,0682	0,0108	3,640	3,0	6,8
A*03:01:01~E*01:06	0,0455	0,0052	3,711	2,0	4,6
A*02:01:01~H*01:01:01	**0,3182**	**0,1340**	**3,106**	**14,0**	**31,8**
A*03:01:01~H*02:04	0,1136	0,0149	5,312	5,0	11,4
A*11:01:01~H*02:07	0,0909	0,0072	6,535	4,0	9,1
A*26:01:01~H*01:02	0,0909	0,0167	3,769	4,0	9,1
A*25:01:01~H*01:02	0,0682	0,0126	3,272	3,0	6,8
A*01:01:01~H*02:01:01	0,0682	0,0072	4,759	3,0	6,8
A*30:01:01~H*02:05	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
A*29:01:01~H*02:02	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
A*32:01:01~H*02:03:02	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за

изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

На фигура 19 са представени наблюдаваните при дълголетници HLA-A - некласически HLA клас Ib дву-локусни хаплотипи, за които се установява наличие на неравновесна скаченост. Както става ясно от кръговата диаграма най-голяма степен асоциация се установява между HLA-A и -G локуса. Най-често представените HLA-A*02:01:01-G*01:01:01 (28.75%) и -A*02:01:01-H*01:01:01 (28.75%) хаплотипи за изследваната група от здрави възрастни индивиди се намират в добре изразена неравновесна скаченост. Най-често представените асоциации на HLA-A с HLA-E и -F локусите A*02:01:01~F*01:01:01 (28.75%), A*01:01:01~E*01:01:01 (18%) не се намират в неравновесна връзка. Най-добре представена е асоциацията между HLA-A и -H локусите, с 88% от реалните хаплотипи наблюдавани с честота над 1% в изследваната група от дълголетници намиращи се в неравновесна скаченост, следвана от асоциацията с HLA-G локуса, където процента хаплотипи отговаря на 64.7%. Най-слабо е изразена асоциацията с HLA-E локуса.



Фигура 19. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-A локуса с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с*

честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

2.2.Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с HLA-B локуса

При млади индивиди най-често наблюдаваните HLA-B – некласически HLA клас I хаплотипи са както следва: HLA-B*51:01:01~E*01:01:01 (9.1%), -B*18:01:01~F*01:01:01 (11.4%), -B*51:01:01~G*01:01:01 (6.8%), -B*18:01:01~G*01:01:02 (6.8%) и -B*18:01:01~H*01:02 (8.5%), последния от които се намира в неравновесна скаченост (таблица 25). Както става ясно от данните представени в таблица 25, най-голям брой хаплотипи намиращи се в неравновесна скаченост се установява при асоциацията на HLA-B локуса с HLA-G и -H гените. Асоциацията с HLA-E и -F е слабо представена.

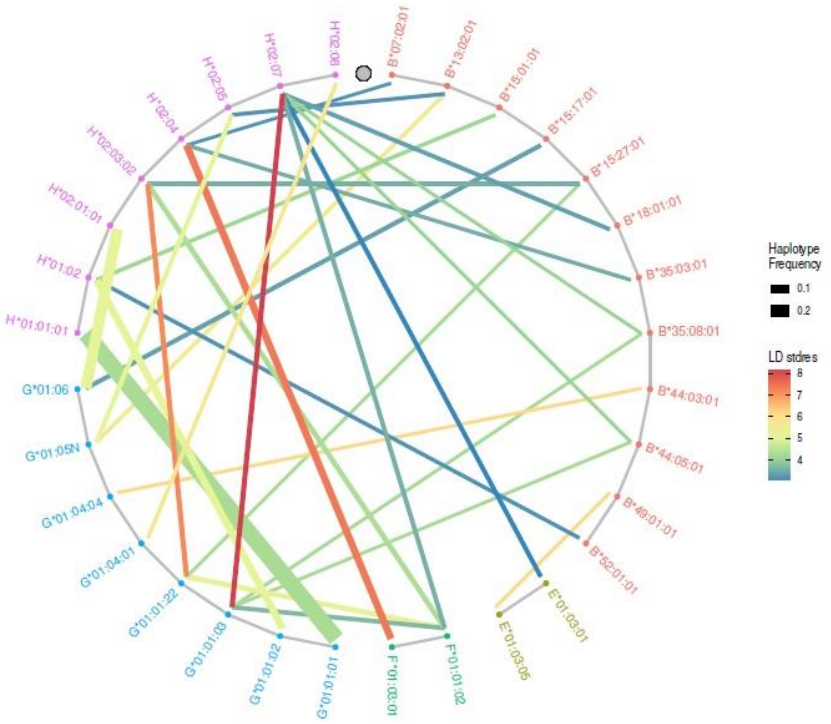
Таблица 25. Хаплотипни асоциации на HLA-B локуса с HLA-E, -F, -G, -H при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	stdres	Брой	%
B*27:02:01~G*01:04:04	0,0455	0,0031	5,041	2,0	4,6
B*35:02:01~G*01:06	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
B*44:03:01~G*01:04:04	0,0227	0,0015	3,563	1,0	2,3
B*50:01:01~G*01:05N	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
B*51:05~G*01:01:22	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
B*08:01:01~G*01:06	0,0227	0,0021	3,004	1,0	2,3
B*08:01:01~F*01:03:01	0,0455	0,0076	2,877	2,0	4,6
B*38:01:01~E*01:03:01	0,0455	0,0062	3,298	2,0	4,6
B*44:03:01~E*01:06	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
B*51:05~E*01:06	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
B*18:01:01~H*01:02	**0,0852**	**0,0209**	**2,916**	**3,7**	**8,5**
B*35:01:01~H*02:07	0,0568	0,0090	3,337	2,5	5,7
B*08:01:01~H*02:04	0,0455	0,0060	3,377	2,0	4,6
B*50:01:01~H*02:05	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

B*51:01:01~E*01:01:01 (6.25%), B*35:01:01~E*01:01:01 (6.25%), B*38:01:01~G*01:01:01 (6.25%) и B*57:01:01~H*01:01:01 (5%) са най-често представените хаплотипи при възрастни, като в състава на последните два хаплотипа се

установява наличие на значима асоциация между алелите (фигура 20). Като цяло асоциацията на HLA-B локуса с некласическите клас Ib гени е по-слабо изразена в сравнение с асоциацията установена между HLA-A и некласическите клас I. Най-висока степен на асоциация се наблюдава между HLA-B и –H локуса с 38.6% от реалните хаплотипи наблюдавани с честота над 1% намиращи се в скаченост, следвана от асоциацията на локуса с HLA-G където този процент е равен на 30.6%. HLA-B*13:02:01~G*01:05N и -B*44:03:01~G*01:04:04 хаплотипите при дълголетници се отличават с най-голяма сила на скаченост, изразяваща се със стойности на стандартизираните остатъци съответно 5.623 и 6.165. B*13:02:01~G*01:05N изобщо не се установява в изследваната група от млади индивиди.



Фигура 20. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-B локуса с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

2.3.Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с HLA-C локуса

Най-често представените HLA-C – некласически HLA клас I хаплотипи при млади индивиди са както следва: C*04:01:01~E*01:01:01 (15.4%), C*02:02:02~F*01:01:01 (18.2%), C*02:02:02~G*01:01:01 (15.9%) и C*02:02:02~H*01:01:01 (13.6%). За нито един от хаплотипите не се установява наличие на неравновесна скаченост. Скачеността

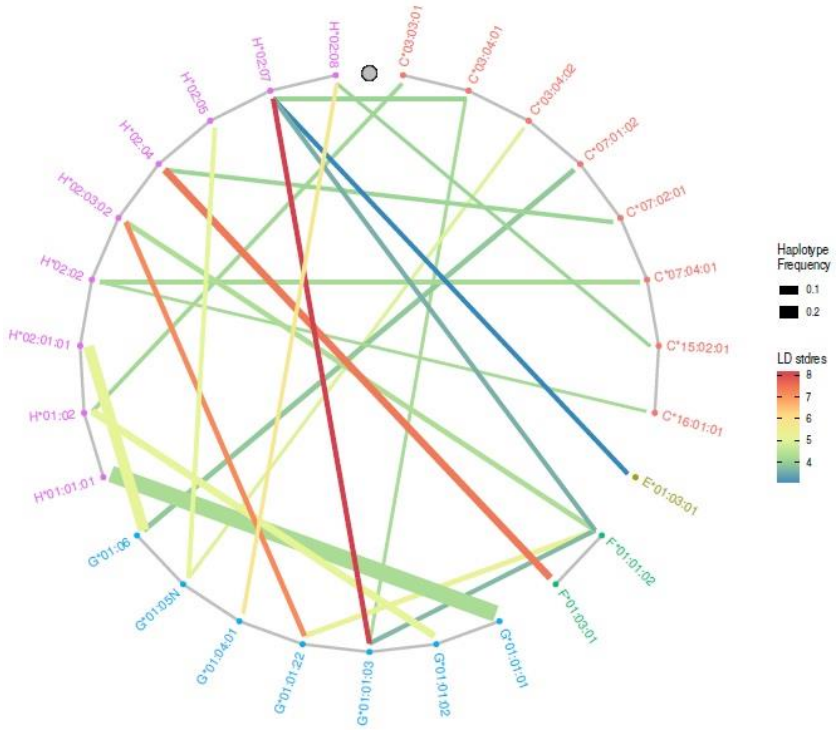
на HLA-C локуса с некласическите клас Ib е слабо изразена и се проявява за единични хаплотипи намиращи се в скаченост и стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 2.088 и 4.470 (таблица 26).

Таблица 26. Хаплотипни асоциации на HLA-C локуса с HLA-E, -F, -G, -H при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	stdres	Брой	%
C*03:02:02~G*01:04:04	0,0227	0,0015	3,563	1,0	2,3
C*06:02:01~G*01:05N	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
C*05:01:01~G*01:01:22	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
C*04:01:01~F*01:03:01	0,1263	0,0379	2,955	5,6	12,6
C*12:03:01~H*01:02	0,0852	0,0209	2,916	3,7	8,5
C*07:01:01~H*02:05	0,0303	0,0024	3,782	1,3	3,0
C*05:01:01~H*02:03:02	0,0227	0,0012	4,121	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

При дълголетници най-често наблюдаваните хаплотипи са: C*06:02:01~E*01:01:01 (11.3%), C*04:01:01~F*01:01:01 (14.8%), C*07:01:01~G*01:01:01 (7.7%) и C*07:01:01~H*01:01:01 (8.6%), за които също не се установява наличие на значима скаченост. Интересно е наблюдението, че при дълголетници HLA-C не се установява в нито една неравновесна връзка с HLA-E локуса (фигура 21). Аналогично на асоциацията на другите класически HLA клас I локуси с некласическите клас Ib и за HLA-C най-добре е изразена асоциацията с HLA-H и -G локусите.

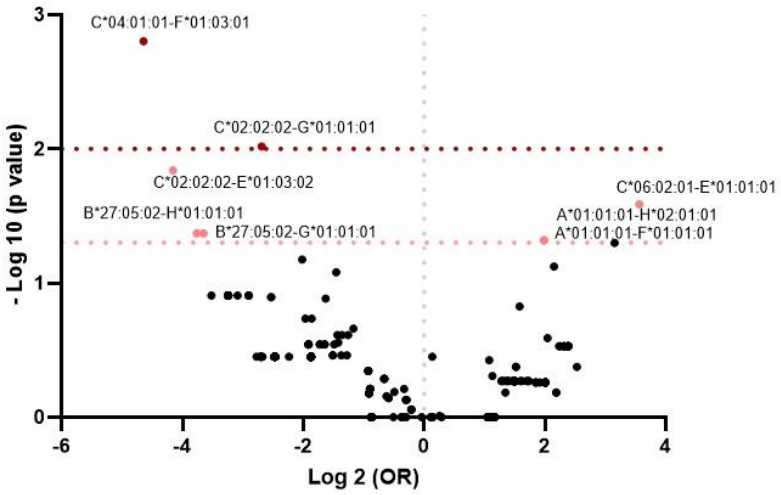


Фигура 21. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-C локуса с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на класически HLA клас I – некласически HLA клас I хаплотипи при двете изследвани групи

При възрастни, HLA-A*01:01:01, описан като позитивно асоцииран с процесите на дълголетие в настоящия дисертационен труд, в асоциация с HLA-F*01:01:01 и -H*02:01:01 алелите се наблюдава с повишена честота и гранични стойности на статистическа значимост: **A*01:01:01-F*01:01:01** (ХЧ стари: 0.225, ХЧ млади: 0.0682, OR: 3.97, **P=0.048**) и **A*01:01:01-H*02:01:01** (ХЧ стари: 0.225, ХЧ млади: 0.0682, OR: 3.97, **P=0.048**) (фигура 22). Значима неравновесна скаченост се установява между алелите в състава на A*01:01:01-H*02:01:01 хаплотипа. От своя страна HLA-A*01:01:01-G*01:06 хаплотипа, също се среща с по-голяма честота при дълголетници, но липсва статистическа значимост на наблюдаваната разлика (ХЧ стари: 0.175, ХЧ млади: 0.0455, OR: 4.4, P=0.07). Анализа на ГНС между класическите HLA клас I и некласическите HLA Ib гени (фигура 9) разкри наличие на силно изразена такава между HLA-A и всеки от HLA-E, -F, -G и -H гените, както и за HLA-C и H локусите. Глобална

скаченост не се установява между некласическите клас Ib гени и HLA-B, както и за всеки от HLA-E, -F и -G локусите с HLA-C.



Фигура 22. Сравнителен анализ на класическите HLA клас I – некласически HLA клас I дву-локусни хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

С по-висока честота в изследваната група от млади индивиди се наблюдават няколко класически HLA клас I – некласически HLA клас I хаплотипа (фигура 22). Сред тях, такива характеризиращи се със стойности на $p \leq 0.01$ са асоциациите на HLA-C локуса с всеки от HLA-G, -F и -E локусите: **C*02:02:02-G*01:01:01** (ХЧ стари: 0.0285, ХЧ млади: 0.1591, OR: 0.2, **P=0.01**), **C*04:01:01-F*01:03:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.1263, **P=0.002**) и **C*02:02:02-E*01:03:02** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0909, **P=0.01**). Допълнително, **B*27:05:02-G*01:01:0**1 (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0627, **P=0.04**) и **B*27:05:02-H*01:01:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0682, **P=0.04**) хаплотипите, също се установяват с повишена честота при млади индивиди, но с гранични p стойности. И двата хаплотипа не се намират в равновесна скаченост. Тези резултати, биха могли да се обяснят с наличието на значима, неравновесната скаченост между HLA-B*27:05:02 и -C*02:02:02 алелите (стн. остатък: 2.644), съставляващи втория по честота HLA-B-C хаплотип (6.8%) в изследваната група от 22ма млади индивиди от българската популация.

3. Асоциация на некласическите HLA-клас I гени (HLA-E, -F, -G, -H) с MICA и MICB клас I свързаните гени при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

Най-често наблюдаваните некласически HLA клас I - MICA хаплотипи при млади индивиди са както следва: E*01:01:01~MICA*008:01 (11.4%), F*01:01:01~MICA*018:01 (13.6%), G*01:01:01~MICA*008:01 (18.2%), H*02:04~MICA*008:01 (9.1%), H*01:01:01~MICA*008:01 (9.1%) и H*01:01:01~MICA*007:01 (9.1%). В състава на изброените хаплотипи не се установява наличие на неравновесна връзка, с изключение на слабо изразена връзка в състава на H*02:04~MICA*008:01 хаплотипната асоциация (стн. остатък: 2.55). Най-често представените некласически HLA клас I - MICB хаплотипи са както следва: E*01:01:01~MICB*002:01 (22,2%), F*01:01:01~MICB*005:02 (19,1%), G*01:01:02~MICB*002:01 (15,6%), H*01:01:01~MICB*005:02 (10,6%), като сред тях само в състава на G*01:01:02~MICB*002:01 хаплотипа се установява наличие на слабо представена неравновесна скаченост (стн. остатък: 2.54). Като цяло асоциацията на MIC гените с некласическите HLA клас Ib гени, изразена в брой хаплотипи намиращи се в неравновесна връзка е слабо представена (таблица 27).

Таблица 27. Хаплотипни асоциации на MICA,MICB локусите с HLA-E, -F, -G, -H при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

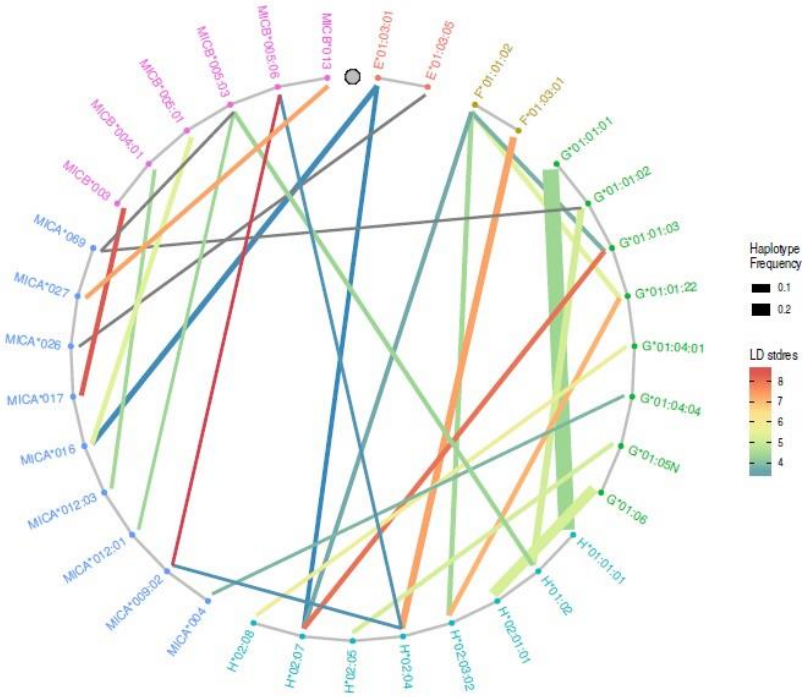
Некласически HLA клас I - MICA хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
G*01:04:04~MICA*002:02	0,0227	0,0016027	3,4928408	1,0	2,3
G*01:05N~MICA*009:02	0,0227	0,00051529	6,4810044	1,0	2,3
G*01:01:22~MICA*016	0,0227	0,00206343	3,010374	1,0	2,3
E*01:06~MICA*004	0,0227	0,00207025	3,0044079	1,0	2,3
H*02:07~MICA*002:01	0,0682	0,01069884	3,6677427	3,0	6,8
H*02:05~MICA*009:02	0,0227	0,00059701	5,9986964	1,0	2,3

Некласически HLA клас I - MICB хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
G*01:05N~MICB*005:06	0,0227	0,00051529	6,4810044	1,0	2,3
G*01:04:01~MICB*005:03	0,0227	0,00103285	4,4697693	1,0	2,3
G*01:06~MICB*005:08	0,0227	0,00207025	3,0044079	1,0	2,3
H*02:05~MICB*005:06	0,0227	0,00059701	5,9986964	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци.

В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи

E*01:01:01~MICA*008:01 (19.4%), F*01:01:01~MICA*002:01 (11.3%), G*01:01:01~MICA*002:01 (8.8%) и H*02:01:01~MICA*008:01 (9.3%) са най-представените, реални хаплотипи при дълголетници. Най-често представения HLA-F-MICA хаплотип при дълголетници: F*01:01:01~MICA*008:01 (14.6%), не представлява реален хаплотип, тъй като наблюдаваната му честота е по-малка от очакваната. Най-често представените некласически клас I – MICB хаплотипи при здрави, възрастни индивиди от българската популация са E*01:01:01~MICB*002:01 (19,4%), F*01:01:01~MICB*002:01 (30,6%), G*01:01:01~MICB*002:01 (15,5%), H*02:01:01~MICB*002:01 (13,1%). Нито един от изброените MIC – некласически HLA клас Ib хаплотипи при дълголетници не се намира в неравновесна връзка. При възрастни индивиди най-голяма степен на асоциация се наблюдава между MICA и HLA-G локуса, с 33.3 % от наблюдаваните, реални хаплотипи (ХЧ > 1%) намиращи се в неравновесна скаченост по между си (фигура 23). Асоциацията на MIC и HLA клас Ib гените, като цяло е слабо изразена, като нейната степен се различава между изследваните групи от здрави, възрастни и млади индивиди. Така например в изследваната група от млади индивиди най-голяма степен на асоциация се наблюдава между MICA и HLA-H, с 52.4% от реалните хаплотипи (ХЧ > 1%) намиращи се в неравновесна връзка, като при дълголетници процента на асоциацията на тези два локуса е едва 22.6%. При възрастни най-слаба асоциация се установява между MICA и HLA-E гените с едва 5.3% от реалните хаплотипи намиращи се в неравновесна скаченост, като при млади индивиди този процент отговаря на 20%.



Фигура 23. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на MICA и MICB локусите с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

Сравнителен анализ на некласически HLA клас I – MIC хаплотипни честоти при двете изследвани групи

Бе извършен и дву-локусен хаплотипен анализ засягащ некласическите HLA клас Ib и MIC гените. При дълголетници не се установява значима повишена честота на някой от наблюдаваните хаплотипи. Висока хаплотипна честота се установява за HLA-H*02:01:01-MICB*002:01 хаплотипа при възрастни (ХЧ стари: 0.1312, ХЧ млади: 0.0227, OR=6.5, P=0.09), но наблюдението няма статистическа значимост. При млади индивиди от българската популация няколко хаплотипа се открояват с повишена честота. Сред тях **H*01:01:01-MICA*008:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0909, **P=0.01**) се откроява с най-голяма разлика в хаплотипните честоти. Не се установява наличие на неравновесна скаченост в рамките на хаплотипа.

4. Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с класическите HLA клас II гени (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) локуса при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

4.1.Асоциация на некласическите HLA-клас I гените с HLA-DRB1 локуса

Сред най-често представените некласически HLA клас Ib – DRB1 хаплотипи при млади индивиди, преобладават тези в асоциация с DRB1*16:01:01 алела: E*01:01:01~DRB1*01:01:01 (11.4%), F*01:01:01~DRB1*16:01:01 (15.9%), G*01:01:01~DRB1*16:01:01 (11.4%) и H*01:01:01~DRB1*16:01:01 (10.6%). Най-много скачени хаплотипи се наблюдават при асоциацията на HLA-DRB1 локуса с HLA-G, следван от асоциацията на локуса с некласическите HLA-E и -H локуси (таблица 28). От съществен интерес е изследването на асоциацията между HLA-DRB1 и HLA-G, тъй като и двата локуса са асоциирани с репродуктивни проблеми.

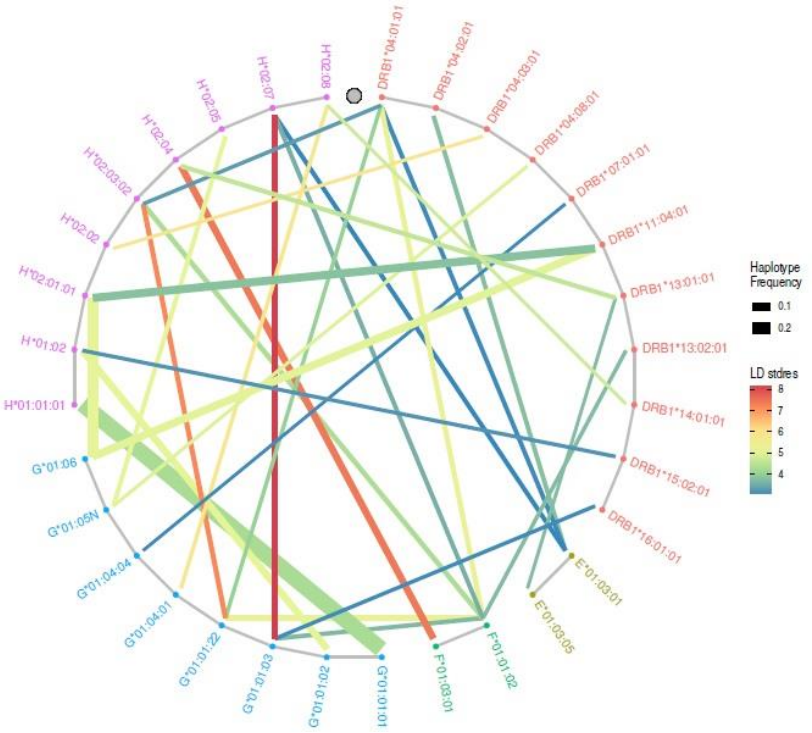
Таблица 28. Хаплотипни асоциации на HLA-DRB1 локуса с HLA-E, -F, -G, -H при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Некласически HLA клас I - DRB1 хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
E*01:03:01~DRB1*14:01:01	0,0455	0,0062	3,298	2,0	4,6
E*01:06~DRB1*11:01:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
E*01:06~DRB1*04:05:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
F*01:03:01~DRB1*03:01:01	0,0682	0,0114	3,515	3,0	6,8
G*01:04:04~DRB1*11:01:01	0,0227	0,0015	3,563	1,0	2,3
G*01:05N~DRB1*15:01:01	0,0227	0,0021	3,010	1,0	2,3
G*01:01:22~DRB1*04:05:01	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
G*01:06~DRB1*13:02:01	0,0227	0,0021	3,004	1,0	2,3
H*02:07~DRB1*01:01:01	0,0568	0,0090	3,337	2,5	5,7
H*02:03:02~DRB1*04:05:01	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи

Хаплотипи в асоциация с DRB1*11:04:01, са преобладаващи сред най-често срещаните некласически HLA клас Ib – DRB1 хаплотипи при дълголетници: E*01:01:01~DRB1*07:01:01 (8.75%), E*01:01:01~DRB1*11:04:01 (8.75%),

F*01:01:01~DRB1*11:04:01 (13.75%), G*01:06~DRB1*11:04:01 (11.25%), H*02:01:01~DRB1*11:04:01 (12.1%), от които последните два се намират в значима неравновесна скаченост. При дълголетници хаплотипи отличаващи се с добре изразена сила на неравновесната връзка, характеризираща се със стойности на стандартизираните остатъци по-голяма от пет са HLA-F*01:01:02~DRB1*04:01:01, -G*01:06~DRB1*11:04:01 и -H*02:02~DRB1*04:03:01 (фигура 24). От изброените хаплотипи, HLA-F*01:01:02~DRB1*04:01:01 изобщо не се наблюдава в изследваната група от млади индивиди, за -G*01:06~DRB1*11:04:01 не се установява наличие на неравновесна връзка, а H*02:02~DRB1*04:03:01 хаплотипа се характеризира с по-слаба неравновесна скаченост. При млади индивиди един единствен хаплотип се отличава със силна неравновесната скаченост изразена със стойност на стандартизираните остатъци по-голяма от пет: H*02:03:02~DRB1*04:05:01 (таблица 28).



Фигура 24. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-DRB1 локуса с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

4.2.Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с HLA-DQ локусите (HLA-DQA1, DQB1)

Най-често представените некласически HLA клас Ib – DQA1 хаплотипи в изследваната група от млади индивиди от българската популация са както следва: HLA-H*01:01:01~DQA1*01:02:02 (8.8%), -G*01:01:01~DQA1*01:02:02 (9.1%), -F*01:01:01~DQA1*01:02:02 (20.5%) и -E*01:01:01~DQA1*01:02:02 (13.2%), като за нито една от хаплотипните асоциации не се установява наличие на значима скаченост. Прави впечатление, че всички изброени хаплотипи, представляват асоциация на HLA-DQA1*01:02:02 алелната специфичност. Най-представените некласически HLA клас Ib - DQB1 хаплотипи за групата, представляват асоциации на същите некласически HLA алелни специфичности: H*01:01:01~DQB1*05:02:01 (10.7), G*01:01:01~DQB1*03:01:01 (11%), F*01:01:01~DQB1*05:02:01 (22.7%), E*01:01:01~DQB1*05:01:01 (10.5%), за които също не се установява наличие на неравновесност на връзката. Най-голям брой скачени хаплотипи се установяват между всеки от DQA1, DQB1 локусите и HLA-H локуса (таблица 29).

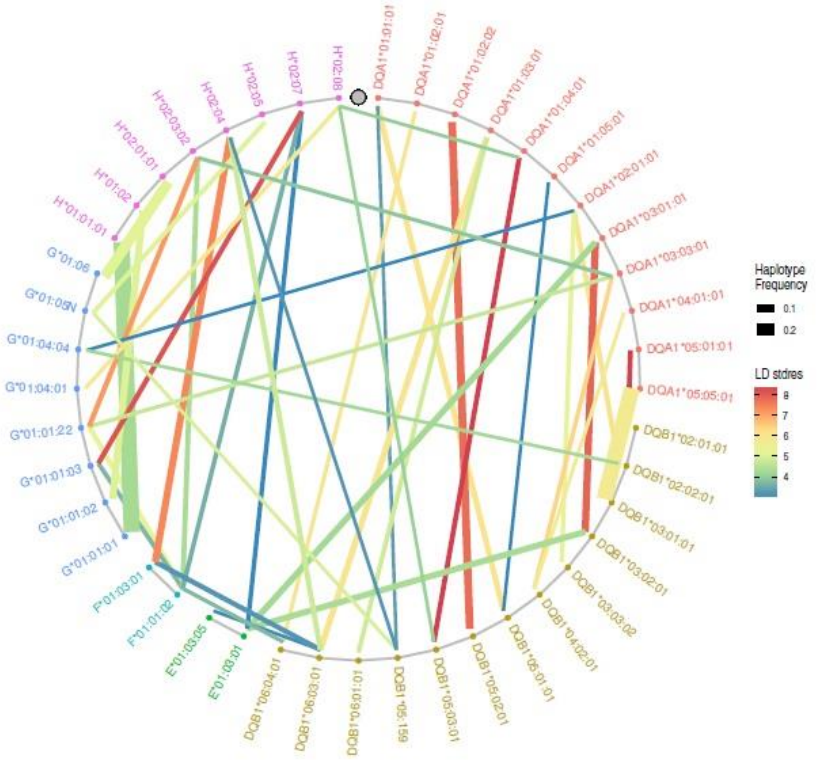
Таблица 29. Хаплотипни асоциации на HLA-DQA1 и -DQB1 локусите с HLA-E, -F, -G, -H гените при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в добре изразена неравновесна скаченост (стн. ост. > 3)

Некласически HLA клас I - DQA1 хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
H*02:07~DQA1*01:01:01	0,0568	0,0090	3,337	2,5	5,7
H*02:02~DQA1*03:01:01	0,0227	0,0018	3,271	1,0	2,3
H*02:03:02~DQA1*03:03:01	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
G*01:04:01~DQA1*01:01:02	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
G*01:01:22~DQA1*03:03:01	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
E*01:06~DQA1*03:03:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
Некласически HLA клас I - DQB1 хаплотип	**наблюдавана ХЧ**	**Очаквана ХЧ**	**Стн Ост**	**Брой**	**%**
H*02:07~DQB1*05:01:01	0,0726	0,0099	4,170	3,2	7,3
H*02:04~DQB1*02:01:01	0,0568	0,0099	3,118	2,5	5,7
H*02:02~DQB1*03:04:01	0,0227	0,0007	5,700	1,0	2,3
H*02:03:02~DQB1*02:02:01	0,0227	0,0007	5,700	1,0	2,3
G*01:01:03~DQB1*05:01:01	0,0682	0,0114	3,517	3,0	6,8
G*01:01:22~DQB1*02:02:01	0,0227	0,0006	6,161	1,0	2,3
F*01:03:01~DQB1*02:01:01	0,0779	0,0125	3,855	3,4	7,8
E*01:06~DQB1*02:02:01	0,0227	0,0011	4,238	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост,

стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

При здрави възрастни индивиди от българската популация най-често представените некласически HLA клас Ib - DQA1 реални хаплотипи, представляват предимно асоциации на DQA1*05:05:01 алелната специфичност: H*02:01:01~DQA1*05:05:01 (16.7%), F*01:01:01~DQA1*05:05:01 (25.7%), G*01:01:01~DQA1*01:02:02 (7.5%), E*01:03:02~DQA1*05:05:01 (11.8%), като само в състава на първия от изброените хаплотипи се установява наличие на неравновесна скаченост. В изследваната от нас група дълголетници, всъщност най-представените асоциации на HLA-DQA1 с всеки от HLA-G и -E локусите са G*01:01:01~DQA1*05:05:01 (10.9%) и E*01:01:01~DQA1*05:05:01 (16.5%), които обаче не представляват реални хаплотипи, тъй като наблюдаваната в групата честота е по-малка от теоретично очакваната. Най-често представените HLA клас Ib - DQB1 хаплотипи при дълголетници са както следва: H*02:01:01~DQB1*03:01:01 (15.1%), G*01:06~DQB1*03:01:01 (12.3%), F*01:01:01~DQB1*03:01:01 (27%) и E*01:01:01~DQB1*03:01:01 (19.1%), като в състава на първите два хаплотипа се установява слаба неравновесна връзка със стойности на стандартизираните остатъци съответно 2.1 и 2.65. Асоциацията на DQA1, DQB1 локусите с всеки от некласическите HLA клас Ib гени е слабо изразена като мнозинството от хаплотипи намиращи се в скаченост се характеризират със стойности на стандартизираните остатъци по-малки от три. Хаплотипи, които се отличават със добре представена скаченост, изразена със стойности на стандартизираните остатъци по-големи от 3 са представени на фигура 25.



Фигура 25. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-DQ1 и -DQB1 локусите с некласическите HLA-E, -F, -G, -H локуси при възрастни индивиди. Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1% (ХЧ > 0.0125). Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.

4.3.Асоциация на некласическите HLA-клас I гени с HLA-DPB1 локуса

Най-често наблюдаваните некласически клас Ib – DPB1 хаплотипи при млади индивиди от българската популация представляват асоциации на HLA-DPB1*04:01:01 алелната специфичност: HLA-H*01:01:01~DPB1*04:01:01 (17.4%), G*01:01:01~DPB1*04:01:01 (21.9%), F*01:01:01~DPB1*04:01:01 (22.7%), E*01:01:01~DPB1*04:01:01 (13.6%). Не се установява неравновесна връзка в състава на изброените, най-често срещани хаплотипи. Въпреки голямото физическо разстояние делящо HLA-DPB1 локуса от некласическите HLA клас Ib гени, асоциацията на локуса с некласическите HLA-G и -H гени е сравнително добре представена с 33.3% от наблюдаваните реални хаплотипи с честота по-голяма от 1%, намиращи се в неравновесна скаченост. Хаплотип наблюдаван с най-висока стойност на стандартизирания остатък и съответно с най-силна скаченост е G*01:05N~DPB1*06:01:01 (таблица 30).

Таблица 30. Хаплотипни асоциации на HLA-DPB1 локусите с HLA-E, -F, -G, -H гените при здрави, млади индивиди от българската популация, намиращи се в неравновесна скаченост

Некласически HLA клас I - DPB1 хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
H*01:02~DPB1*04:02:01	0,0909	0,0335	2,046	4,0	9,1
H*02:07~DPB1*02:01:02	0,0606	0,0143	2,543	2,7	6,1
H*01:02~DPB1*23:01:01	0,0455	0,0084	2,678	2,0	4,6
H*02:07~DPB1*03:01:01	0,0341	0,0054	2,590	1,5	3,4
H*02:02~DPB1*02:01:02	0,0303	0,0048	2,442	1,3	3,0
H*02:01:01~DPB1*104:01	0,0227	0,0024	2,752	1,0	2,3
H*02:05~DPB1*06:01:01	0,0227	0,0006	5,999	1,0	2,3
H*02:01:01~DPB1*05:01:01	0,0227	0,0024	2,752	1,0	2,3
G*01:01:02~DPB1*04:02:01	0,1136	0,0372	2,580	5,0	11,4
G*01:01:02~DPB1*23:01:01	0,0455	0,0093	2,477	2,0	4,6
G*01:06~DPB1*104:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
G*01:05N~DPB1*06:01:01	0,0227	0,0005	6,481	1,0	2,3
G*01:04:01~DPB1*17:01:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
G*01:06~DPB1*05:01:01	0,0227	0,0010	4,470	1,0	2,3
F*01:03:01~DPB1*03:01:01	0,0455	0,0114	2,111	2,0	4,6
F*01:03:01~DPB1*01:01:01	0,0455	0,0076	2,877	2,0	4,6
F*01:03:01~DPB1*05:01:01	0,0227	0,0038	2,036	1,0	2,3
E*01:03:02~DPB1*15:01:01	0,0682	0,0217	2,071	3,0	6,8
E*01:06~DPB1*03:01:01	0,0227	0,0031	2,330	1,0	2,3

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скаченост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

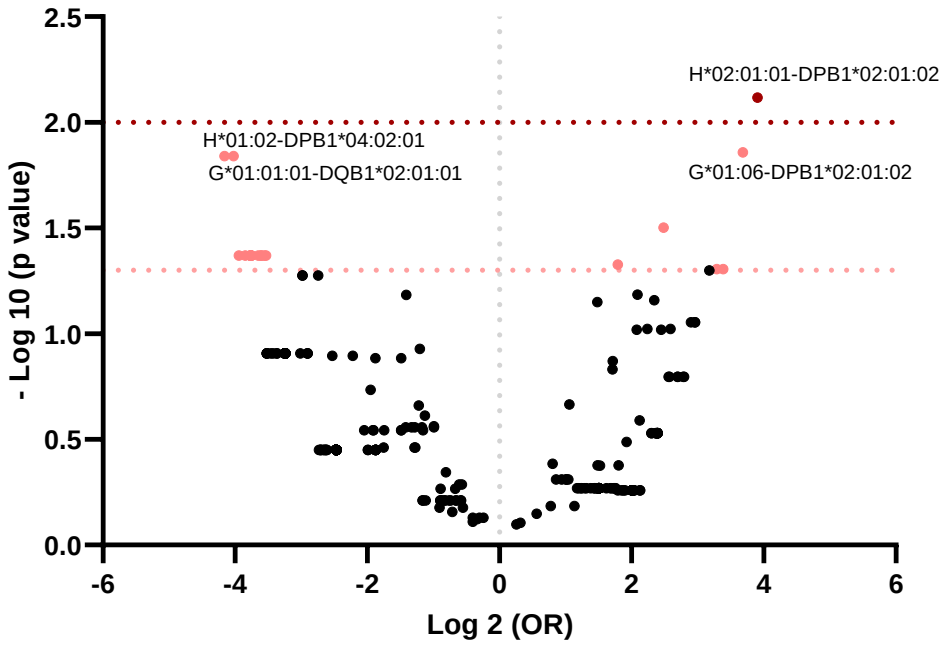
При здрави възрастни, най-често срещаните HLA клас Ib - DPB1 хаплотипи, представляват предимно асоциации на HLA-DPB1*02:01:01 алелната специфичност: H*02:01:01~DPB1*02:01:02 (8.9%), G*01:06~DPB1*02:01:02 (7.8%), F*01:01:01~DPB1*02:01:02 (18.2%), E*01:01:01~DPB1*04:01:01 (10.2%). Не се установява неравновесна връзка в състава на хаплотипите. Значително по-малък брой хаплотипи намиращи се в неравновесна връзка се установяват при дълголетници в сравнение с млади индивиди (таблица 31), въпреки по-големия брой изследвани възрастни индивиди. Неравновесна скаченост не се установява за нито един от HLA-F-DPB1 хаплотипите при дълголетници.

Таблица 31. Хаплотипни асоциации на HLA-DPB1 локусите с HLA-E, -F, -G, -H гените при здрави, възрастни индивиди от българската популация, намиращи се в неравновесна скученост

Некласически HLA клас I - DPB1 хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
H*01:02~DPB1*13:01:01	0,0250	0,0024	4,158	2,0	1,6
H*02:07~DPB1*17:01:01	0,0125	0,0007	4,065	1,0	0,8
H*02:04~DPB1*104:01	0,0125	0,0010	3,225	1,0	0,8
H*02:08~DPB1*03:01:01	0,0125	0,0008	3,588	1,0	0,8
G*01:05N~DPB1*15:01:01	0,0125	0,0005	4,969	1,0	0,8
G*01:01:03~DPB1*17:01:01	0,0125	0,0006	4,247	1,0	0,8
E*01:03:05~DPB1*05:01:01	0,0125	0,0002	8,832	1,0	0,8

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. В таблицата се представени хаплотипи, които се преброяват поне веднъж и се намират в значима неравновесна скученост. С удебелен шрифт са представени най-често наблюдаваните за групата хаплотипи.

Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на некласически HLA клас I – класическите HLA клас II хаплотипи при двете изследвани групи



Фигура 26. Сравнителен анализ на класическите HLA клас II – некласически HLA клас I дву-локусни хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

Сравнителния анализ на хаплотипните честоти, разкри няколко статистически значими различия между двете изследвани групи. При дълголетници два хаплотипа се открояват със силна, статистически значима разлика, изразяваща се със стойности на p ≤ 0.01 : **H*02:01:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.1397, ХЧ млади: 0, **P=0.008**) и **G*01:06-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.1214, ХЧ млади: 0, **P=0.014**). Двата хаплотипа представляват асоциации на HLA-DPB1*02:01:02 алелната специфичност. С повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост се наблюдават следните хаплотипи: **F*01:01:01-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.1, ХЧ млади: 0, **P=0.05**), **F*01:01:01-DQA1*05:05:01** (ХЧ стари: 0.257, ХЧ млади: 0.0909, OR: 3.45, **P=0.047**), **H*02:01:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.1511, ХЧ млади: 0.0309, OR:5.6, **P=0.03**) и **E*01:03:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0938, ХЧ млади: 0, **P=0.05**). С повишена честота при млади индивиди и стойности на статистическа значимост равни на 0.01, се откроявят два класически HLA клас II – некласически HLA клас Ib хаплотипна: G*01:01:01-DQB1*02:01:01 (ХЧ стари: 0., ХЧ млади: 0.0825, **P=0.01**) и H*01:02-DPB1*04:02:01 (ХЧ стари: 0., ХЧ млади: 0.0909, **P=0.01**), в състава на който се наблюдава неравновесна връзка (стн. остатък: 2.045).

III. Разгърнат хаплотипен анализ обхващащ класическия HLA-A локус и некласическите HLA клас I (HLA-E, -F, -G, -H) гени

Предвид малката бройка индивиди изследвани за некласически HLA Ib полиморфизъм, при извършения разширен хаплотипен анализ не се установяват значими различия между двете изследвани групи. Въпреки невъзможността да се изведат статистически значими разлики, интересни са наблюденията свързани с най-често представените разширени хаплотипи при дълголетници и млади индивиди (таблица 32). При възрастни, разширен хаплотипен анализ обхващаш некласическите HLA клас Ib гени и класическия HLA-A ген, най-представен се явява HLA-F*01:01:01-G*01:06-H*02:01:01-A*01:01:01-E*01:01:01 хаплотипа, който се наблюдава при 13.8% от изследваната група, следван от HLA-F*01:01:01-G*01:01:01-H*01:01:01-A*02:01:01-E*01:03:02 (12.8%), който от своя страна е и най-често срещания хаплотип при млади индивиди (17.3%).

Таблица 32. Най-често срещани HLA- F-G-H-A-E хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

F-G-H-A-E хаплотип при млади	ХЧ млади	СО	Брой млади	%
F*01:01:01-G*01:01:01-H*01:01:01-A*02:01:01-E*01:03:02	0,1727	0,0626	7,6	17,3
F*01:01:01-G*01:01:01-H*01:01:01-A*02:01:01-E*01:01:01	0,0773	0,0487	3,4	7,7
F*01:01:01-G*01:01:02-H*01:02-A*25:01:01-E*01:01:01	0,0682	0,0372	3,0	6,8
F*01:03:01-G*01:01:01-H*02:04-A*03:01:01-E*01:03:02	0,0546	0,0344	2,4	5,5
F*01:01:01-G*01:01:02-H*01:02-A*26:01:01-E*01:01:01	0,0455	0,0338	2,0	4,5
F*01:01:01-G*01:01:02-H*01:02-A*26:01:01-E*01:03:01	0,0455	0,0342	2,0	4,5
F*01:01:01-G*01:06-H*02:01:01-A*01:01:01-E*01:01:01	0,0455	0,0303	2,0	4,5
F*01:01:02-G*01:01:03-H*02:07-A*11:01:01-E*01:01:01	0,0455	0,0353	2,0	4,5
F-G-H-A-E хаплотип при възрастни	**ХЧ стари**	**СО**	**Брой стари**	**%**
F*01:01:01-G*01:06-H*02:01:01-A*01:01:01-E*01:01:01	0,1375	0,0400	11,0	13,8
F*01:01:01-G*01:01:01-H*01:01:01-A*02:01:01-E*01:03:02	0,1283	0,0410	10,3	12,8
F*01:01:01-G*01:01:01-H*01:01:01-A*02:01:01-E*01:01:01	0,1217	0,0396	9,7	12,2
F*01:01:01-G*01:01:02-H*02:01:01-A*01:01:01-E*01:01:01	0,05	0,0254	4,0	5
F*01:01:02-G*01:01:22-H*02:03:02-A*32:01:01-E*01:01:01	0,05	0,0269	4,0	5
F*01:03:01-G*01:01:01-H*02:04-A*03:01:01-E*01:03:02	0,0467	0,0286	3,7	4,7
F*01:01:01-G*01:05N-H*02:05-A*30:01:01-E*01:01:01	0,0375	0,0216	3,0	3,75
F*01:01:01-G*01:06-H*02:01:01-A*01:01:01-E*01:03:01	0,0375	0,0227	3,0	3,75
F*01:01:02-G*01:01:03-H*02:07-A*11:01:01-E*01:03:01	0,0375	0,0204	3,0	3,75
F*01:01:01-G*01:01:02-H*01:02-A*25:01:01-E*01:01:01	0,025	0,0194	2,0	2,5
F*01:01:01-G*01:01:02-H*01:02-A*26:01:01-E*01:01:01	0,025	0,0197	2,0	2,5

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

До тук получените резултати, очертават определени тенденции за двете изследвани групи. При дълголетници некласическите HLA клас Ib алелни специфичности, които се установяват с повишена честота на алелно ниво и/или в хаплотипни дву-локусни асоциации са **HLA-H*02:01:01**, **G*01:06** и **F*01:01:01**, като първите два алела се намират и в силна неравновесна връзка както помежду си, така и с HLA-A*01:01:01. При млади индивиди, **HLA-H*01:01:01**, **H*01:02, G*01:01:01** и **F*01:03:01** алелните специфичности се явяват с повишена честота само в дву-локусни хаплотипни асоциации.

Интересно е наблюдението за повишената честота на срещане на HLA-F*01:01:01 в хаплотипни асоциации при възрастни. Тази алелна специфичност, не се установява в неравновесна скаченост с нито един класически HLA алел и съставлява

76.25% от HLA-F алелния репертоар при възрастни, следван от F*01:03:01 (12.5%) и F*01:01:02 (11.25%). За сравнение при млади индивиди се наблюдава подобно HLA-F алелно разпределение с лек превес на HLA-F*01:03:01 (16.7%). Предвид значително доминиращата алелна честота на HLA-F*01:01:01 е абсолютно обяснима и неговата по-често поява в състава на изследваните хаплотипи. HLA-F*01:01:01 се различава от F*01:01:02 по една синонимна замяна, като и двете алелни специфичности кодират един и същи протеин (F:01:01). HLA-F*01:01 и F*01:03 протеините се различават с една несинонимна замяна на серин с пролин (251S>P) на позиция кодон 251 - полиморфизъм, който се намира извън пептид свързващата ямка. Това, заедно с ограничения полиморфизъм на HLA-F (45 алела, кодиращи 6 протеина), навеждат към предположението, че при тези молекули клетъчната локализация на представяните от тях пептиди, селекцията и тяхното представяне, са процесите намиращи се в основата на биологичните различия между отделните HLA-F алели. Така, за HLA-F*01:01 е установено, че представя пептиди получени главно от цитозола и ядрото, като е описан благоприятен ефект на този алел при ХИВ инфекция, чиито протеинови взаимодействия се извършват главно в нуклеоплазмата (260). Допълнително, HLA-F*01:01 се характеризира с по-добро представяне на протеини, ангажирани с ензимни регулаторни процеси (261). Проучване проведено в Португалската популация, описва HLA-F*01:01:02 алелната специфичност като протективна за анкилозиращ спондилит (262). От своя страна HLA-F*01:03 протеина, е по-добре представен при свързването на нуклеинови киселини (261), като в отделно проучване алела е асоцииран с намален товар на хепатит В вирусна ДНК (35).

HLA-H от своя страна е ген, който дълго време не печели вниманието на изследователите, тъй като кодира скъсен, нефункциониращ протеин и по тази причина към днешна дата не е съвсем изяснена неговата роля. Проучвания от последните години доказват, че HLA-H проявява транскрипционна активност и вероятно подържа имунологична хомеостаза, като съществуват сведения, че делецията на този ген е свързана с лоши прогнози при бременност и белодробна трансплантация (256,263). При дълголетници, H*02:01:01 се наблюдава с повишена честота на алелно ниво (P=0.03, Pc=0.3), както и в дву-локусни хаплотипни асоциации. Това наблюдение може да е резултат от ограничения модел на асоциация установен за HLA-H*02:01:01 при възрастни. Тази алелна специфичност се намира в добре изразена неравновесна скаченост с класическите HLA-A*01:01:01 и DRB1*11:04:01 алелни специфичности, които в настоящия дисертационен труд се установяват с повишена честота при

дълголетници. Разбира се, наблюдаваната повишената честота на H*02:01:01 при дълголетници може да е резултат от други причини, свързани с неизвестни на този етап особености на отделните HLA-H алели. Така например, проучване от 2020 г (264) описва, че различните HLA-H алели се характеризират с различни нива на мРНК експресия, като H*01:01 и H*02:01 са описани като ниско-експресивни специфичности. В изследваната група от млади индивиди, не се установява значима разлика в HLA-H алелните честоти, с тенденция към слабо повишена честота на H*01:01:01 (OR: 0.6, P=0.2) и H*01:02 (OR: 0.5, P=0.15) алелите. Тези алелни специфичности се установяват със значима повишена честота в състава на дву-локусни хаплотипни асоциации при млади индивиди.

Освен с горе описаните класически HLA клас I и клас II алели, H*02:01:01 се наблюдава в неравновесна връзка и с некласическия G*01:06 алел, за които също се установяват тенденции за повишена честота при дълголетници. Въпреки, че в някой проучвания описват неблагоприятния ефект на G*01:06 алелната специфичност при бременност, те са концентрирани върху изследване индивидуалния полиморфизъм на HLA-G локуса без да вземат предвид евентуалния принос на други близко разположени гени, каквито са HLA-E и HLA-F, които също се експресират от плацентарния трофобласт. Съществува хипотеза, че негативния клиничен ефект на G*01:06 може да е резултат от намирането му в неравновесна връзка с ниско-експресивния HLA-E*01:01 и намален имунологичен толеранс (265). В изследваните от нас групи от дълголетници и млади индивиди, не се установява наличие на неравновесна връзка между G*01:06 и E*01:01. От друга страна, намирането на G*01:06 в неравновесна скаченост с HLA-H специфичност, може да има допълнителен толерогенен ефект като се има предвид значението на H сигналните пептиди за повърхностната имобилизация на HLA-E молекулите. Все още не е известно обаче дали различните HLA-E изоформи проявяват различна толерогеност в асоциация с HLA-H сигнален пептид.

Не се установяват съществени различия в HLA-E алелното и хаплотипно разпределение в изследваните от нас групи от здрави, възрастни и млади индивиди. На алелно ниво, HLA-E*01:01 и E*01:03 специфичностите имат сходно разпределение сред възрастни и млади индивиди. На хаплотипно ниво, при възрастни асоциации на HLA-E*01:01 и E*01:03 специфичностите се наблюдават с повишена честота и гранични стойности на статистическа значимост, а в изследваната група от млади индивиди E*01:03:02-C*02:02:02 хаплотипа се отличава със значима разлика в хаплотипната честота (p=0.01). Интересно наблюдение е, че и в двете изследвани групи

само E*01:03 алелната специфичност се установява в неравновесни асоциации с класически HLA алели, за разлика от E*01:01, за която не се установява нито една значима неравновесна връзка. На база тези резултати трудно могат да се изведат определени тенденции в HLA-E алелното и хаплотипно разпределение при дълголетници. Едно е сигурно, предвид значението на HLA-E кодирания протеин, във финото регулиране на активността на NK клетките посредством взаимодействието му с инхибиращи (NKG2A) и активиращи (NKG2C) рецептори експресирани на повърхността им, тяхното изследване в контекста на разбиране на механизмите стоящи в основата на процесите на „успешно“ стареене е от съществено значение. Допълнително, отделните HLA-E алели, освен по пептидните си афинитети, се различават по своята повърхностна експресия, като HLA-E*01:03 специфичността се характеризира с по-високи нива на експресия на повърхността на B клетки (266). В контекста на туморната имунология, тези сведения водят да предположението, че HLA-E*01:03 може да се разглежда като благоприятстваща туморното изплъзване от цитотоксичен имунен отговор посредством по-силно потискане активността на CD94+/NKG2A+/CD8+ клетки, в сравнение с ниско експресивната HLA-E*01:01 специфичност. При рак на дебелото черво, HLA-E*01:03 се асоциира с туморната прогресия (267). От друга страна съществуват данни за асоциацията на ниско-експресивната HLA-E*01:01 специфичност с някой автоимунни заболявания като псориазис (268), анкилозиращ спондилит (269) и диабет тип 1 (270), като в основата на тези асоциации стои модел на нарушена имунорегулаторна функция на NK клетките. Изложените до тук данни поставят въпроса, дали равномерното разпределение на HLA-E*01:01 и E*01:03 при възрастни и млади, което се описва и в други популации по света, не е еволюционно обосновано с цел поддържане на адекватни имунорегулаторни функции? И дали, именно баланса между двете алелни специфичности не стой в основата на процесите на „успешно“ стареене? Това предположение следва да се докаже в по-голяма група от изследвани индивиди.

Изследване на MICA и MICB полиморфизма на алелно и хаплотипно ниво при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

I. MICA, MICB алелен полиморфизъм при здрави дълголетници и млади индивиди от българската популация

В настоящия дисертационен труд за пръв път се анализира полиморфизма на некласическите HLA клас I свързани гени MICA и MICB при представители на здравата българска популация. Най-висока степен на полиморфизъм се установява за MICA гена с 36 наблюдавани алела, сред които с най-висока честота е MICA*008:01 (16.7%) (таблица 33). При здрави индивиди от българската популация се наблюдават 16 MICB алелни специфичности, като два алела съставляват 50% от MICB алелния репертоар: MICB*005:02 (25.9%) и MICB*002:01 (24.2%). MICB*005 е най-представената алелно групова специфичност (MICB*005:02, *005:03, *005:01, *005:08, *005:06).

Таблица 33. MICA и MICB полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

MICA алел (n=132)	АЧ	Брой	%
MICA*008:01	0,1705	45	17,1
MICA*009:01	0,1402	37	14,0
MICA*018:01	0,1212	32	12,1
MICA*002:01	0,1061	28	10,6
MICA*016	0,0758	20	7,6
MICA*007:01	0,053	14	5,3
MICA*004	0,0492	13	4,9
MICA*008:04	0,0265	7	2,7
MICA*011	0,0265	7	2,7
MICA*017	0,0227	6	2,3
MICA*027	0,0227	6	2,3
MICA*057	0,0189	5	1,9
MICA*010:01	0,0189	5	1,9
MICA*024	0,0152	4	1,5
MICA*028	0,0114	3	1,1
MICA*076	0,0114	3	1,1
MICA*009:02	0,0114	3	1,1
MICA*025	0,0076	2	0,8
MICA*022	0,0076	2	0,8
MICA*023	0,0076	2	0,8
MICA*006	0,0076	2	0,8
MICA*012:03	0,0076	2	0,8
MICA*013	0,0038	1	0,4
MICA*051	0,0038	1	0,4

MICB алел (n=118)	АЧ	Брой	%
MICB*005:02	0,2587	68	25,9
MICB*002:01	0,2417	63	24,2
MICB*019	0,1058	28	10,6
MICB*004:01	0,0888	23	8,9
MICB*018	0,0803	21	8,0
MICB*005:03	0,0466	12	4,7
MICB*008	0,0339	9	3,4
MICB*003	0,0254	7	2,5
MICB*005:01	0,0254	7	2,5
MICB*013	0,0254	7	2,5
MICB*020	0,0212	6	2,1
MICB*005:08	0,0169	4	1,7
MICB*006	0,0085	2	0,9
MICB*027	0,0085	2	0,9
MICB*005:06	0,0085	2	0,9
MICB*028	0,0044	1	0,4

MICA*019:01	0,0038	1	0,4
MICA*036	0,0038	1	0,4
MICA*060	0,0038	1	0,4
MICA*035	0,0038	1	0,4
MICA*007:04	0,0038	1	0,4
MICA*002:02	0,0038	1	0,4
MICA*007:02	0,0038	1	0,4
MICA*008:02	0,0038	1	0,4
MICA*068	0,0038	1	0,4
MICA*049	0,0038	1	0,4
MICA*085	0,0038	1	0,4

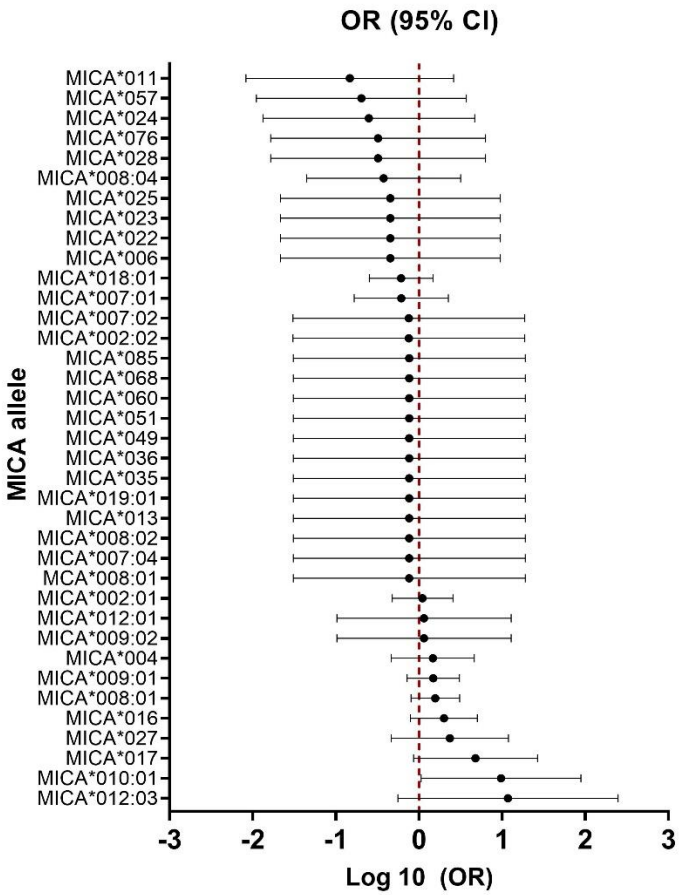
АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се преброява съответния алел в изследваната група; n, брой изследвани индивиди

Сравнителен анализ на MICA и MICB алелните честоти при здрави дълголетници и млади индивиди от българската популация

В изследваната група от 40 възрастни индивида от българската популация са установени общо 24 MIC алела, от които 14 MICA и 10 MICB. Най-често срещания MICA алел в тази група е MICA*008:01 (21.25%), следван от MICA*009:01 (17.5%), MICA*002:01 (11.25%) и MICA*016 (11.25%). Двата MICB алела наблюдавани при 65.4% от възрастните индивиди са MICB*002:01 (37.2%) и MICB*005:02 (28.2%).

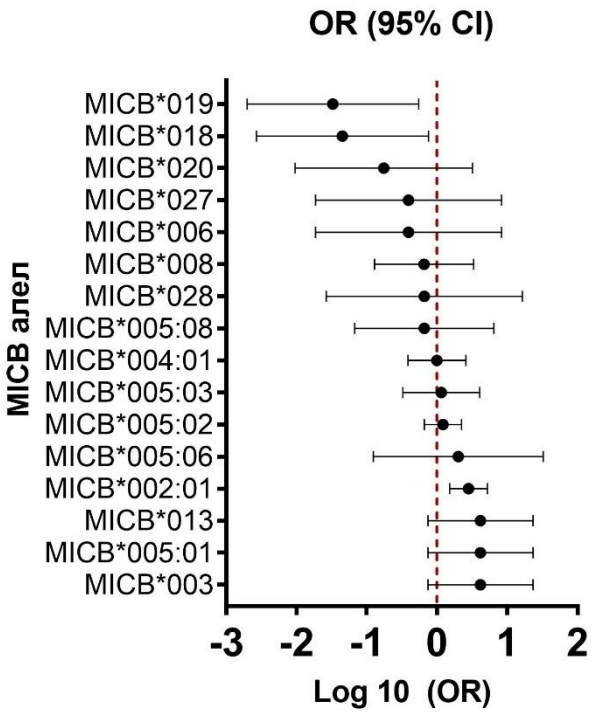
При млади индивиди от българската популация са наблюдавани общо 52 MIC алела, от които 36 MICA и 16 MICB. Най-често срещания MICA алел е MICA*008:01 (14.7%), следван от MICA*018:01 (13.6%), MICA*009:01 (12.5%) и MICA*002:01 (10.3%). MICB алела срещан с най-висока честота при млади е MICB*005:02 (24.4%), следван от MICB*002:01 (17.3%), MICB*019 (16%) и MICB*018 (12.1%).

Анализ на MICA алелното разпределение в българската популация показа, че няма статистически значима разлика в MICA алелните честоти при здрави възрастни и млади индивиди (фигура 27).



Фигура 27. Графика тип „гора“ (forest plot) изразяваща съотношението на шансовете (OR) и 95% доверителен интервал (95% CI) за MICA алелните специфичности наблюдавани при здрави, възрастни и млади индивиди от българската популация

Негативна асоциация с дълголетието е установена за два MICB алела: MICB*019 (АЧ млади: 0,1599, АЧ стари: 0, P_C=0.003) и MICB*018 (АЧ млади: 0.1214, АЧ стари: 0, P_C=0.02), които се наблюдават само в изследваната група от млади индивиди. MICB*002:01 (АЧ млади: 0.1734, AF стари: 0,3718, P_C=0.01), който е и най-често срещания MICB алел при възрастни, се наблюдава със статистически значима по-висока честота при възрастни индивиди от българската популация.



Фигура 28. Графика тип „гора“ (forest plot) изразяваща съотношението на шансовете (OR) и 95% доверителен интервал (95% CI) за MICB алелните специфичности наблюдавани при здрави, възрастни и млади индивиди от българската популация

В настоящия дисертационен труд за пръв път се определят алелните и хаплотипни честоти на некласическите HLA клас I свързани MICA и MICB гени при дълголетници от здравата българска популация чрез използване на секвениране от следващо поколение (NGS).

Сред HLA клас I свързаните гени, силна позитивна асоциация с дълголетието е установена за **MICB*002:01**, който е и най-често срещания MICB алел сред възрастни индивиди от българската популация (37,18%). Заедно с MICB*005:02 (28.21%), който е най-често срещания MICB алел в кавказоидната раса и при някой азиатски популации (1,2), двата алела съставляват 65.39% от MICB генетичния репертоар при възрастни индивиди. Интересно е и наблюдението, че при възрастни, този алел се намира в значима неравновесна скаченост с единични класически и некласически HLA алели: HLA-B*18:01:01, -C*15:02:01, -DQA1*05:01:01, -DQB1*02:01:01, -DRB1*03:01:01 и MICA*018:01. При последващите дву-локусни хаплотипни анализи, по-голямата част от тези асоциации, не се проявяват със значителна разлика между двете изследвани групи от здрави, млади и възрастни индивиди от българската популация. MICB*002:01 е описан като протективен алел при автоимунни заболявания, като системен лупус еритематозус (СЛЕ) и ревматичният артрит (РА) в

китайската популация (164,166). В същата популация е установена и повишена честота на алела в здравата контролна група в сравнение с пациенти с туберкулоза, но с гранична статистическа значимост (271). Този алел е описан и като протективен за респираторна синцитиална вирусна инфекция при деца (272). Съществуват обаче и сведения за висока честота на този алел при пациенти с левкемия от корейската популация (273). На този етап сравнително малко проучвания са изследвали значението на MICB алелния и хаплотипен полиморфизъм при физиологични и патологични условия, като основния дял от тези проучвания обхваща популациите от източна и югоизточна Азия.

MICA алел, който се наблюдава с повишена честота в изследваната група от здрави, дълголетници от българската популация е MICA*010:01, като статистическата значимост на установената асоциация обаче се губи след извършване на корекцията на Бонферони. При разглеждане на MICA алелното разпределение в световен мащаб, предоминантна се явява MICA*008 алелната специфичност, следвана от MICA*002, MICA*010, MICA*009 и MICA*004, за които се наблюдава интерпопулационно специфично разпределение (274). При здрави дълголетници от българската популация най-често срещания MICA алел е именно MICA*008:01 (21.25%), следван от MICA*009:01 (17.5%), MICA*002:01 (11.25%) и MICA*016 (11,25%). Въпреки множеството сведения за ролята на кодираната от MICA*008 молекула в избягването на антитуморен имунен отговор, предвид силно изразеното разпространение на този алел, някой предполагат неговата положителна селекция в хода на еволюцията, като съществуват и данни за намален риск от развитие на анкилозиращ спондилит, левкемия и синдром на Бехчет при носители на алела (273,275,276). Допълнително, често срещания във всички човешки популации CMV вирус се характеризира с блокиране експресията на MICA молекулите на повърхността на инфектираните клетки, като само MICA*008 алела се явява устойчив на това потискане (277,278).

Негативна асоциация с дълголетието се установява за два MICB алела, които не се наблюдават в изследваната група от здрави възрастни индивиди от българската популация: **MICB*018** и **MICB*019**. Както бе обсъдено по-рано в настоящата работа, в световен мащаб честотата на докладване на тези MICB алелни специфичности е сравнително ниска и към днешна дата липсва информация за функциите на кодираните от тях молекули.

II. Дву-локусни хаплотипи

1. Асоциация на MIC и HLA клас I гените (HLA-A, -B, -C) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

1.1.Асоциация на MICA и MICB гените с HLA-A локуса

Най-често срещаните HLA-A-MICA хаплотипи в изследваната група здрави, млади индивиди от българската популация са A*02:01:01~MICA*018:01 (5.6%), A*02:01:01~MICA*008:01 (5.4%), A*02:01:01~MICA*007:01 (5%) (таблица 34), като всички представляват асоциация на HLA-A*02:01:01 алелната специфичност. Сред тях единствено за A*02:01:01~MICA*007:01 се наблюдава статистически значима неравновесна скаченост между алелите. От своя страна A*02:01:01~MICB*005:02 (7.7%) и A*02:01:01~MICB*019 (5.6%) са най-често срещаните HLA-A-MICB хаплотипи при млади индивиди, за които също не се установява наличие на значима неравновесна скаченост. Въпреки наличието на глобална неравновесна скаченост между HLA-A и MICA локусите, едва 48% от HLA-A-MICA реални хаплотипи, наблюдавани с честота над 1 % при млади индивиди се намират в неравновесна връзка. За асоциацията на HLA-A локуси с MICB този процент се равнява на 33%.

Таблица 34. Най-често срещани A-MICA и A-MICB хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*02:01:01~MICA*018:01	0,0555	0,0327	1,639	9,7	5,6
A*02:01:01~MICA*008:01	0,0543	0,0355	1,292	9,4	5,4
A*02:01:01~MICA*007:01	**0,0501**	**0,0142**	**3,950**	**8,7**	**5,0**
A*32:01:01~MICA*008:01	**0,0321**	**0,0132**	**2,152**	**5,6**	**3,2**
A*03:01:01~MICA*002:01	**0,0306**	**0,0113**	**2,383**	**5,3**	**3,1**
A*02:01:01~MICA*002:01	0,0306	0,0256	0,411	5,3	3,1
A*24:02:01~MICA*009:01	0,0272	0,0180	0,892	4,7	2,7
A*03:01:01~MICA*008:01	0,0263	0,0157	1,108	4,6	2,6
A*02:01:01~MICB*005:02	0,0765	0,0577	0,949	11,9	7,7
A*02:01:01~MICB*019	0,0557	0,0378	1,127	8,7	5,6
A*24:02:01~MICB*005:02	0,0449	0,0379	0,439	7,0	4,5
A*03:01:01~MICB*019	**0,043**	**0,0140**	**3,031**	**6,7**	**4,3**
A*02:01:01~MICB*002:01	0,036	0,0410	-0,303	5,6	3,6
A*02:01:01~MICB*004:01	0,034	0,0212	1,085	5,3	3,4
A*24:02:01~MICB*004:01	0,0313	0,0139	1,824	4,9	3,1
A*11:01:01~MICB*002:01	0,0277	0,0129	1,620	4,3	2,8

A*25:01:01~MICB*002:01	**0,0277**	**0,0059**	**3,553**	**4,3**	**2,8**
A*02:01:01~MICB*018	0,0276	0,0287	-0,081	4,3	2,8
A*32:01:01~MICB*018	0,0266	0,0123	1,599	4,1	2,7
A*26:01:01~MICB*002:01	**0,0262**	**0,0094**	**2,159**	**4,1**	**2,6**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

При възрастни индивиди се наблюдават общо 42 HLA-A-MICA и 36 HLA-A-MICB хаплотипи, от които в таблицата 35 са представени тези с честота по-голяма от 2.5%. Най-често представените хаплотипи при дълголетници, представляват асоциации на най-често представените за изследваната група MICA и MICB алелни специфичности с HLA-A*01:01:01 алела (таблица 35). При дълголетници, реалните хаплотипни асоциации на HLA-A с всеки от MICA и MICB локуси, наблюдавани с честота по-голяма от 1% и намиращи се в неравновесна връзка се равняват съответно на 33% и 28%.

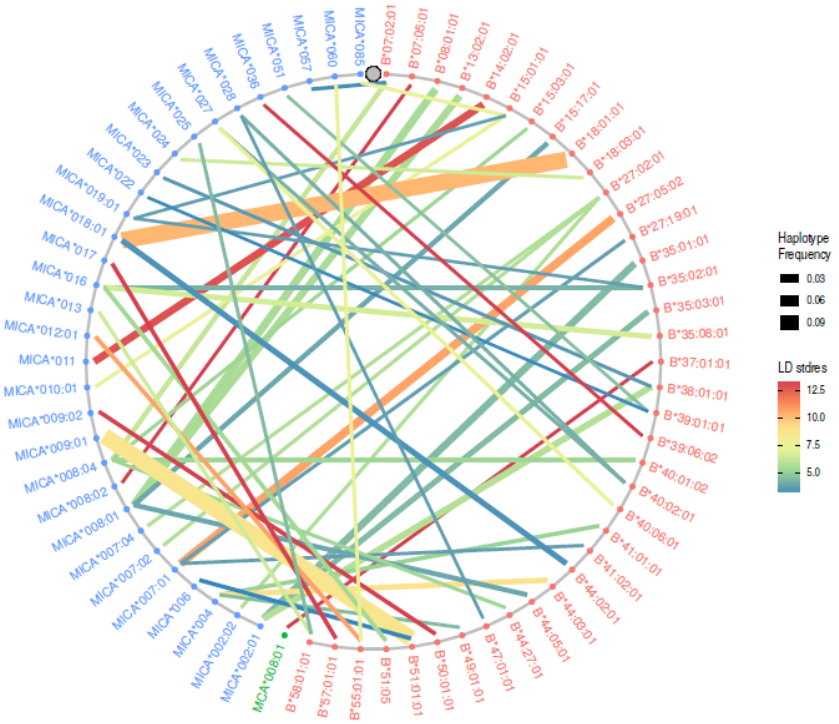
Таблица 35. Най-често срещани A-MICA и A-MICB хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
A*01:01:01~MICA*008:01	0,0834	0,0478	1,420	6,7	8,3
A*02:01:01~MICA*002:01	0,0713	0,0323	1,906	5,7	7,1
A*01:01:01~MICA*009:01	0,0685	0,0394	1,287	5,5	6,9
A*02:01:01~MICA*004	**0,05**	**0,0180**	**2,118**	**4,0**	**5,0**
A*02:01:01~MICA*009:01	0,044	0,0503	-0,245	3,5	4,4
A*03:01:01~MICA*008:01	0,0375	0,0159	1,515	3,0	3,8
A*01:01:01~MICA*017	0,0315	0,0113	1,698	2,5	3,2
A*24:02:01~MICA*008:01	0,0291	0,0213	0,477	2,3	2,9
A*01:01:01~MICA*016	0,0291	0,0253	0,210	2,3	2,9
A*01:01:01-MICB*002:01	0,121	0,086	1,023	9,5	12,1
A*02:01:01-MICB*002:01	0,113	0,110	0,079	8,8	11,3
A*01:01:01-MICB*005:02	0,071	0,065	0,197	5,5	7,1
A*02:01:01-MICB*005:02	0,057	0,083	-0,762	4,5	5,7
A*02:01:01-MICB*003	**0,051**	**0,015**	**2,578**	**4,0**	**5,1**
A*02:01:01-MICB*004:01	0,048	0,026	1,149	3,7	4,8
A*32:01:01-MICB*005:02	0,039	0,014	1,751	3,0	3,9
A*24:02:01-MICB*002:01	0,039	0,033	0,245	3,0	3,9
A*24:02:01-MICB*005:02	0,039	0,025	0,723	3,0	3,9
A*01:01:01-MICB*005:01	**0,039**	**0,012**	**2,151**	**3,0**	**3,9**
A*11:01:01-MICB*002:01	0,026	0,019	0,413	2,0	2,6
A*02:01:01-MICB*013	0,026	0,015	0,746	2,0	2,6
A*03:01:01-MICB*004:01	**0,026**	**0,007**	**1,982**	**2,0**	**2,6**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

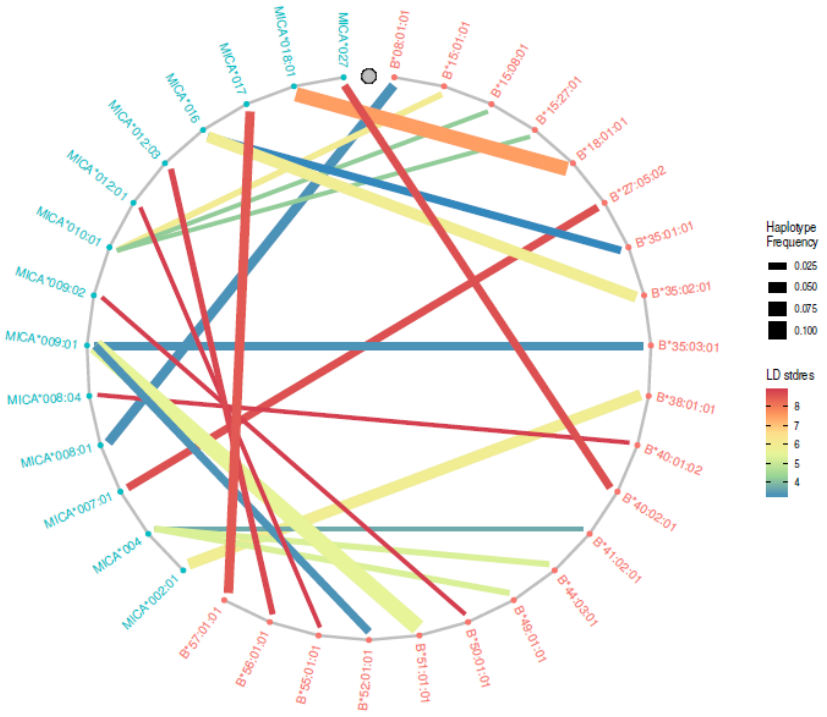
1.2.Асоциация на MICA, MICB гените с HLA-B локуса

Най-често представения HLA-B-MICA хаплотип при здрави, млади представители на българската популация е B*18:01:01~MICA*018:01 (11.2%), следван от B*51:01:01~MICA*009:01 (10.8%) (фигура 29). 96.15% от HLA-B-MICA хаплотипите, които се срещат с честота по-голяма от 1% в изследваната група млади индивиди от българската популация се намират в значима неравновесна скаченост.



Фигура 29. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-B и MICA локусите при млади индивиди. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

При дълголетници се преброяват 31 HLA-B-MICA, 87% от които се намират в значима скаченост по между си (фигура 30). Най-представени са хаплотипите B*51:01:01~MICA*009:01 (10%) и B*18:01:01~MICA*018:01 (8.75%).



Фигура 30. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на HLA-B и MICA локусите при дълголетници. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

Асоциацията на HLA-B и MICB локусите е по-слабо изразена: при млади индивиди 58% от хаплотипите с честота по-голяма от 1% се в неравновесна скаченост; при дълголетници този процент е значително по-малък - 30.8%. Прави впечатление, че при дълголетници се наблюдават значително по-голям брой дву-локусни хаплотипи с честота по-голяма от 2.5% (таблица 37), в сравнение с млади индивиди (таблица36). Предвид значението на класическите HLA клас I и некласическите клас I свързани молекули в индуцирането на антиген зависим и антиген независим имунен отговор, вероятно по-високата степен на полиморфизъм наблюдавана на хаплотипно ниво допринася за по-голямата устойчивост при дълголетници, посредством разпознаване и представяне на голям спектър от антигенни специфичности.

Таблица 36. Най-често срещани B-MICB хаплотипи при здрави, млади индивиди

HLA-B-MICB Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
B*18:01:01~MICB*019	**0,0577**	**0,02**	**3,298**	**9,0**	**5,8**
B*18:01:01~MICB*002:01	**0,0552**	**0,0217**	**2,813**	**8,6**	**5,5**
B*51:01:01~MICB*005:02	0,0513	0,0337	1,175	8,0	5,1

B*51:01:01~MICB*019	0,0449	0,0221	1,895	7,0	4,5
B*07:02:01~MICB*004:01	**0,0345**	**0,0035**	**6,484**	**5,4**	**3,5**
B*35:01:01~MICB*002:01	**0,0345**	**0,0137**	**2,208**	**5,4**	**3,5**
B*38:01:01~MICB*002:01	**0,0345**	**0,0057**	**4,748**	**5,4**	**3,5**
B*27:02:01~MICB*005:02	**0,0256**	**0,0080**	**2,440**	**4,0**	**2,6**
B*27:05:02~MICB*005:02	0,0256	0,0112	1,681	4,0	2,6
B*14:02:01~MICB*005:02	**0,0256**	**0,0064**	**2,981**	**4,0**	**2,6**

Таблица 37. Най-често срещани B-MICB хаплотипи при дълголетници

HLA-B-MICB Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
B*18:01:01~MICB*002:01	**0,1026**	**0,0381**	**2,858**	**8,0**	**10,3**
B*51:01:01~MICB*002:01	0,0641	0,0334	1,462	5,0	6,4
B*35:02:01~MICB*005:01	**0,0513**	**0,0033**	**7,382**	**4,0**	**5,1**
B*57:01:01~MICB*003	**0,0513**	**0,0026**	**8,368**	**4,0**	**5,1**
B*38:01:01~MICB*002:01	0,0385	0,0238	0,829	3,0	3,9
B*40:02:01~MICB*013	**0,0385**	**0,0020**	**7,251**	**3,0**	**3,9**
B*52:01:01~MICB*005:03	**0,0385**	**0,0020**	**7,251**	**3,0**	**3,9**
B*35:01:01~MICB*002:01	0,0321	0,0238	0,467	2,5	3,2
B*35:01:01~MICB*005:02	0,0321	0,0181	0,912	2,5	3,2
B*51:01:01~MICB*005:02	0,0256	0,0253	0,016	2,0	2,6
B*08:01:01~MICB*002:01	0,0256	0,0191	0,413	2,0	2,6
B*13:02:01~MICB*005:02	0,0256	0,0072	1,903	2,0	2,6
B*15:17:01~MICB*002:01	0,0256	0,0143	0,827	2,0	2,6
B*44:03:01~MICB*005:02	0,0256	0,0072	1,903	2,0	2,6
B*08:01:01~MICB*008	**0,0256**	**0,0013**	**5,915**	**2,0**	**2,6**
B*27:05:02~MICB*005:02	0,0256	0,0109	1,242	2,0	2,6
B*37:01:01~MICB*004:01	**0,0256**	**0,0023**	**4,290**	**2,0**	**2,6**
B*56:01:01~MICB*004:01	**0,0256**	**0,0023**	**4,290**	**2,0**	**2,6**
B*44:02:01~MICB*005:02	0,0256	0,0109	1,242	2,0	2,6

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

1.3.Асоциация на MICA и MICB гените с HLA-C локуса

Най-често срещания HLA-C-MICA хаплотип при здрави, млади индивиди е C*12:03:01~MICA*002:01 (7.1%), следван от C*04:01:01~MICA*016 (6%) и C*07:01:01~MICA*018:01 (5.8%), всички намиращи се в силно изразена неравновесна скаченост (таблица 38). HLA-C-MICB хаплотипи, които се срещат при приблизително 19% от изследваната група млади индивиди и се намират в статистически значима скаченост са C*02:02:02~MICB*005:02 (10.4%) и C*04:01:01~MICB*019 (8.4%).

Асоциацията на MIC гените с HLA-C локуса е добре представена с 76.9% от HLA-C-MICA и 60% от HLA-C-MICB реални хаплотипи (ХЧ > 1%) намиращи се в скаченост.

Таблица 38. Най-често срещани C-MICA и C-MICB хаплотипи при здрави млади индивиди

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
C*12:03:01~MICA*002:01	**0,071**	**0,0137**	**6,589**	**13,1**	**7,1**
C*04:01:01~MICA*016	**0,0598**	**0,0095**	**6,987**	**11,0**	**6,0**
C*07:01:01~MICA*018:01	**0,0582**	**0,0129**	**5,376**	**10,7**	**5,8**
C*12:03:01~MICA*018:01	**0,0388**	**0,0181**	**2,074**	**7,1**	**3,9**
C*06:02:01~MICA*008:01	**0,0383**	**0,0102**	**3,752**	**7,0**	**3,8**
C*07:01:01~MICA*008:01	**0,0383**	**0,0139**	**2,783**	**7,0**	**3,8**
C*08:02:01~MICA*011	**0,038**	**0,0014**	**13,040**	**7,0**	**3,8**
C*02:02:02~MICA*007:01	**0,0359**	**0,0076**	**4,400**	**6,6**	**3,6**
C*04:01:01~MICA*002:01	0,0323	0,0163	1,682	5,9	3,2
C*15:02:01~MICA*009:01	**0,0312**	**0,0063**	**4,229**	**5,7**	**3,1**
C*02:02:02~MICB*005:02	**0,1036**	**0,0346**	**4,552**	**16,2**	**10,4**
C*04:01:01~MICB*019	**0,0839**	**0,0263**	**4,385**	**13,1**	**8,4**
C*04:01:01~MICB*002:01	0,045	0,0285	1,206	7,0	4,5
C*12:03:01~MICB*002:01	0,0434	0,0246	1,480	6,8	4,3
C*07:01:01~MICB*002:01	**0,0361**	**0,0155**	**2,044**	**5,6**	**3,6**
C*12:03:01~MICB*019	0,0319	0,0227	0,757	5,0	3,2
C*01:02:01~MICB*005:02	**0,0296**	**0,0091**	**2,672**	**4,6**	**3,0**
C*07:02:01~MICB*004:01	**0,0276**	**0,0054**	**3,787**	**4,3**	**2,8**
C*12:02:02~MICB*005:03	**0,0269**	**0,0010**	**10,193**	**4,2**	**2,7**

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

Най-често срещания HLA-C-MICA хаплотип при дълголетници е C*04:01:01~MICA*016 (10%), следван от C*12:03:01~MICA*002:01 (7.5%), C*06:02:01~MICA*008:01 (6.25%) и C*07:01:01~MICA*018:01 (6.25) (таблица 39). Алелите в състава на хаплотипите се намират в статистически значима неравновесна скаченост помежду си. Най-често срещаните HLA-C-MICB хаплотипи при дълголетници са асоциации на MICB*002:01 алелната специфичност: C*12:03:01~MICB*002:01 (8%), следван от C*07:01:01~MICB*002:01 (7.5%). Не се установява наличие на неравновесна връзка в състава на хаплотипите.

Таблица 39. Най-често срещани C-MICA и C-MICB хаплотипи при здрави възрастни индивиди

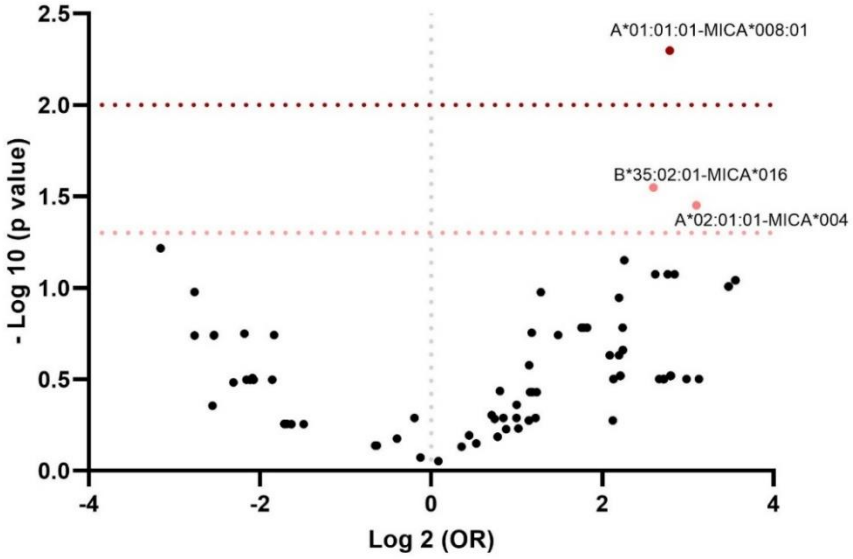
Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
C*04:01:01~MICA*016	**0,1**	**0,0183**	**5,356**	**8,0**	**10**
C*12:03:01~MICA*002:01	**0,075**	**0,0141**	**4,564**	**6,0**	**7,5**
C*06:02:01~MICA*008:01	**0,0625**	**0,0239**	**2,206**	**5,0**	**6,25**
C*07:01:01~MICA*018:01	**0,0625**	**0,0120**	**4,091**	**5,0**	**6,25**
C*15:02:01~MICA*009:01	**0,05**	**0,0088**	**3,927**	**4,0**	**5**
C*04:01:01~MICA*009:01	0,0375	0,0284	0,474	3,0	3,75
C*02:02:02~MICA*027	**0,0375**	**0,0028**	**5,842**	**3,0**	**3,75**
C*07:02:01~MICA*008:01	**0,0375**	**0,0106**	**2,320**	**3,0**	**3,75**
C*06:02:01~MICA*017	**0,0375**	**0,0056**	**3,791**	**3,0**	**3,75**
C*07:01:02~MICA*008:01	**0,0375**	**0,0106**	**2,320**	**3,0**	**3,75**
C*12:02:02~MICA*009:01	**0,0375**	**0,0066**	**3,405**	**3,0**	**3,75**
C*12:03:01~MICB*002:01	0,0875	0,0465	1,662	7,0	8,8
C*07:01:01~MICB*002:01	0,075	0,0511	0,920	6,0	7,5
C*04:01:01~MICB*005:02	0,0625	0,0458	0,680	5,0	6,3
C*15:02:01~MICB*002:01	**0,05**	**0,0186**	**2,041**	**4,0**	**5**
C*04:01:01~MICB*002:01	0,05	0,0604	-0,367	4,0	5
C*06:02:01~MICB*003	**0,0422**	**0,0058**	**4,277**	**3,4**	**4,2**
C*04:01:01~MICB*005:01	**0,0375**	**0,0083**	**2,845**	**3,0**	**3,8**
C*02:02:02~MICB*013	**0,0375**	**0,0038**	**4,843**	**3,0**	**3,8**
C*07:01:02~MICB*005:02	0,0375	0,0141	1,749	3,0	3,8
C*01:02:01~MICB*002:01	0,0375	0,0232	0,827	3,0	3,8
C*07:01:01~MICB*005:02	0,0375	0,0388	-0,057	3,0	3,8
C*02:02:02~MICB*005:02	0,0375	0,0212	0,994	3,0	3,8
C*12:02:02~MICB*005:03	**0,0375**	**0,0019**	**7,248**	**3,0**	**3,8**
C*06:02:01~MICB*004:01	0,0281	0,0101	1,595	2,2	2,8
C*06:02:01~MICB*005:02	0,0281	0,0317	-0,180	2,2	2,8

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

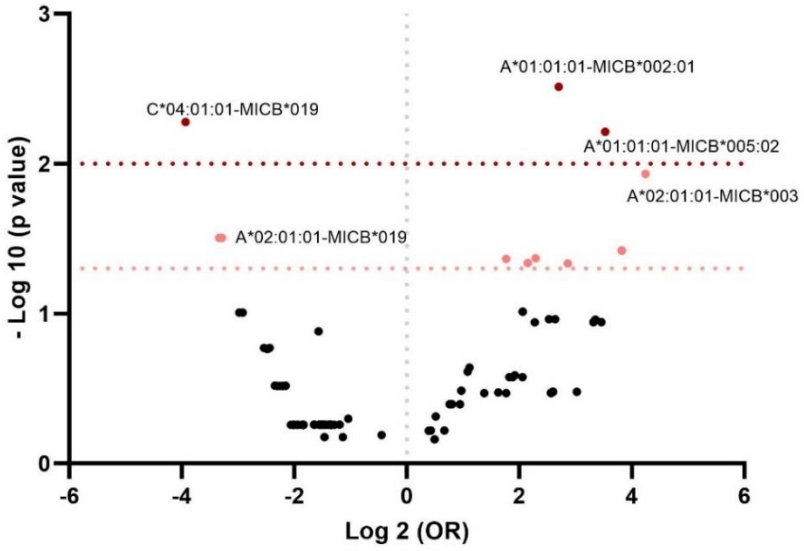
Сравнителен анализ на HLA клас I –MIC хаплотипните честоти при двете изследвани групи

Извършения сравнителен анализ на HLA-A-MIC хаплотипните честоти показва наличието на няколко статистически значими различия между двете изследвани групи (фигури 31 и 32). Силна позитивна асоциация с дълголетието ($p \leq 0.01$) е установена за следните хаплотипи: **A*01:01:01-MICA*008:01** (ХЧ стари: 0,0834, ХЧ млади: 0,013, P=0.005), **A*01:01:01-MICB*002:01** (ХЧ стари: 0.1213, ХЧ млади: 0.0208, P=0.003), **A*01:01:01-MICB*005:02** (ХЧ стари: 0.071, ХЧ млади: 0.0066, P=0.006) и **A*02:01:01-MICB*003** (ХЧ стари: 0.0513, ХЧ млади: 0, P=0.01). Повишена честота в изследваната

група от дълголетници се установява за HLA-A-MIC хаплотипи с гранични стойности на статистическа значимост ($0.05 \geq p \leq 0.01$): **A*02:01:01-MICA*004** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади: 0.0061, P=0.035) и **A*02:01:01-MICB*002:01** (ХЧ стари: 0.1128, ХЧ млади: 0.036, P=0.04). Негативна асоциация с дълголетието се установява за един от най-често срещаните при млади индивиди HLA-A-MICB хаплотипи: **A*02:01:01-MICB*019** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0557, P=0.03), който не се наблюдава в изследваната група от здрави възрастни индивиди. Статистическото значение на наблюдаваната разлика в хаплотипните честоти е с гранични стойности.



Фигура 31. Сравнителен анализ на HLA клас I - MICA дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*



Фигура 32. Сравнителен анализ на HLA клас I - MICB дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

За два HLA-B-MIC хаплотипа е установена положителна, статистически значима асоциация с дълголетието: **B*35:02:01-MICA*016** (ХЧ стари: 0.0625, ХЧ млади: 0.0109, P=0.03) и **B*51:01:01-MICB*002:01** (ХЧ стари: 0.0641, ХЧ млади: 0.0138, P=0.04). Най-често срещания при млади индивиди HLA-B-MICB хаплотип: **B*18:01:01-MICB*019** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0577, P=0.03), не се наблюдава при дълголетници, като разликата в хаплотипните честоти е статистически значима.

Не се установява силна, статистически значима разлика в HLA-C-MICA хаплотипните честоти при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. Два HLA-C-MICB хаплотипа, които се наблюдават и в двете изследвани групи са с гранични p стойности: **C*04:01:01-MICB*005:02** (ХЧ стари: 0.0625, ХЧ млади: 0.0148, P=0.046) и **C*15:02:01-MICB*002:01** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади: 0.0072, P=0.046). Три хаплотипа, установени само в изследваната група от възрастни индивиди са с гранични p стойности: **C*01:02:01-MICB*002:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.038), **C*02:02:02-MICB*013** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.04) и **C*07:01:02-MICB*005:02** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.038). Негативна асоциация със стареенето и с p стойност < 0.01, се установява за **C*04:01:01-MICB*019** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0839, P=0.005), който се наблюдава само в изследваната група от млади индивиди.

2. Асоциация на MIC и HLA клас II гените (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация и анализ на неравновесната скаченост между тях

2.1.Асоциация на MICA, MICB гените с HLA-DRB1 локуса

Установява се наличие на добре изразена неравновесна скаченост между MICA и DRB1 алелите влизащи в състава на най-често срещаните MICA-DRB1 хаплотипи при млади индивиди (таблица 40). Най-често представен е MICA*018:01~DRB1*11:04:01 хаплотипа (7%). Тенденциозно, при анализ на асоциацията между MICB и DRB1, се наблюдава по-малък процент на значима скаченост между алелите на отделните хаплотипи, в сравнение с MICA локуса. MICB*005:02~DRB1*16:01:01 (5.2%) е най-често срещания хаплотип в изследваната група, като значима неравновесна връзка между алелите в състава на хаплотипа не се наблюдава.

Таблица 40. Най-често срещани MIC-DRB1 хаплотипи при здрави млади индивиди

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
MICA*018:01~DRB1*11:04:01	**0,0703**	**0,0170**	**5,501**	**12,9**	**7,03**
MICA*018:01~DRB1*15:01:01	**0,0414**	**0,0093**	**4,506**	**7,6**	**4,14**
MICA*008:01~DRB1*03:01:01	**0,0412**	**0,0128**	**3,372**	**7,6**	**4,12**
MICA*009:01~DRB1*11:01:01	**0,0381**	**0,0128**	**3,017**	**7,0**	**3,81**
MICA*008:01~DRB1*07:01:01	**0,0353**	**0,0096**	**3,529**	**6,5**	**3,53**
MICA*009:01~DRB1*16:01:01	0,0271	0,0149	1,344	5,0	2,71
MICB*005:02~DRB1*16:01:01	0,0523	0,0309	1,495	8,2	5,2
MICB*018~DRB1*11:01:01	**0,0435**	**0,0138**	**3,146**	**6,8**	**4,4**
MICB*002:01~DRB1*13:01:01	**0,0415**	**0,0139**	**2,909**	**6,5**	**4,2**
MICB*019~DRB1*07:01:01	**0,0385**	**0,0096**	**3,668**	**6,0**	**3,9**
MICB*019~DRB1*03:01:01	0,0321	0,0139	1,921	5,0	3,2
MICB*005:02~DRB1*11:01:01	0,0305	0,0276	0,211	4,8	3,1
MICB*002:01~DRB1*16:01:01	0,0277	0,0220	0,478	4,3	2,8
MICB*002:01~DRB1*11:04:01	0,027	0,0208	0,531	4,2	2,7
MICB*005:02~DRB1*03:01:01	0,0263	0,0212	0,437	4,1	2,6
MICB*005:02~DRB1*11:04:01	0,0263	0,0293	-0,214	4,1	2,6
MICB*005:02~DRB1*13:01:01	0,0263	0,0195	0,600	4,1	2,6
MICB*019~DRB1*11:04:01	0,0256	0,0192	0,573	4,0	2,6

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана Хч, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

Най-често представените MICA-DRB1 хаплотипи при дълголетници (таблица 41) се характеризират с добре изразена неравновесна скаченост. MICA*008:01~DRB1*11:04:01 е най-често срещания хаплотип при дълголетници, като се наблюдава при 10% от изследваните индивиди. Най-представения MICB-DRB1 хаплотип е MICB*002:01~DRB1*11:04:01 (7.5%), следван от MICB*005:02~DRB1*11:01:01 (6.25%), като в състава на двата хаплотипа не се установява наличие на неравновесна връзка.

Таблица 41. Най-често срещани MIC-DRB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди

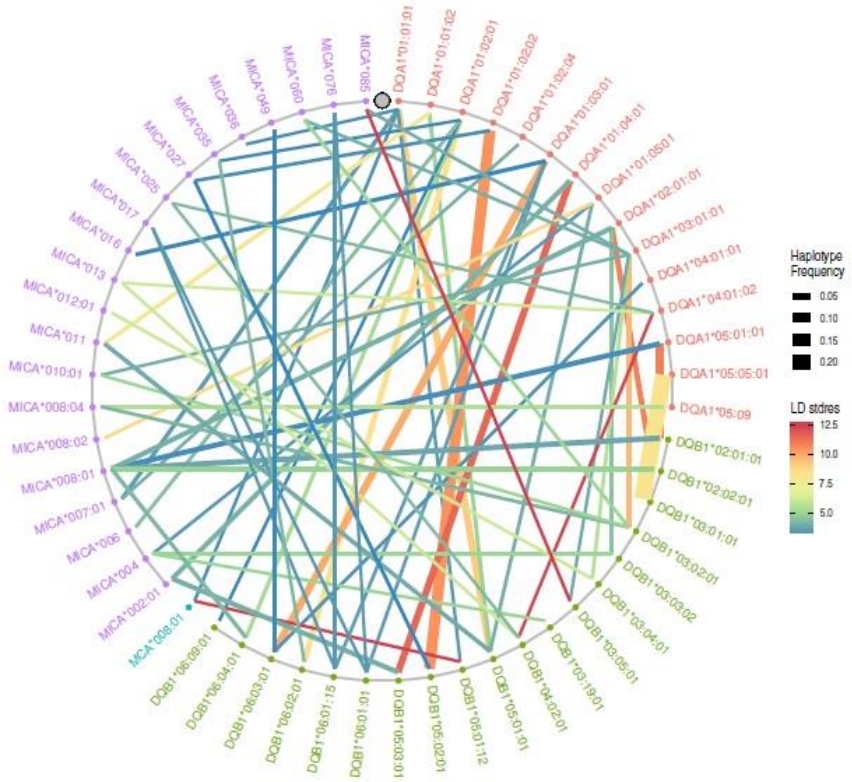
Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
MICA*008:01~DRB1*11:04:01	**0,1**	**0,0292**	**3,649**	**8,0**	**10**
MICA*008:01~DRB1*13:01:01	**0,05**	**0,0133**	**2,831**	**4,0**	**5**
MICA*016~DRB1*04:01:01	**0,0375**	**0,0056**	**3,791**	**3,0**	**3,75**
MICA*018:01~DRB1*11:01:01	**0,0375**	**0,0109**	**2,259**	**3,0**	**3,75**
MICA*016~DRB1*14:01:01	**0,0375**	**0,0042**	**4,573**	**3,0**	**3,75**
MICA*009:01~DRB1*15:02:01	**0,0375**	**0,0066**	**3,405**	**3,0**	**3,75**
MICB*002:01~DRB1*11:04:01	0,075	0,0511	0,920	6,0	7,5
MICB*005:02~DRB1*11:01:01	0,0625	0,0353	1,274	5,0	6,25
MICB*002:01~DRB1*03:01:01	**0,05**	**0,0186**	**2,041**	**4,0**	**5**
MICB*005:02~DRB1*07:01:01	0,05	0,0247	1,423	4,0	5
MICB*002:01~DRB1*01:01:01	0,0375	0,0279	0,508	3,0	3,75
MICB*005:02~DRB1*01:01:01	0,0375	0,0212	0,994	3,0	3,75
MICB*002:01~DRB1*16:01:01	0,0375	0,0279	0,508	3,0	3,75
MICB*004:01~DRB1*11:04:01	**0,0375**	**0,0123**	**2,014**	**3,0**	**3,75**
MICB*005:02~DRB1*16:01:01	0,0375	0,0212	0,994	3,0	3,75
MICB*002:01~DRB1*11:01:01	0,0375	0,0465	-0,364	3,0	3,75
MICB*005:03~DRB1*15:02:01	**0,0375**	**0,0019**	**7,248**	**3,0**	**3,75**
MICB*005:02~DRB1*13:01:01	0,0313	0,0176	0,913	2,5	3,13

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

2.2.Асоциация на MICA, MICB гените с HLA-DQA1 и -DQB1 локусите

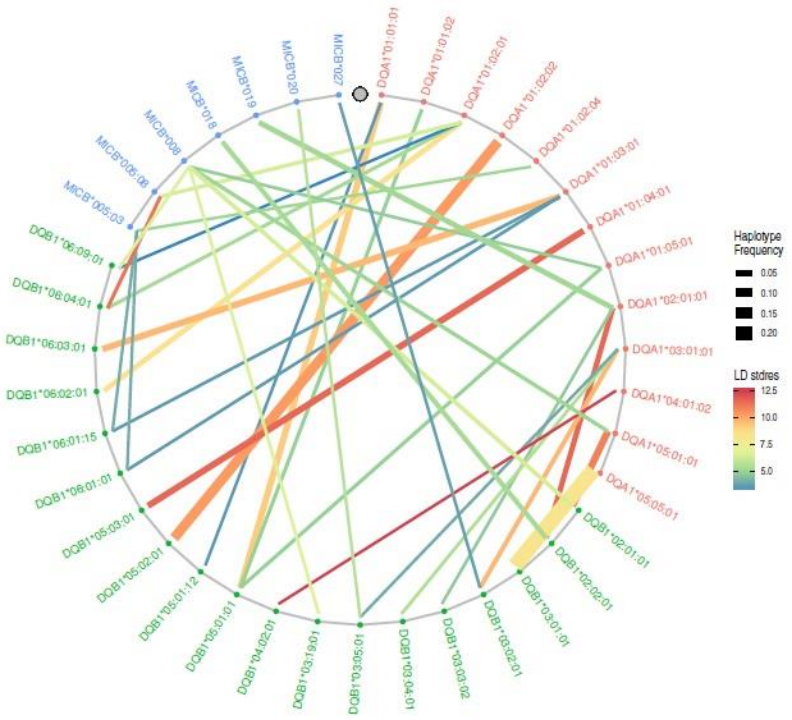
При здрави, млади индивиди от българската популация най-често срещаните MIC-DQA1 хаплотипи са MICA*018:01~DQA1*05:05:01 (7.1%) и MICB*005:02~DQA1*01:02:02 (6.5%), като и двата хаплотипа се намират в значима неравновесна скаченост. Значителен процент (66.6%) от наблюдаваните при млади индивиди MICA-DQA1 хаплотипи (ХЧ > 1%) се намират в значима скаченост, като

най-силно тази асоциация се наблюдава за MICA*011~DQA1*01:01:02 хаплотипа (стандартизиран остатък = 8.024). От извършения анализ се установява наличие на добре изразена асоциация между MICA и DQB1 локусите, като 55.5% от реалните хаплотипи с честота над 1%, се намират в значима неравновесна скаченост (фигура 33).



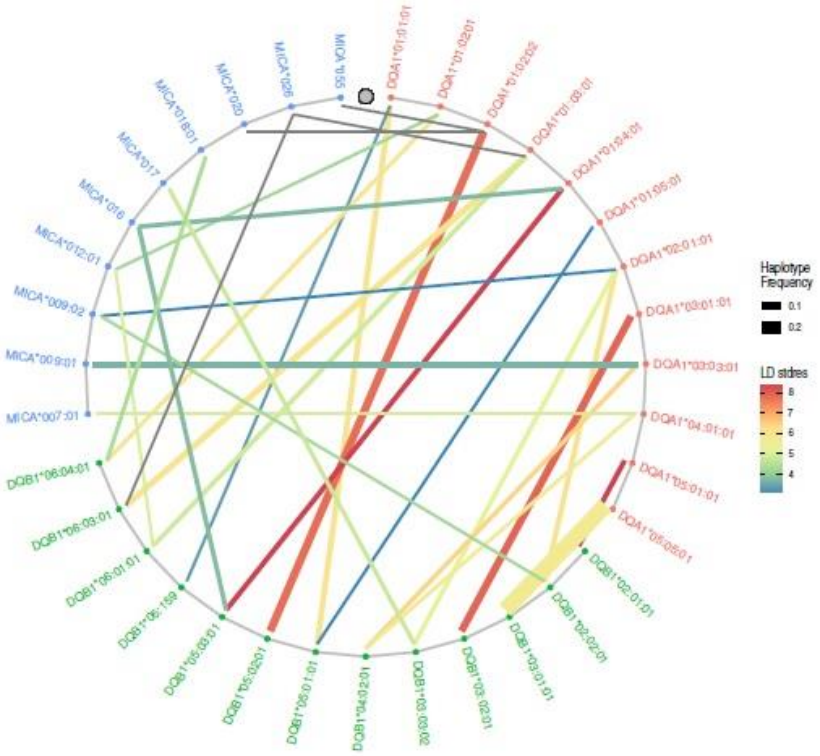
Фигура 33. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на MICA и HLA-DQA1, -DQB1 локусите при млади индивиди. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

За асоциацията на MICB локуса с всеки от HLA-DQA1 и DQB1 локусите, този процент е по-нисък: съответно 36.6% и 30.4%, като на фигура 34 са представени тези от тях, които се отличават с добре изразена неравновесна връзка (стандартизиран остатък > 3). Най често срещаните MICB-DQB1 хаплотипи при млади индивиди са както следва: MICB*005:02~DQB1*03:01:01 (7.8%), MICB*019~DQB1*03:01:01 (7.2%) и MICB*005:02~DQB1*05:02:01 (6.9%), в състава на които не се установява значима скаченост.



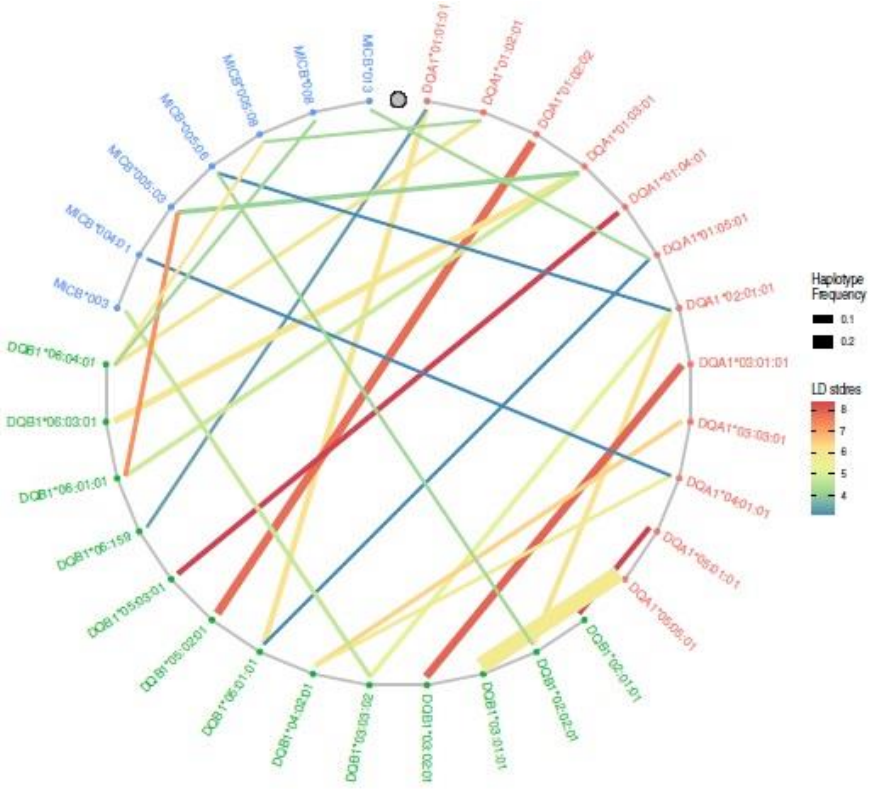
Фигура 34. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на MICB и HLA-DQA1, -DQB1 локусите при млади индивиди. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

При дълголетници най-често представен е MICA*008:01~DQA1*05:05:01 (12.2%) хаплотип, следван от MICA*018:01~DQA1*05:05:01 (5%) и MICA*002:01~DQA1*05:05:01 (4.6%). От изброените хаплотипи, само в състава на MICA*008:01~DQA1*05:05:01 се установява наличие на неравновесна скаченост. . Асоциацията на MICA с HLA-DQA1 локуса е слабо представена при възрастни (фигура 35), като реални MICA-DQA1, за които се установява наличие на неравновесна връзка, отговарят на 36.8% от хаплотипите наблюдавани с честота по-голяма от 1% . Противоположно на наблюденията установени при млади индивиди, където асоциацията на MIC гените е по-добре представена с HLA-DQA1 локуса в сравнение с -DQB1, при здрави възрастни, се наблюдава по-голям процент хаплотипи намиращи се в скаченост при асоциацията на MICA и HLA-DQB1 с 43.2% от хаплотипите (ХЧ >1%) намиращи се в значима скаченост (фигура 35).



Фигура 35. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на MICA и HLA-DQA1, -DQB1 локусите при дълголетници. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

От своя страна MICB*002:01~DQA1*05:05:01 (14.6%), е най-често срещания MICB-DQA1 хаплотип при дълголетници, следван от MICB*005:02~DQA1*05:05:01 (8.5%) и MICB*002:01~DQA1*01:02:02 (6.4%). В състава на нито един от изброените три най-често срещани MICB-DQA1 хаплотипи не се установява наличие на значима неравновесна връзка. Прави впечатление, че при здрави възрастни индивиди най-често представените MIC-DQA1 хаплотипи, представляват асоциации на HLA-DQA1*05:05:01 алелната специфичност. Реални MICB-DQA1 и MICB-DQB1 хаплотипи, за които се установява наличие на неравновесна връзка, отговарят съответно на 39.2% и 37% от хаплотипите наблюдавани с честота по-голяма от 1% при дълголетници (фигура 36).



Фигура 36. Кръгова диаграмата представяща асоциациите на MICB и HLA-DQA1, -DQB1 локусите при дълголетници. *Представени са асоциации, които се намират в значима неравновесна скаченост (stdres > 3) и се наблюдават с честота по-голяма от 1%. Ширината на ивицата свързваща два алела отговаря на честотата, с която се наблюдава съответния хаплотип, а нейния цвят – на силата на неравновесна скаченост.*

2.3.Асоциация на MICA, MICB гените с HLA-DPB1 локуса

Въпреки голямото физическо разстояние делящо MICA и MICB гените от HLA-DPB1 локуса, 48% от реалните MICA-DPB1 и 43.5% от MICB-DPB1 хаплотипи (ХЧ > 1%), се намират в значима неравновесна връзка при млади индивиди. Въпреки тези сравнително високи проценти, най-често представените MICB-DPB1 хаплотипи при млади индивиди (таблица 42), не са скачени. За двата най-често представени MICA*008:01-DBP1*04:01:01 (8.4%) и MICA*002:01-DPB1*02:01:02 (5.3%) хаплотипи при млади индивиди от българската популация се установява наличие на неравновесна скаченост.

Таблица 42. Най-често срещани MIC-DPB1 хаплотипи при здрави млади индивиди

Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
MICA*008:01~DPB1*04:01:01	**0,0838**	**0,0463**	**2,312**	**15,4**	**8,4**
MICA*002:01~DPB1*02:01:02	**0,0529**	**0,0197**	**3,184**	**9,7**	**5,3**
MICA*018:01~DPB1*04:02:01	0,046	0,0275	1,492	8,5	4,6

MICA*016~DPB1*04:01:01	**0,0444**	**0,0196**	**2,383**	**8,2**	**4,4**
MICA*009:01~DPB1*02:01:02	0,0443	0,0238	1,779	8,2	4,4
MICA*008:01~DPB1*04:02:01	0,0387	0,0286	0,799	7,1	3,9
MICA*018:01~DPB1*02:01:02	0,0309	0,0259	0,417	5,7	3,1
MICA*009:01~DPB1*04:02:01	0,027	0,0253	0,143	5,0	2,7
MICB*005:02~DPB1*04:01:01	0,0984	0,0722	1,174	15,4	9,8
MICB*019~DPB1*04:01:01	0,0758	0,0473	1,598	11,8	7,6
MICB*005:02~DPB1*04:02:01	0,0698	0,0516	0,977	10,9	7,0
MICB*005:02~DPB1*02:01:02	0,0564	0,0464	0,567	8,8	5,6
MICB*002:01~DPB1*02:01:02	0,0562	0,0330	1,572	8,8	5,6
MICB*018~DPB1*02:01:02	0,0465	0,0231	1,903	7,3	4,7
MICB*004:01~DPB1*04:02:01	0,0345	0,0190	1,397	5,4	3,5
MICB*002:01~DPB1*04:01:01	0,0319	0,0513	-1,042	5,0	3,2
MICB*002:01~DPB1*04:02:01	0,0281	0,0366	-0,547	4,4	2,8
MICB*018~DPB1*04:01:01	0,0269	0,0359	-0,583	4,2	2,7

ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота > 2.5%.

При дълголетници, най-често срещаните MIC-DPB1 хаплотипи са представени в таблица 43. Най-силна неравновесна връзка, изразяваща се с най-високи стойности на стандартизираните остатъци се установява за асоциации на MICA и MICB алелни специфичности с HLA-DPB1*104:01 алела, който е част от HLA-DPB1*03:01:01G групата: MICA*009:02~DPB1*104:01 (стн. ост. 8.832) и MICB*005:06~DPB1*104:01 (стн. ост. 8.725). И двата хаплотипа се преброяват по един път в изследваната група дълголетници от българската популация.

Таблица 43. Най-често срещани MIC-DPB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди

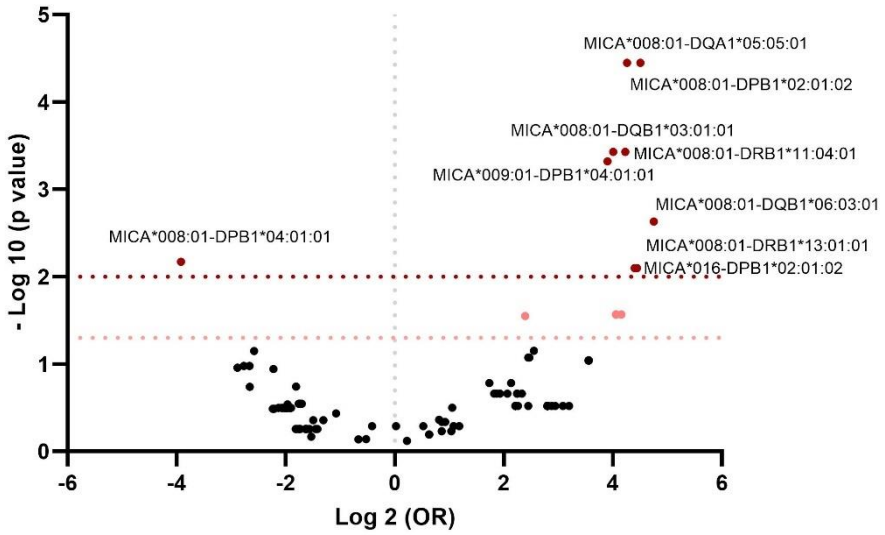
Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
MICA*008:01~DPB1*02:01:02	0,1189	0,0664	1,760	9,5	11,9
MICA*009:01~DPB1*04:01:01	0,111	0,0591	1,854	8,9	11,1
MICA*002:01~DPB1*04:01:01	0,0612	0,0380	1,046	4,9	6,1
MICA*016~DPB1*04:01:01	0,0515	0,0380	0,609	4,1	5,2
MICA*009:01~DPB1*04:02:01	0,05	0,0241	1,477	4	5,0
MICA*016~DPB1*02:01:02	0,0485	0,0352	0,625	3,9	4,9
MICA*018:01~DPB1*04:02:01	**0,0431**	**0,0120**	**2,518**	**3,4**	**4,3**
MICA*008:01~DPB1*04:02:01	0,0377	0,0292	0,437	3,0	3,8
MICA*004~DPB1*04:01:01	0,0375	0,0211	1,000	3	3,8
MICA*018:01~DPB1*02:01:02	0,0306	0,0273	0,174	2,4	3,1
MICA*008:01~DPB1*03:01:01	0,029	0,0133	1,212	2,3	2,9
MICB*005:02~DPB1*04:01:01	0,1649	0,0952	1,922	13,2	16,5
MICB*002:01~DPB1*04:02:01	**0,125**	**0,0511**	**2,847**	**10,0**	**12,5**
MICB*002:01~DPB1*04:01:01	0,1074	0,1255	-0,427	8,6	10,7

MICB*005:02~DPB1*02:01:02	0,089	0,0882	0,024	7,1	8,9
MICB*002:01~DPB1*02:01:02	0,0841	0,1162	-0,792	6,7	8,4
MICB*005:01~DPB1*02:01:02	0,0375	0,0160	1,504	3,0	3,8
MICB*004:01~DPB1*02:01:02	0,0307	0,0280	0,141	2,5	3,1
MICB*002:01~DPB1*03:01:01	0,025	0,0232	0,102	2,0	2,5

ХЧ, халотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената халотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана халотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени халотипи с честота > 2.5%.

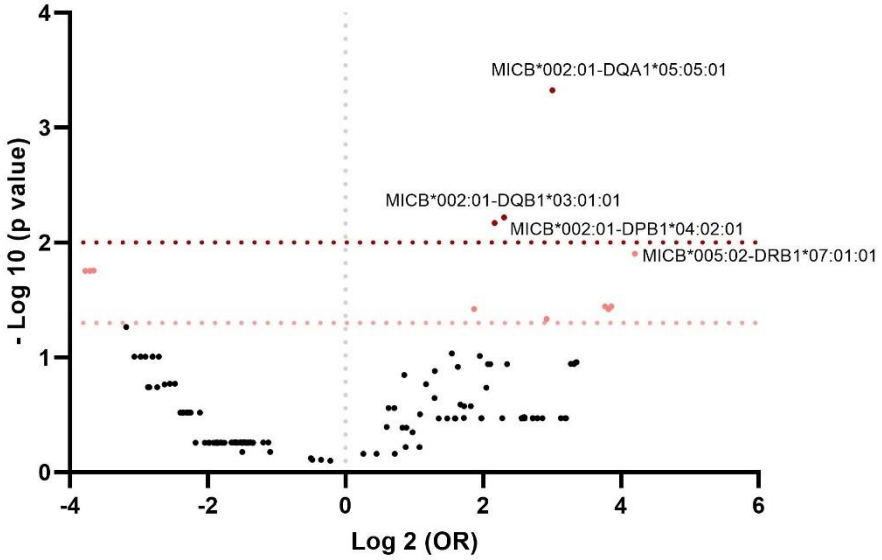
3. Сравнителен анализ на MIC – HLA клас II халотипните честоти при двете изследвани групи

Положителна асоциация със стареенето е установена, за най-често представения при дълголетници халотип **MICA*008:01-DRB1*11:04:01** (ХЧ стари: 0.1, ХЧ млади: 0.0059, P=0.0004) (фигура 37). MICA-DRB1 халотипи, които не се наблюдават при млади индивиди и за които се установяват статистически значими разлики в халотипните честоти, някой от тях с гранични стойности на значимост, са както следва: **MICA*008:01-DRB1*13:01:01** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади:0, P=0.008), **MICA*016-DRB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03), **MICA*009:01-DRB1*15:02:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади:0, P=0.03) и **MICA*018:01-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03) (фигура 37).



Фигура 37. Сравнителен анализ на MICA - HLA клас II дву-локусните халотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

Три MICB-DRB1 хаплотипа се наблюдават със статистически значима повишена честота при възрастни индивиди (фигура 38): **MICB*005:02-DRB1*07:01:01** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади:0, P=0.01), **MICB*002:01-DRB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади: 0.0069, P=0.05) и **MICB*002:01-DRB1*11:01:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.04).



Фигура 38. Сравнителен анализ на MICB - HLA клас II дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

Анализ на MIC-DQA1 хаплотипното разпределени показа много силно изразена, статистически значима повишена честота на най-често срещаните при дълголетници MICA-DQA1 и MICB-DQA1 хаплотип: **MICA*008:01-DQA1*05:05:01** (ХЧ стари: 0.1221, ХЧ млади: 0.0061, P=0,00004) и **MICB*002:01-DQA1*05:05:01** (ХЧ стари: 0.1456, ХЧ млади: 0.0208, P=0,0005). Допълнително положителна асоциация със стареенето е установена за три MICA-DQA1 и два MICB-DQA1 хаплотипа, които не се срещат в изследваната група от млади индивиди: **MICA*009:01-DQA1*01:03:01** (ХЧ стари: 0.0404, ХЧ млади: 0, P=0.03), **MICA*009:01-DQA1*03:03:01** (ХЧ стари: 0.0404, ХЧ млади: 0, P=0.03), **MICA*016-DQA1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03), **MICB*005:02-DQA1*02:01:01** (ХЧ стари: 0.0359, ХЧ млади: 0, P=0.04) и **MICB*005:03-DQA1*01:03:01** (ХЧ стари: 0.0385, ХЧ млади: 0, P=0.04).

Силно изразена, статистически значима разлика в хаплотипните честоти се наблюдава за три от най-представените MIC-DQB1 хаплотипи: **MICA*008:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.0978, ХЧ млади: 0,0067, P=0.0004), **MICA*008:01-DQB1*06:03:01** (ХЧ стари: 0.0625, ХЧ млади: 0, P=0.002) и **MICB*002:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.1396, ХЧ млади: 0.0349, P=0.007). Положителна асоциация със стареенето е установена и за следните хаплотипи, които не се срещат при здрави, млади индивиди: **MICA*009:01-DQB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03), **MICA*016-DQB1*03:02:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03) и **MICB*005:02-DQB1*02:02:01** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.04). Негативна асоциация с дълголетието е установена за един от най-често срещаните MICB-DQB1 хаплотипи при млади: **MICB*019-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0723, P=0.02).

При извършения сравнителен анализ на MICA-DPB1 хаплотипните честоти са установени няколко хаплотипа със статистически значима повишена честота при здрави, възрастни индивиди и стойности на $p < 0.01$: **MICA*008:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.1189, ХЧ млади: 0,007, P=0.00004), **MICA*009:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.111, ХЧ млади: 0.0083, P=0.0005) и **MICA*016-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0485, ХЧ млади: 0, P=0.008). Негативна асоциация с дълголетието се наблюдава за най-често срещания MICA-DPB1 хаплотип при млади: **MICA*008:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0838, P=0.007). MICB-DPB1 хаплотипи наблюдавани със статистически значима повишена честота при възрастни са: **MICB*002:01-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0.1074, ХЧ млади: 0.0319, P=0.04), **MICB*002:01-DPB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0.125, ХЧ млади: 0.0281, P=0.006) и **MICB*005:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.04). Негативна асоциация със стареенето се наблюдава за двата най-представени MICB-DPB1 хаплотипа в изследваната група от млади индивиди: **MICB*005:02-DPB1*04:02:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0698, P=0.02) и **MICB*019-DPB1*04:01:01** (ХЧ стари: 0, ХЧ млади: 0.0758, P=0.02).

4. Установяване определени модели на асоциация между MIC и HLA клас II гените при дълголетници от българската популация

Голяма част от най-често представените асоциации на MICA с HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1 локусите при възрастни индивиди (ХЧ > 2%) не се наблюдават при млади

индивиди или в състава им не се установява наличие на неравновесна връзка (фигура 39).



Възрастни	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*004	MICA*027
DRB1*01:01:01			0,921					1,732	
DRB1*03:01:01		2,304							
DRB1*04:01:01				3,791					
DRB1*04:10:01			2,783						
DRB1*07:01:01			0,695			2,783			
DRB1*11:01:01		0,819			2,259		2,115		
DRB1*11:04:01	3,649								
DRB1*13:01:01	2,831								
DRB1*13:02:01					4,358				
DRB1*14:01:01				4,573					
DRB1*15:02:01			3,405						
DRB1*16:01:01	0,637								
DRB1*16:02:01									5,623

Млади	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*004	MICA*027
DRB1*01:01:01			-0,314					-	
DRB1*03:01:01		-							
DRB1*04:01:01				-					
DRB1*04:10:01			-						
DRB1*07:01:01			-			-			
DRB1*11:01:01		-			-		-		
DRB1*11:04:01	-1,190								
DRB1*13:01:01	-								
DRB1*13:02:01					-				
DRB1*14:01:01				2,029					
DRB1*15:02:01			-						
DRB1*16:01:01	-1,000								
DRB1*16:02:01									5,188

Възрастни	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*012:03	MICA*027
DQB1*03:01:01	1,167	1,376	-0,570		0,613		0,725	1,801	
DQB1*03:02:01		1,153		2,201		2,523			
DQB1*03:03:02						4,772			
DQB1*04:02:01			2,737						
DQB1*05:01:01			2,488						
DQB1*05:02:01	0,063		0,335						2,856
DQB1*05:03:01				3,791					
DQB1*06:01:01			2,029						
DQB1*06:03:01	2,853								
DQB1*06:04:01					4,358				

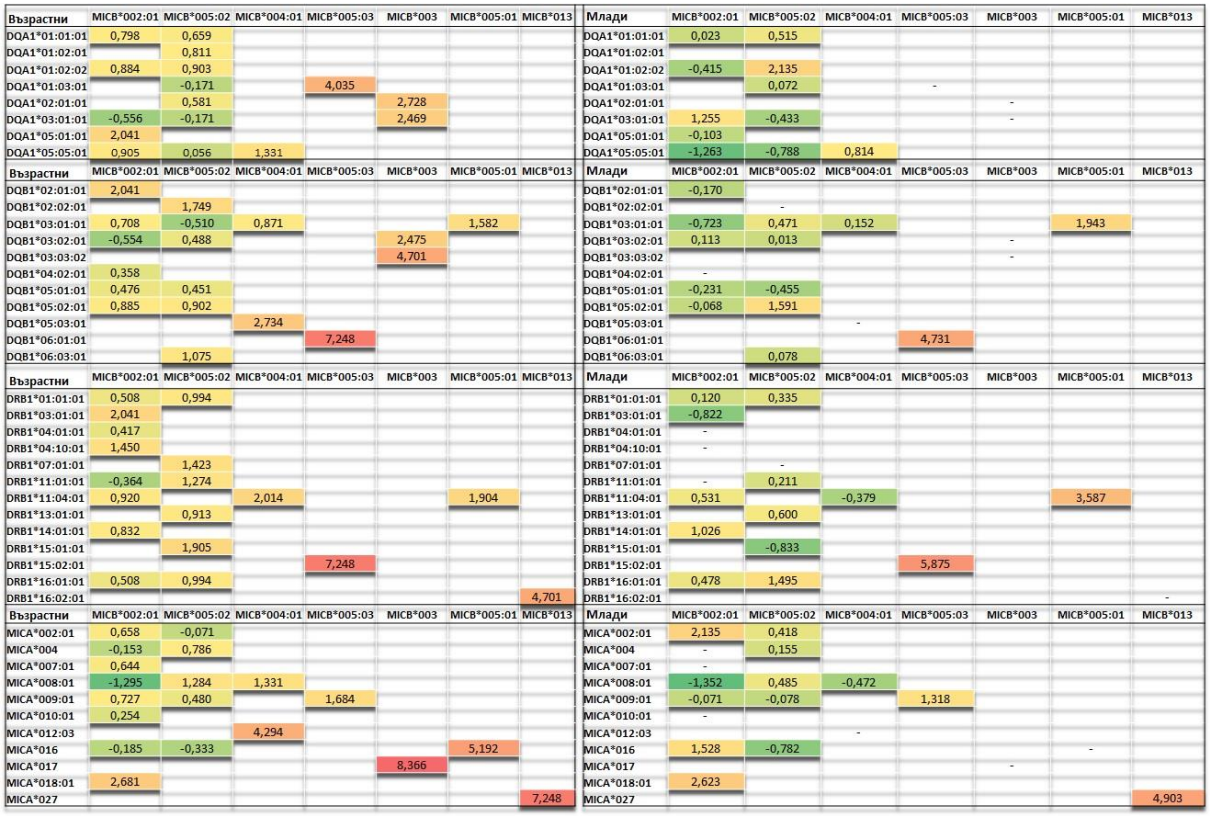
Млади	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*012:03	MICA*027
DQB1*03:01:01	-2,135	0,271	1,129		2,751		-	-	
DQB1*03:02:01		-		-		-			
DQB1*03:03:02						-			
DQB1*04:02:01			-						
DQB1*05:01:01			-0,434						
DQB1*05:02:01	-1,388		1,882						3,693
DQB1*05:03:01				0,528					
DQB1*06:01:01			-						
DQB1*06:03:01	-								
DQB1*06:04:01					-				

Възрастни	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*012:03	MICA*027
DQA1*01:01:01			1,029						
DQA1*01:02:01					2,732				
DQA1*01:02:02			0,418						2,805
DQA1*01:03:01	1,078		1,485						
DQA1*01:04:01				3,725					
DQA1*02:01:01						2,734			
DQA1*03:01:01		1,114		2,149		2,475			
DQA1*03:03:01			3,656						
DQA1*05:05:01	2,056	0,610			1,330		0,750	1,829	

Млади	MICA*008:01	MICA*002:01	MICA*009:01	MICA*016	MICA*018:01	MICA*017	MICA*010:01	MICA*012:03	MICA*027
DQA1*01:01:01			0,459						
DQA1*01:02:01					2,415				
DQA1*01:02:02			1,643						3,972
DQA1*01:03:01	-0,075		-						
DQA1*01:04:01				0,537					
DQA1*02:01:01						-			
DQA1*03:01:01		0,078		-		-			
DQA1*03:03:01			-						
DQA1*05:05:01	-2,072	-0,008			2,642		-	-	

Фигура 39. Сравнителен анализ (възрастни и млади) на силата на неравновесната скаченост за най-често представените MICA-DRB1, -DQB1 и -DQA1 хаплотипи при дълголетници от българската популация. *Представени са стойностите на стандартизирани остатъци (std res) изчислени за всяка двойка алели.*

При сравнение силата на неравновесна скаченост за най-често представените MICB-класически HLA клас II хаплотипи при дълголетници (ХЧ>2%) със скачеността наблюдавана за същите хаплотипи при млади индивиди (фигура 40), съществена разлика не се установява между двете групи. Прави впечатление, че при дълголетници по-голяма част от най-често представените хаплотипи, представляват асоциации именно на MICB*002:01 и MIC*005:02 алелните специфичности.



Възрастни	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DQA1*01:01:01	0,798	0,659					
DQA1*01:02:01		0,811					
DQA1*01:02:02	0,884	0,903					
DQA1*01:03:01		-0,171		4,035			
DQA1*02:01:01		0,581			2,728		
DQA1*03:01:01	-0,556	-0,171			2,469		
DQA1*05:01:01	2,041						
DQA1*05:05:01	0,905	0,056	1,331				

Млади	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DQA1*01:01:01	0,023	0,515					
DQA1*01:02:01							
DQA1*01:02:02	-0,415	2,135					
DQA1*01:03:01		0,072		-			
DQA1*02:01:01					-		
DQA1*03:01:01	1,255	-0,433			-		
DQA1*05:01:01	-0,103						
DQA1*05:05:01	-1,263	-0,788	0,814				

Възрастни	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DQB1*02:01:01	2,041						
DQB1*02:02:01		1,749					
DQB1*03:01:01	0,708	-0,510	0,871			1,582	
DQB1*03:02:01	-0,554	0,488			2,475		
DQB1*03:03:02					4,701		
DQB1*04:02:01	0,358						
DQB1*05:01:01	0,476	0,451					
DQB1*05:02:01	0,885	0,902					
DQB1*05:03:01			2,734				
DQB1*06:01:01				7,248			
DQB1*06:03:01		1,075					

Млади	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DQB1*02:01:01	-0,170						
DQB1*02:02:01		-					
DQB1*03:01:01	-0,723	0,471	0,152			1,943	
DQB1*03:02:01	0,113	0,013			-		
DQB1*03:03:02					-		
DQB1*04:02:01	-						
DQB1*05:01:01	-0,231	-0,455					
DQB1*05:02:01	-0,068	1,591					
DQB1*05:03:01			-				
DQB1*06:01:01				4,731			
DQB1*06:03:01		0,078					

Възрастни	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DRB1*01:01:01	0,508	0,994					
DRB1*03:01:01	2,041						
DRB1*04:01:01	0,417						
DRB1*04:10:01	1,450						
DRB1*07:01:01		1,423					
DRB1*11:01:01	-0,364	1,274					
DRB1*11:04:01	0,920		2,014			1,904	
DRB1*13:01:01		0,913					
DRB1*14:01:01	0,832						
DRB1*15:01:01		1,905					
DRB1*15:02:01				7,248			
DRB1*16:01:01	0,508	0,994					
DRB1*16:02:01							4,701

Млади	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
DRB1*01:01:01	0,120	0,335					
DRB1*03:01:01	-0,822						
DRB1*04:01:01	-						
DRB1*04:10:01	-						
DRB1*07:01:01		-					
DRB1*11:01:01	-	0,211					
DRB1*11:04:01	0,531		-0,379			3,587	
DRB1*13:01:01		0,600					
DRB1*14:01:01	1,026						
DRB1*15:01:01		-0,833					
DRB1*15:02:01				5,875			
DRB1*16:01:01	0,478	1,495					
DRB1*16:02:01							-

Възрастни	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
MICA*002:01	0,658	-0,071					
MICA*004	-0,153	0,786					
MICA*007:01	0,644						
MICA*008:01	-1,295	1,284	1,331				
MICA*009:01	0,727	0,480		1,684			
MICA*010:01	0,254						
MICA*012:03			4,294				
MICA*016	-0,185	-0,333				5,192	
MICA*017					8,366		
MICA*018:01	2,681						
MICA*027							7,248

Млади	MICB*002:01	MICB*005:02	MICB*004:01	MICB*005:03	MICB*003	MICB*005:01	MICB*013
MICA*002:01	2,135	0,418					
MICA*004	-	0,155					
MICA*007:01	-						
MICA*008:01	-1,352	0,485	-0,472				
MICA*009:01	-0,071	-0,078		1,318			
MICA*010:01	-						
MICA*012:03			-				
MICA*016	1,528	-0,782				-	
MICA*017					-		
MICA*018:01	2,623						
MICA*027							4,903

Фигура 40. Сравнителен анализ (възрастни и млади) на силата на неравновесната скаченост за най-често представените MICB-MICA, -DRB1, -DQB1 и -DQA1 хаплотипи при дълголетници от българската популация. *Представени са стойностите на стандартизирани остатъци (std res) изчислени за всяка двойка алели.*

III. Разгърнати MIC – класически HLA клас I и клас II хаплотипи при дълголетници и млади индивиди от българската популация

При млади индивиди от българската популация един HLA-B-MICA-DRB1 хаплотип се отличава с най-висока честота на срещане: HLA-B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*11:04:01 (5.2%) (таблица 44). При дълголетници обаче не може да се изведе конкретен хаплотип като най-често представен за групата, тъй като пет хаплотипа са установени с една и съща хаплотипна честота (таблица 45). Интересно е наблюдението, че най-често срещаните HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипи при млади индивиди и при възрастни, са уникални за всяка от изследваните групи и не се срещат в другата група.

1. HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипи

Таблица 44. Най-често срещани HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Хаплотип	ХЧ	СО	БРОЙ	%
B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*11:04:01	0,0517	0,016	9,5	5,2
B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*15:01:01	0,0298	0,014	5,5	3,0
B*13:02:01-MICA*008:01-DRB1*07:01:01	0,0272	0,012	5,0	2,7
B*35:01:01-MICA*002:01-DRB1*01:01:01	0,0272	0,011	5,0	2,7
B*51:01:01-MICA*009:01-DRB1*11:01:01	0,0272	0,014	5,0	2,7

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи с честота над 2%.

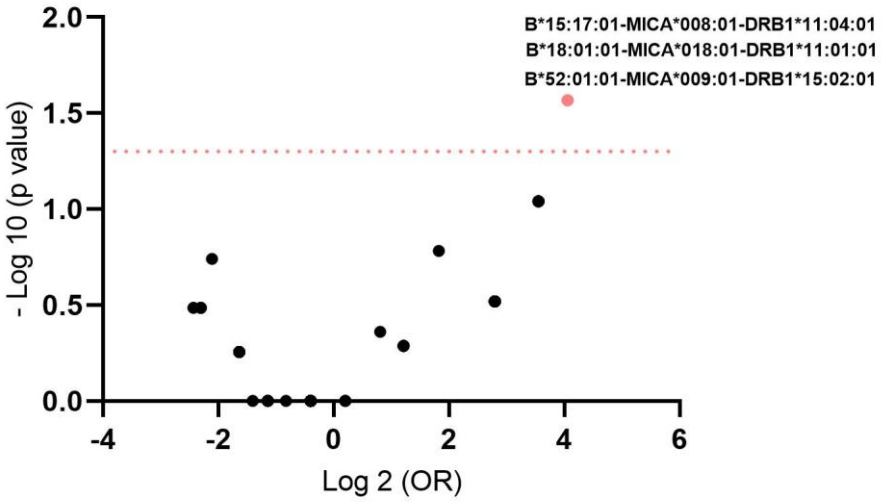
Таблица 45. Най-често срещани HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	ХЧ	СО	БРОЙ	%
B*08:01:01-MICA*008:01-DRB1*03:01:01	0,038	0,023	3,0	3,75
B*15:17:01-MICA*008:01-DRB1*11:04:01	0,038	0,020	3,0	3,75
B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*11:01:01	0,038	0,021	3,0	3,75
B*35:02:01-MICA*016-DRB1*11:04:01	0,038	0,022	3,0	3,75
B*52:01:01-MICA*009:01-DRB1*15:02:01	0,038	0,023	3,0	3,75
B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*13:02:01	0,025	0,019	2,0	2,5
B*35:01:01-MICA*009:01-DRB1*01:01:01	0,025	0,019	2,0	2,5
B*35:03:01-MICA*009:01-DRB1*16:01:01	0,025	0,017	2,0	2,5
B*38:01:01-MICA*002:01-DRB1*04:02:01	0,025	0,020	2,0	2,5
B*40:02:01-MICA*027-DRB1*16:02:01	0,025	0,017	2,0	2,5
B*51:01:01-MICA*009:01-DRB1*04:10:01	0,025	0,019	2,0	2,5
B*57:01:01-MICA*017-DRB1*07:01:01	0,025	0,021	2,0	2,5

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи с честота над 2%.

Сравнителен анализ на HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипните честоти в двете изследвани групи

При извършения сравнителен анализ три HLA-B-MICA хаплотипа (фигура 41), които не се наблюдават в изследваната група от млади индивиди, се открояват със значителна повишена честота при здрави възрастни индивиди от българската популация: HLA-B*15:17:01-MICA*008:01-DRB1*11:04:01 (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P= 0.027), -B*18:01:01-MICA*018:01-DRB1*11:01:01 (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P= 0.027) и -B*52:01:01-MICA*009:01-DRB1*15:02:01 (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P= 0.027).



Фигура 41. Сравнителен анализ на HLA-B-MICA-DRB1 хаплотипно разпределение при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Прекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05*

2. HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи

Най-представените HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи при млади индивиди са представени в таблица 46. Представените хаплотипни асоциации са уникални за изследваната група от млади индивиди и не се наблюдават сред най-представените хаплотипи при дълголетници (таблица 47). Пет хаплотипа в групата се открояват с еднакво висока хаплотипна честота.

Таблица 46. Най-често срещани C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

Хаплотип	ХЧ	СО	БРОЙ	%
C*04:01:01-B*35:01:01-MICA*002:01-MICB*019-DRB1*01:01:01	0,0163	0,0110	3	1,63
C*06:02:01-B*13:02:01-MICA*008:01-MICB*018-DRB1*07:01:01	0,0163	0,0106	3	1,63
C*07:01:01-B*18:01:01-MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01	0,0163	0,0095	3	1,63
C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*005:08-DRB1*13:02:01	0,0163	0,0111	3	1,63
C*08:02:01-B*14:02:01-MICA*011-MICB*005:02-DRB1*01:02:01	0,0163	0,0109	3	1,63
C*02:02:02-B*44:05:01-MICA*008:01-MICB*005:02-DRB1*16:01:01	0,01087	0,0084	2	1,09

C*04:01:01-B*35:01:01-MICA*016-MICB*002:01-DRB1*13:01:01	0,01087	0,0095	2	1,09
C*12:03:01-B*18:01:01-MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*15:01:01	0,01087	0,0091	2	1,09
C*12:03:01-B*18:01:01-MICA*018:01-MICB*018-DRB1*15:01:01	0,01087	0,0090	2	1,09
C*12:03:01-B*35:03:01-MICA*002:01-MICB*005:02-DRB1*14:54:01	0,01087	0,0089	2	1,09
C*16:04:01-B*44:02:01-MICA*018:01-MICB*004:01-DRB1*11:04:01	0,01087	0,0096	2	1,09

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

Три HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипа са най-представени в изследваната група от здрави дълголетници от българската популация.

Таблица 47. **Най-често срещани C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация**

Хаплотип	ХЧ	СО	БРОЙ	%
C*04:01:01-B*35:02:01-MICA*016-MICB*005:01-DRB1*11:04:01	0,038	0,0215	3,0	3,75
C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01	0,038	0,0211	3,0	3,75
C*12:02:02-B*52:01:01-MICA*009:01-MICB*005:03-DRB1*15:02:01	0,038	0,022	3,0	3,75
C*02:02:02-B*40:02:01-MICA*027-MICB*013-DRB1*16:02:01	0,025	0,0217	2,0	2,5
C*04:01:01-B*35:01:01-MICA*009:01-MICB*002:01-DRB1*01:01:01	0,025	0,0189	2,0	2,5
C*07:01:01-B*18:01:01-MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*11:01:01	0,025	0,0186	2,0	2,5
C*07:01:01-B*38:01:01-MICA*002:01-MICB*002:01-DRB1*03:01:01	0,025	0,02198	2,0	2,5
C*07:02:01-B*08:01:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*03:01:01	0,025	0,0199	2,0	2,5
C*15:02:01-B*51:01:01-MICA*009:01-MICB*002:01-DRB1*04:10:01	0,025	0,0194	2,0	2,5

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

Сравнителен анализ на HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипни честоти при двете изследвани групи

При извършения сравнителен анализ, два от най-често представените при дълголетници HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи, които не се установяват в

изследваната група от млади индивиди, се открояват с повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост (таблица 48).

Таблица 48. HLA-C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотипи установени със значима разлика в хаплотипните честоти между изследваните групи от дълголетници и млади индивиди от българската популация

C-B-MICA-MICB-DRB1 хаплотип	Брой млади	Брой стари	P
C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01	**0,0**	**3,0**	**0,03**
C*12:02:02-B*52:01:01-MICA*009:01-MICB*005:03-DRB1*15:02:01	**0,0**	**3,0**	**0,03**

Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). P стойности ≤ 0.05 се считат за статистически значими. Представени са хаплотипи с честота > 1.3 %

3. HLA-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи

Анализ на HLA-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипното разпределение при млади индивиди 15 хаплотипа, които се преброяват най-малко два пъти в изследваната група (таблица 49). Не се разграничава отделен хаплотип като най-често представен при млади индивиди.

Таблица 49. Най-често срещани MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 Хаплотип	ХЧ	CO	N	%
MICA*002:01-MICB*019-DRB1*01:01:01-DQA1*01:01:01-DQB1*05:01:01	0,0165	0,0100	3,0	1,6
MICA*008:01-MICB*005:08-DRB1*13:02:01-DQA1*01:02:01-DQB1*06:04:01	0,0165	0,0106	3,0	1,6
MICA*008:01-MICB*019-DRB1*07:01:01-DQA1*02:01:01-DQB1*02:02:01	0,0165	0,0112	3,0	1,6
MICA*011-MICB*005:02-DRB1*01:02:01-DQA1*01:01:02-DQB1*05:01:01	0,0165	0,0108	3,0	1,6
MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0165	0,0124	3,0	1,6
MICA*018:01-MICB*019-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0165	0,0122	3,0	1,6
MICA*002:01-MICB*002:01-DRB1*13:01:01-DQA1*01:03:01-DQB1*06:03:01	0,0110	0,0092	2,0	1,1
MICA*002:01-MICB*005:02-DRB1*14:54:01-DQA1*01:04:01-DQB1*05:03:01	0,0110	0,0079	2,0	1,1
MICA*008:01-MICB*005:02-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01	0,0110	0,0094	2,0	1,1

MICA*008:01-MICB*005:02-DRB1*16:01:01-DQA1*01:02:02-DQB1*05:02:01	0,0110	0,0087	2,0	1,1
MICA*008:01-MICB*019-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01	0,0110	0,0088	2,0	1,1
MICA*009:01-MICB*018-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0110	0,0090	2,0	1,1
MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*15:01:01-DQA1*01:02:01-DQB1*06:02:01	0,0110	0,0080	2,0	1,1
MICA*018:01-MICB*004:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0110	0,0092	2,0	1,1
MICA*018:01-MICB*019-DRB1*15:01:01-DQA1*01:02:01-DQB1*03:01:01	0,0110	0,0082	2,0	1,1

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

При възрастни индивиди най-често представен се явява HLA-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01 хаплотипа, който се наблюдава при 5% от изследваната група. HLA-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипното разпределение отговаря на установените то тук алелни и хаплотипни асоциации с дълголетието (таблица 50).

Таблица 50. Най-често срещани MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

Хаплотип	ХЧ	СО	N	%
MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0500	0,0297	4,0	5,0
MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01	0,0375	0,0226	3,0	3,8
MICA*009:01-MICB*005:03-DRB1*15:02:01-DQA1*01:03:01-DQB1*06:01:01	0,0375	0,0212	3,0	3,8
MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0375	0,0231	3,0	3,8
MICA*002:01-MICB*002:01-DRB1*04:02:01-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02:01	0,0250	0,0167	2,0	2,5
MICA*004-MICB*005:02-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01	0,0250	0,0185	2,0	2,5
MICA*009:01-MICB*002:01-DRB1*01:01:01-DQA1*01:01:01-DQB1*05:01:01	0,0250	0,0173	2,0	2,5
MICA*009:01-MICB*002:01-DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01	0,0250	0,0169	2,0	2,5
MICA*016-MICB*002:01-DRB1*14:01:01-DQA1*01:04:01-DQB1*05:03:01	0,0250	0,0191	2,0	2,5
MICA*017-MICB*003-DRB1*07:01:01-DQA1*02:01:01-DQB1*03:03:02	0,0250	0,0189	2,0	2,5
MICA*027-MICB*013-DRB1*16:02:01-DQA1*01:02:02-DQB1*05:02:01	0,0250	0,0191	2,0	2,5

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

Сравнителен анализ на MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1 хаплотипи при двете изследвани групи

Извършен е и разгърнат хаплотипен анализ обхващащ MIC гените и класическите HLA клас II локуси (HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1) главно асоциирани с автоимунни заболявания. Силна, статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) се установява за най-често представения хаплотип при дълголетници: **MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.05, ХЧ млади: 0, P= 0.008). С повишена честота при дълголетници и гранични стойности на статистическа значимост се установяват следните хаплотипи: MICA*009:01-MICB*005:03-DRB1*15:02:01-DQA1*01:03:01-DQB1*06:01:01 (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P= 0.027) и MICA*018:01-MICB*002:01-DRB1*11:01:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01 (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P= 0.027).

4. HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи

Разгърнат хаплотипен анализ обхващащ некласическите MIC и седем класически HLA клас I и клас II локуси установи наличието на четири HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипа, които се преброяват поне два пъти в изследваната група от здрави, млади индивиди (таблица 51).

Таблица 51. Най-често срещани HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при здрави млади индивиди от българската популация

HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 Хаплотип	ХЧ	СО	N	%
A*02:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*005:08-DRB1*13:02:01-DQB1*06:04:01-DPB1*02:01:02	0,0112	0,0091	2,0	1,12
A*11:01:01-C*04:01:01-B*35:01:01-MICA*002:01-MICB*019-DRB1*01:01:01-DQB1*05:01:01-DPB1*02:01:02	0,0112	0,0077	2,0	1,12
A*24:02:01-C*12:03:01-B*18:01:01-MICA*018:01-MICB*018-DRB1*15:01:01-DQB1*03:01:01-DPB1*23:01:01	0,0112	0,0086	2,0	1,12
A*33:01:01-C*08:02:01-B*14:02:01-MICA*011-MICB*005:02-DRB1*01:02:01-DQB1*05:01:01-DPB1*02:01:02	0,0112	0,0097	2,0	1,12

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

При дълголетници HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02 хаплотипа (3.75%) се откроява като най-често представен за изследваната група (таблица 52).

Таблица 52. Най-често срещани HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация

HLA-A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 Хаплотип	ХЧ	СО	N	%
A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02	0,0375	0,0223	3,0	3,75
A*02:01:01-C*12:03:01-B*38:01:01-MICA*002:01-MICB*002:01-DRB1*04:02:01-DQB1*03:02:01-DPB1*02:01:02	0,025	0,0205	2,0	2,5

ХЧ, хаплотипна честота; БРОЙ, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; СО, стандартно отклонение; Представени са хаплотипи, които се преброяват два или повече пъти.

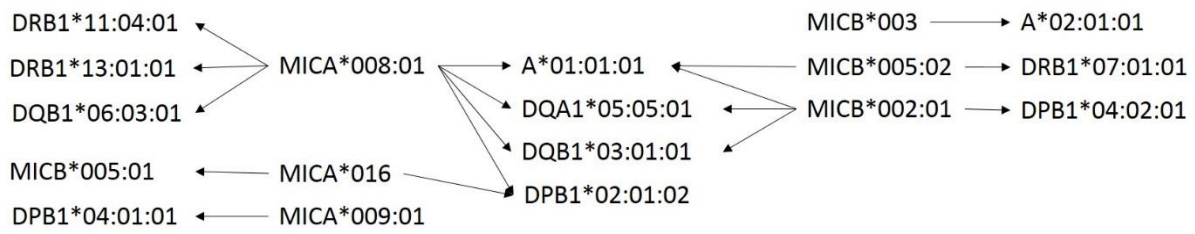
Сравнителен анализ на A-C-B-MICA-MICB-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотипи при двете изследвани групи

При извършения сравнителен анализ, най-често представения при дълголетници от българката популация хаплотип, който не се наблюдава при млади индивиди се установява със значима повишена честота при възрастни: **HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02** (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, **P=0.03**).

Дву-локусният хаплотипен анализ разкри редица MIC-класически HLA клас I и клас II хаплотипи, които се наблюдават със силно изразена ($p \leq 0.01$), статистически значима повишена честота в изследваната група от здрави дълголетници от българската популация, обобщени схематично на фигура 42. Прави впечатление, че три MICA алелни специфичности са в основата на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със статистически значима повишена честота при възрастни: MICA*008:01, MICA*016 и MICA*009:01, което е в съответствие с MICA алелното разпределение при дълголетници. Както бе описано по-рано, MICA*008:01 е най-често представената MICA специфичност в изследваната група дълголетници от българската популация. Въпреки множеството сведения за негативен ефект на молекулата и характерния за нея трансмембранен (A5.1) полиморфизъм при различни патологични състояния, повечето изследвания са концентрирани върху изследване на индивидуалния ефект на MICA

полиморфизма, без да вземат в предвид близко разположени гени, намиращи се в неравновесна скаченост с алела. Определянето на разгърнати хаплотипни профили е от изключително значение за избягване на погрешна интерпретация на дадени резултати, тъй като определено състояние може да се окаже резултат от ефект на друг близко разположен ген. В контекста на настоящата работа, идентифицирането на разгърнати хаплотипи и описване на отделните алели и хаплотипни асоциации в състава им, ще доведе до едно по-подробно разбиране на генетичната основа на дълголетието.

Силно изразена позитивна асоциация с процесите на стареене ($p \leq 0.01$) се установява за **HLA-A*01:01:01~MICA*008:01** хаплотипа, който е и най-често представения HLA-A-MICA хаплотип при възрастни. HLA-A*01:01:01 е и единствената HLA клас I алелна специфичност наблюдавана в състава на дву-локусните хаплотипи установени със силна статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при здрави възрастни индивиди от популацията. Това е в съответствие с предходни проучвания на изследователския колектив върху дълголетници от българската популация (161) и с данните за алелното разпределение на класическите HLA клас I алели в настоящия дисертационен труд, където HLA-A*01:01:01 алелната специфичност се установява с повишена честота при дълголетници от българската популация. Допълнително, HLA-A*01:01:01 алелната специфичност се установява и в основата на два HLA клас I - MICB дву-локусни хаплотипа, наблюдавани със силна статистически значима повишена честота при дълголетници: HLA-A*01:01:01-MICB*002:01 и HLA-A*01:01:01-MICB*005:02. Важно е да се отбележи, че освен описаните на фигура 42 дву-локусни хаплотипи, откроряващи се със силно изразена, статистически значима позитивна асоциация с дълголетието ($p \leq 0.01$) и други хаплотипи се установяват с повишена честота при възрастни индивиди, но статистическата значимост на наблюдаваните разлики е по слабо представена и се изразява със стойности на p вариращи между $0.05 \geq p > 0.01$.



Фигура 42. Дву-локусни MIC-класически HLA хаплотипи, наблюдавани със силно изразена статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници от българската популация

Останалите MICA*008:01 дву-локусни хаплотипи, наблюдавани със значителна повишена честота при здрави, възрастни индивиди, представляват асоциации с класически HLA клас II алелни специфичности: **MICA*008:01-DRB1*11:04:01**, **MICA*008:01-DRB1*13:01:01**, **MICA*008:01-DQA1*05:05:01**, **MICA*008:01-DQB1*03:01:01**, **MICA*008:01-DQB1*06:03:01** и **MICA*008:01-DPB1*02:01:02**. Както е известно, HLA клас II гените са широко асоциирани с различни автоимунни заболявания (и не само), като представянето на авто-антигени на CD4+ Т клетките стой в основата на развитието на тези състояния. Притежанието на хаплотипи придаващи устойчивост на индивидите към определени имунни нарушения и заболявания, вероятно е един от механизмите стоящ в основата на процесите успешно стареене.

Асоциацията на MICA*008:01 с най-представените за българската популация HLA-DR и DQ алели: -DRB1*11:04:01, -DQA1*05:05:01 и -DQB1*03:01:01, се наблюдава със силно изразена ($p<0.001$) статистически значима повишена честота при възрастни индивиди от популацията. **MICA*008:01-DRB1*11:04:01, MICA*008:01-DQA1*05:05:01** и **MICA*008:01-DQB1*03:01:01** са и най-често представените HLA-MICA-DRB1, MICA-DQA1 и MICA-DQB1 хаплотипи при здрави възрастни, като при млади индивиди всеки от тези хаплотипи се преброяват веднъж. При извършване на три-локусен хаплотипен анализ обхващаш трите локуса (MICA, DQA1, DQB1) това наблюдение се запазва, като **MICA*008:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01** хаплотипа, също се установява със статистически повишена честота при дълголетници (ХЧ стари: 0.121, ХЧ млади: 0.006, OR=23.57, **P=0.00007**). Разширен хаплотипен анализ включващ и HLA-DRB1 локуса, отново разкрива позитивна асоциация с дълголетието за по-горе описания три-локусен хаплотип, в асоциация с HLA-DRB1*11:04:01 алелната специфичност: **MICA*008:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01** (ХЧ стари: 0.1, ХЧ млади: 0.006, OR=18.33, **P=0.0006**). HLA-DRB1*11:04:01, DQA1*05:05:01 и DQB1*03:01:01 алелните специфичности от своя страна са описани като протективни за редица автоимунни заболявания при индивиди от българката популация.

На фигура 39 е представен сравнителен анализ на неравновесната скаченост установена в състава на дву-локусните хаплотипи образувани между локусите MICA, HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1 при възрастни и млади индивиди от българската популация. От анализа става ясно, че при възрастни MICA*008:01 се намира в значима неравновесна скаченост с DRB1*11:04:01 и DQA1*05:05:01 алелните специфичности, докато с DQB1*03:01:01 алела не се установява наличие на значима такава.

Асоциацията на MICA с DQA1/DQB1 локусите като цяло не е толкова силно изразена. Интересно е наблюдението, че при млади индивиди, асоциацията на MICA*008:01 алела с всеки от DRB1*11:04:01, DQA1*05:05:01 и DQB1*03:01:01 алелите, не представлява реален хаплотип. Още повече, MICA*008:01 при млади индивиди се намира в добре изразена неравновесна скаченост с HLA-DQA1*05:01:01, DQB1*02:01:01 и DRB1*03:01:01 алелните специфичности, които в съседна Гърция са описани като предразполагащи фактори за развитието на цьолиакия при деца (248). В проучване проведено в испанската популация, асоциацията на MICA A5.1 полиморфизма с DRB1*03:01 е описана като предразполагаща за развитие на автоимунни заболявания (279). Допълнително, DRB1*03:01-DQB1*02:01 е част от HLA 8.1 потомствения хаплотип, описан като един от големите генетични детерминанти на редица автоимунни заболявания. В изследваната от нас контролна група, HLA-MICA*008:01-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01 хаплотипа се среща при 4.2% от младите индивиди, докато при здрави възрастни този хаплотип не се установява. В българската популация HLA-DQB1*02, характеризиращ се с предразполагащия ак мотив в I хибервариабилен участък, в асоциация с DRB1*03:01-DQA1*05:01 хаплотипа е описан като предразполагащ за диабет тип 1 и системен лупус. Голяма част от най-често представените асоциации на MICA с HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1 локусите при възрастни индивиди (ХЧ > 2%) не се наблюдават при млади индивиди или се намират в равновесна връзка (фигура 39). От своя страна, DRB1*11:04:01, DQA1*05:05:01 и DQB1*03:01:01 алелите в състава на горе представения хаплотип се намират в силна неравновесна скаченост помежду си, със стойности на стандартизираните остатъци вариращи между 3.611 - 5.714 при възрастни.

Силна, статистически значима разлика ($P \leq 0.01$) в дву-локусните хаплотипните честоти се установява и за асоциациите на други две MICA алелни специфичности: **MICA*016-MICB*005:01**, **MICA*016-DPB1*02:01:02** и **MICA*009:01-DPB1*04:01:01**. В състава на първия хаплотип се установява наличие на силна неравновесна скаченост (стн. остатък: 5.192). Други асоциации на MICA*016 наблюдавани с повишена честота и гранични стойности на статистическа значимост, при дълголетници са **B*35:02:01-MICA*016**, **MICA*016-DQA1*03:01:01**, **MICA*016-DQB1*03:02:01** и **MICA*016-DRB1*04:01:01**, като в състава на всеки от хаплотипите се установява наличие на значима неравновесна връзка. Въпреки наличието на данни за MICA*016 като повлияващ фактор за развитието на псориазис (280), характерния за този алел TM-полиморфизъм в екзон 5, кодиращ 5 аланинови остатъка (A5), е описан

като важен протективен фактор за злокачествени заболявания в кавказоидната раса (281). Интересно е наблюдението, за повишена честота при дълголетници на изброените MICA*016 дву-локусни хаплотипи, като такива. При разгърнат хаплотипен анализ обаче обхващащ MICA-DRB1-DQA1-DQB1 локусите не се установява повишена честота на MICA*016-DRB1*04:01:01-DQA1*03:03:01-DQB1*02:02:01 хаплотипа, като въпреки установените значими неравновесни връзки в рамките на хаплотипа, той се преброява само веднъж в изследваната група от здрави възрастни индивиди. Това наблюдение би следвало да се разглежда, като такова, което е в полза на процесите на успешно стареене, тъй като DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04 (DQ3-DR4) хаплотипа е силно асоцииран като предразполагащ фактор за диабет тип 1 и цьолиакия при кавказоиди, а DRB1*04:01 алелната специфичност сама по себе си е описана като един от главните генетични детерминанти на автоимунното заболяване ревматоиден артрит. Допълнително се подчертава значението на изследване на разгърнати хаплотипи, тъй като дадени наблюдавани асоциации на алелно или дори на дву-локусно хаплотипно ниво, могат да са резултат от друг ефект и по този начин да бъдат интерпретирани погрешно.

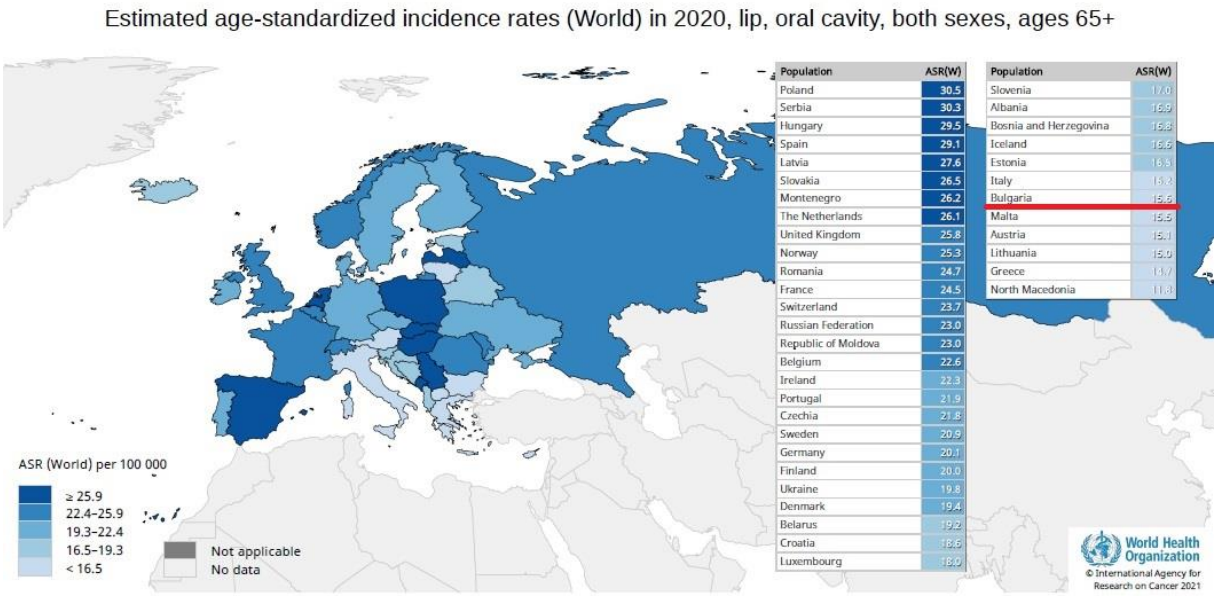
Негативна асоциация с дълголетието е установена за най-често срещания MICA-DPB1 хаплотип в изследваната група от здрави, млади индивиди от българската популация: **MICA*008:01-DPB1*04:01:01**, като алелите в състава на хаплотипа се намират в значима неравновесна връзка по между си. Интересно е наблюдението, че DPB1*04:01:01 асоцииран с две различни MICA алелни специфичности се среща със статистически значима разлика и в двете изследвани групи. Това би могло да се обясни с участието им в състава на разширени хаплотипи и намирането им в неравновесна скаченост със някой от алелите в състава на съответния хаплотип. Така например при възрастни MICA*009:01-DPB1*04:01:01 е част от разгърнатия хаплотип MICA*009:01-**MICB*002:01-DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01**-DPB1*04:01:01 (ХЧ: 2.5%), който не се наблюдава в групата от млади индивиди. В състава на хаплотипа DPB1*04:10:01 се намира в неравновесна скаченост с DQA1*03:03:01 алелната специфичност, която от своя страна се намира в неравновесна връзка с почти всички алели в рамките на хаплотипа: DQA1*03:03:01-DQB1*04:02:01 (стн. остатък: 6.389), DRB1*04:10:01-DQA1*03:03:01 (стн. остатък: 6.926) и MICA*009:01-DQA1*03:03:01 (стн. остатък: 3,655). Допълнително, дву-локусният **MICA*009:01-DQA1*03:03:01** хаплотип, е една от асоциациите наблюдавана с повишена честота при възрастни индивиди. От своя страна при млади индивиди MICA*008:01-DPB1*04:01:01 се

наблюдава като част от MICA*008:01-**MICB*005:08-DRB1*13:02:01-DQA1*01:02:01-DQB1*06:04:01**-DPB1*04:01:01 и MICA*008:01-**MICB*005:02-DRB1*03:01:01-DQA1*05:01:01-DQB1*02:01:01**-DPB1*04:01:01 хаплотипите (ХЧ > 1%), които не се установяват в изследваната група от възрастни индивиди.

Сравнителен анализ на MICB – класически HLA дву-локусни хаплотипни честоти при дълголетници и млади, разкри наличието на шест хаплотипа със силно изразена ($p \leq 0.01$) статистически значима повишена честота при здрави, възрастни индивиди от българската популация (фигура 42). Три от тях представляват асоциации на MICB*002:01 алелната специфичност с част от горе описаните класически HLA алели: HLA-A*01:01:01, -DQA1*05:05:01 и -DQB1*03:01:01. **HLA-A*01:01:01-MICB*002:01**, **MICB*002:01-DQA1*05:05:01** и **MICB*002:01-DQB1*03:01:01** хаплотипите, освен установени със статистически значима повишена честота, са и най-често представените хаплотипи в изследваната група от здрави дълголетници от българската популация. Не се установява наличие на неравновесна скаченост в състава на нито един от трите хаплотипа. Като цяло, асоциацията на MICB локуса с класическите HLA клас I и клас II локуси е по-слабо изразена в сравнение с тази наблюдавана за MICA. При сравнение силата на неравновесна скаченост за най-често представените MICB-класически HLA клас II хаплотипи при дълголетници (ХЧ>2%) със скачеността наблюдавана за същите хаплотипи при млади индивиди (фигура 40), съществена разлика не се установява между двете групи. Прави впечатление, че при дълголетници по-голяма част от хаплотипите, представляват асоциации именно на MICB*002:01 и MIC*005:02 алелните специфичности, което е обяснимо, предвид, че двата алела представляват 65.4% от MICB генетичното разнообразие при възрастни. Важно е и да се обърне внимание на изключително ограничения набор от класически HLA клас I и клас II алелни специфичности, с който MICB*002:01 се намира в неравновесна връзка. Силно изразена неравновесна връзка се наблюдава между MICB и класическите клас I HLA-B и -C локуси, с наличие на силна глобална неравновесна скаченост между тях. При сравнителния анализ на B-MICB и C-MICB хаплотипните честоти между двете изследвани групи **C*15:02:01-MICB*002:01, C*01:02:01-MICB*002:01** и **C*07:01:02-MICB*005:02** хаплотипите се открояват с повишена честота при дълголетници. И трите хаплотипа представляват асоциации на MICB*002:01 и MICB*005:02 алелните специфичности с HLA-C алели наблюдавани с повишена честота при дълголетници при извършения сравнителен анализ на класическите HLA клас I алелни честоти в по-голяма група от здрави възрастни (94) и

млади (541) индивиди от българската популация: **C*15:02:01**, **C*01:02:01** и **HLA-C*07:01:02**. Извършения разгърнат хаплотипен анализ обхващащ седем класически и некласически HLA локуса: HLA-A, -B, -C, -MICA, -MIB, -DRB1 и -DQB1 потвърждава по-голямата част от описаните до тук статистически значими, дву-локусни и разгърнати хаплотипни асоциации с дълголетието. При здрави възрастни индивиди от българската популация се установява статистически значима висока честота на **A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQB1*03:01:01,** който се явява и най-често представения хаплотип в групата (ХЧ: 3.75%). Допълнително разширяване на хаплотипа с обхващане на HLA-DQA1 и -DPB1 локусите отново е в съответствие с описаните в настоящия дисертационен труд асоциации с процесите на успешно стареене: **HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02.**

Изследване на полиморфизма на некласическите MHC клас I свързани (MIC) гени при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с две групи здрави индивиди от българската популация



Фигура 43. Стандартизирана възрастова честота на поява (ASR) на оралния карцином към 2020 година за двата пола (възраст 65+). *Графиката е достъпна от International Agency for Research on Cancer.*

Стареенето е процес, асоцииран с влошаване на свойствата и функциите на редица органи и системи, и е главен рисков фактор за развитието на злокачествени заболявания. Оралните ракови заболявания, част от голямата група тумори на главата и шията, са шестия най-разпространен вид злокачествени заболявания в световен мащаб, засягащ около 300 000 души годишно, предимно във високо развитите икономически страни (282). Спиноцелуларния карцином (OSCC) е най-често срещания тип орално раково заболяване, характеризиращ се с по-висока честота на проява с напредване на възрастта и със средна възраст на диагностициране около 62 години (283). Според международна агенция за изследване на рака (IARC), към 2020 година изчислената стандартизирана възрастова честота (ASR) на оралния карцином за индивиди от българската популация на възраст над 55 години е 14.3 на 100 000 души, а за индивиди на възраст над 65 години тя се увеличава и достига 15.5 на 100 000 (фигура 44).

MICA, MICB алелни честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с две изследвани групи здрави индивиди от българската популация

I. Анализ на MICA, MICB алелните честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином

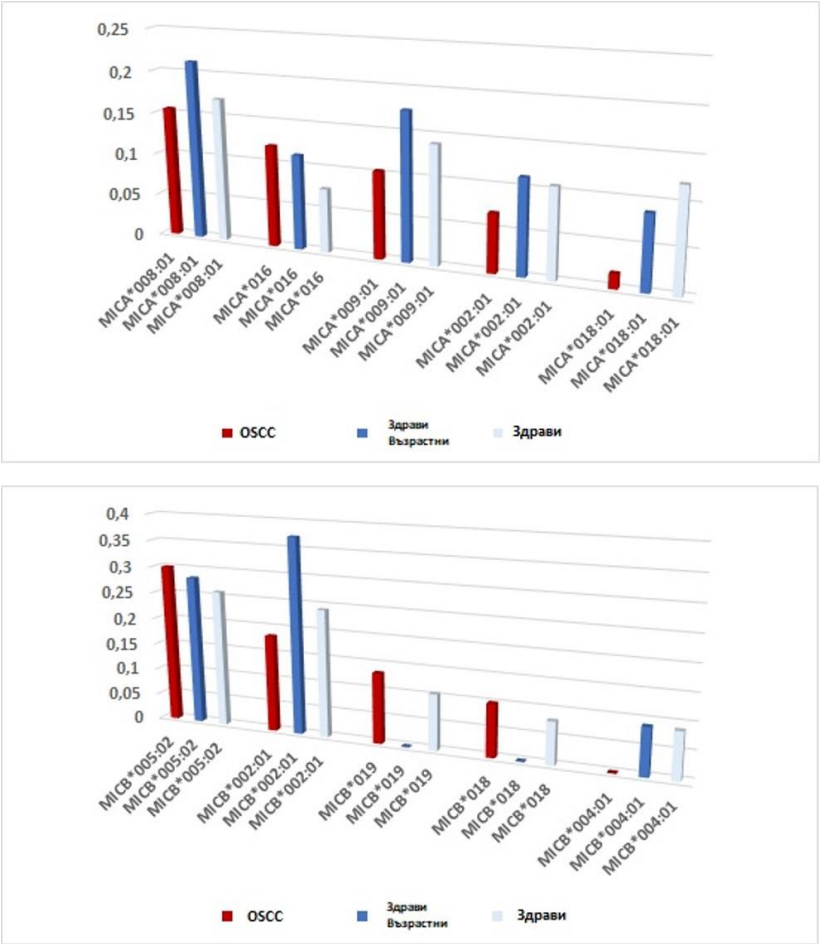
Най-често представените MICA алели при пациенти със спиноцелуларен карцином са както следва: MICA*008:01 (15.5%), MICA*016 (12.1) и MICA*009:01 (10.3%). MICB алелите наблюдавани с честота над 10% са MICB*005:02, съставляващ 30% от MICB алелния репертоар при пациенти, следван от MICB*002:01 (18.3%), MICB*019 (13.3%) и MICB*018 (10.0%) (таблица 53).

Таблица 53. MICA, MICB алелни честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином

MICA алел	АЧ	Брой	%
MICA*008:01	0,1551	9,3	15,5
MICA*016	0,1207	7,2	12,1
MICA*009:01	0,1034	6,2	10,3
MICA*002:01	0,069	4,1	6,9
MICA*010:01	0,0517	3,1	5,2
MICA*006	0,0517	3,1	5,2
MICA*004	0,0517	3,1	5,2
MICA*024	0,0517	3,1	5,2
MICA*012:01	0,0517	3,1	5,2
MICA*009:02	0,0345	2,1	3,5
MICA*013	0,0345	2,1	3,5
MICA*042	0,0345	2,1	3,5
MICA*028	0,0345	2,1	3,5
MICA*011	0,0172	1,0	1,7
MICA*076	0,0172	1,0	1,7
MICA*027	0,0172	1,0	1,7
MICA*022	0,0172	1,0	1,7
MICA*063N	0,0172	1,0	1,7
MICA*049	0,0172	1,0	1,7
MICA*035	0,0172	1,0	1,7
MICA*018:01	0,0172	1,0	1,7
MICA*007:01	0,0172	1,0	1,7

MICB алел	АЧ	Брой	%
MICB*005:02	0,3000	18,0	30,0
MICB*002:01	0,1833	11,0	18,3
MICB*019	0,1334	8,0	13,3
MICB*018	0,1000	6,0	10,0
MICB*005:01	0,0667	4,0	6,7
MICB*008	0,0667	4,0	6,7
MICB*028	0,0333	2,0	3,3
MICB*020	0,0333	2,0	3,3
MICB*010	0,0167	1,0	1,7
MICB*013	0,0167	1,0	1,7
MICB*005:03	0,0167	1,0	1,7
MICB*005:06	0,0167	1,0	1,7
MICB*003	0,0167	1,0	1,7

АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се среща/преброява съответния алел в изследваната група



Фигура 44. Най-често представени MIC алели при пациенти с орал спиноцелуларен карцином и двете изследвани групи здрави индивиди от българската популация.

1. **Сравнителен анализ на MICA алелните честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и две изследвани групи здрави индивиди от българската популация**

Не се установяват статистически значими различия в MICA алелното разпределение между пациенти и здрави индивиди. Интересно е наблюдението, че при здрави дълголетници се наблюдава най-висока честота на MICA*008:01 алела (фигура 44). Въпреки липсата на статистическа значимост, се установява тенденция към повишена честота на MICA*018:01 алелната специфичност в групата от здрави индивиди от българската популация. Тенденция към повишена честота при пациенти с OSCC се установява за MICA*006 и MICA*042 алелите. Значимостта на наблюдаваните разлики се губи след прилагане корекцията за множественост на Бонферони (таблица 54).

Таблица 54. Сравнителен анализ на MICA алелното разпределение при пациенти с OSCC и две групи здрави представители на българската популация (здрави възрастни и здрава контролна група)

MICA алел	Брой Здрави възрастни (n=40)	Брой Здрави индивиди (n=132)	Брой пациенти OSCC (n=30)	P	Pc	OR (95% CI)
MICA*002:01	9,0		4,1	0,38		0,59 (0,17-1,97)
		28,0		0,39		0,62 (0,21-1,83)
MICA*004	5,0		3,1	1,00		0,82 (0,19-3,51)
		13,0		1		1,05 (0,30-3,76)
MICA*006	0,0		3,1	0,08		
		2,0		0,045	1,74	7,12 (1,18-43,01)
MICA*007:01	3,0		1,0	0,64		0,45 (0,05-4,32)
		14,0		0,32		0,31 (0,04-2,36)
MICA*008:01	17,0		9,3	0,39		0,68 (0,28-1,64)
		45,0		0,77		0,89 (0,41-1,93)
MICA*008:04	1,0		0,0	1,00		
		7,0		0,36		
MICA*009:01	14,0		6,2	0,23		0,54 (0,20-1,50)
		37,0		0,45		0,71 (0,29-1,74)
MICA*009:02	1,0		2,1	0,58		2,82 (0,25-31,46)
		3,0		0,23		3,10 (0,52-18,61)
MICA*010:01	4,0		3,1	1,00		1,04 (0,23-4,75)
		5,0		0,17		2,83 (0,67-12,02)
MICA*011	0,0		1,0	0,43		
		7,0		1		0,64 (0,08-5,18)
MICA*012:01	1,0		3,1	0,31		4,31 (0,44-42,09)
		3,0		0,08		4,73 (0,94-23,69)
MICA*012:03	2,0		0,0	0,51		
		2,0		1		
MICA*013	0,0		2,1	0,18		
		1,0		0,09		9,37 (0,85-103,39)
MICA*016	9,0		7,2	0,88		1,08 (0,38-3,07)
		20,0		0,26		1,67 (0,68-4,12)
MICA*017	4,0		0,0	0,13		
		6,0		0,6		
MICA*018:01	7,0		1,0	0,14		0,18 (0,02-1,48)
		32,0		0,016	0,62	0,13 (0,02-0,92)
MICA*022	0,0		1,0	0,43		
		2,0		0,46		2,29 (0,21-24,97)
MICA*024	0,0		3,1	0,08		
		4,0		0,12		3,53 (0,78-15,98)
MICA*027	3,0		1,0	0,64		0,45 (0,05-4,32)
		6,0		1		0,75 (0,09-6,20)
MICA*028	0,0		2,1	0,18		
		3,0		0,23		3,10 (0,52-18,61)
MICA*035	0,0		1,0	0,43		
		1,0		0,34		4,59 (0,29-72,67)
MICA*042	0,0		2,1	0,18		
		0,0		0,03	1,29	
MICA*049	0,0		1,0	0,43		
		1,0		0,34		4,59 (0,29-72,67)
MICA*063N	0,0		1,0	0,43		
		0,0		0,19		
MICA*076	0,0		1,0	0,43		
		3,0		0,56		1,52 (0,16-14,45)
MICA*057	0,0		0,0			
		5,0		0,59		

Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). Приложена е корекция за множественост на Бонферони. Коригирани P стойности (Pc) ≤ 0.05 се считат за статистически значими. Представен е извършения анализ за алели, за които се установява стойност на статистическа значимост различна от единица (p < 1).

2. Сравнителен анализ на MICB алелните честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и две изследвани групи здрави индивиди от българската популация

MICB алел, който се открояват със значително висока алелната честота при дълголетници, в сравнение с изследваните групи от пациенти с OSCC и здрави, млади индивиди от българската популация е MICB*002:01 (таблица 55). По-рано, MICB*002:01 бе описан като позитивно асоцииран с процесите на успешно стареене, както на алелно ниво, така и като част от разгърнати хаплотипи. При извършения сравнителен анализ между здрави възрастни индивиди и пациенти с OSCC, това наблюдение се запазва, като MICB*002:01 отново се откроява с повишена честота при дълголетници. При същия сравнителен анализ и MICB*004:01 алелната специфичност се откроява с повишена честота при здрави, възрастни индивиди. След прилагане на корекцията на Бонферони, значимостта на наблюдаваните разлики се губи. Интересно е наблюдението, че при сравнителен анализ на MICB алелните честоти при пациенти със спиноцелуларен карцином и цялостната група здрави индивиди от българската популация, от двете MICB алелни специфичности, само MICB*004:01 алела, запазва негативна асоциация със спиноцелуларния карцином (АЧ здрави: 0.0888, АЧ пациенти: 0, P= 0.01, Pc=0.18).

Таблица 55. Сравнителен анализ на MICB алелното разпределение при пациенти с OSCC и две групи здрави представители на българската популация (здрави възрастни и здрава контролна група)

MICB алел	Брой Здрави възрастни (n=40)	Брой здрави (n=131)	Брой OSCC (n=30)	P	Pc	OR (95% CI)
MICB*002:01	29,0		11,0	0,016	0,23	0,38 (0,17-0,84)
		63,3		0,33		0,7 (0,35-1,44)
MICB*003	4,0		1,0	0,39		0,31 (0,03-2,88)
		6,7		1		0,65 (0,08-5,43)
MICB*004:01	7,0		0,0	0,019	0,28	
		23,3		0,011	0,19	
MICB*005:01	4,0		4,0	0,73		1,32 (0,32-5,51)
		6,7		0,13		2,74 (0,77-9,8)
MICB*005:02	22,0		18,0	0,82		1,09 (0,52-2,29)
		67,8		0,51		1,23 (0,66-2,28)
MICB*005:03	4,0		1,0	0,39		0,31 (0,03-2,88)
		12,2		0,48		0,35 (0,04-2,72)
MICB*005:06	1,0		1,0	1,00		1,31 (0,08-21,37)
		2,2		0,46		1,98 (0,18-21,29)
MICB*005:08	1,0		0,0	1,00		
		4,4		1		

MICB*008	2,0		4,0	0,40		2,72 (0,48-15,39)
		8,9		0,27		2,04 (0,6-6,86)
MICB*010	0,0		1,0	0,43		
		0,0		0,19		
MICB*013	4,0		1,0	0,39		0,31 (0,03-2,88)
		6,7		1		0,65 (0,08-5,43)
MICB*018	0,0		6,0	0,0058	0,09	
		21,0		0,62		1,27 (0,49-3,3)
MICB*019	**0,0**		**8,0**	**0,001**	**0,01**	
		27,7		0,539		1,3 (0,56-3,02)
MICB*020	0,0		2,0	0,19		
		5,6		0,646		1,59 (0,31-8,21)
MICB*028	0,0		2,0	0,19		
		1,2		0,09		7,79 (0,77-78,52)

Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). Приложена е корекция за множественост на Бонферони. Коригирани P стойности (Pc) ≤ 0.05 се считат за статистически значими. Представен е извършения анализ за алели, за които се установява стойност на статистическа значимост различна от единица (p < 1).

Сравнителния анализ на MIC алелните честоти при здрави, възрастни и пациенти с OSCC от българската популация, допълнително разкри някой негативни асоциации с дълголетието. MICB*018 и MICB*019 алелните специфичности, посочени със статистически значима повишена честота в изследваната група от здрави, млади индивиди в настоящия дисертационен труд, се установяват и с повишена честота и в изследваната група от пациенти със спиноцелуларен карцином, като след прилагане корекцията на Бонферони само MICB*019 запазва статистическата значимост на наблюдаваната разлика.

II. MICA-MICB хаплотипен анализ при пациенти със спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с двете изследвани групи здрави индивиди от българската популация

1. Дву-локусен MICA-MICB хаплотипен анализ при пациенти с орален спиноцелуларен карцином

Таблица 56. Най-често представени MICA-MICB хаплотипи при пациенти с орален спиноцелуларен карцином

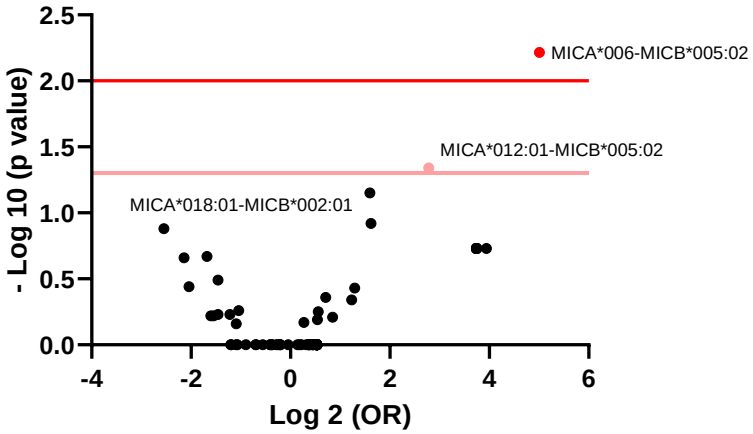
Хаплотип	наблюдавана ХЧ	Очаквана ХЧ	Стн Ост	Брой	%
MICA*016-MICB*002:01	**0,0815**	**0,0221**	**3,058**	**4,9**	**8,2**
MICA*006-MICB*005:02	**0,0500**	**0,0155**	**2,128**	**3,0**	**5,0**
MICA*009:01-MICB*005:02	0,0500	0,0310	0,822	3,0	5,0
MICA*016-MICB*005:01	**0,0500**	**0,0081**	**3,607**	**3,0**	**5,0**
MICA*008:01-MICB*008	**0,0500**	**0,0092**	**3,280**	**3,0**	**5,0**
MICA*012:01-MICB*005:02	**0,0500**	**0,0155**	**2,128**	**3,0**	**5,0**

MICA*004-MICB*005:02	0,0333	0,0155	1,098	2,0	3,3
MICA*008:01-MICB*005:02	0,0333	0,0414	-0,301	2,0	3,3
MICA*008:01-MICB*018	0,0333	0,0115	1,567	2,0	3,3
MICA*009:01-MICB*019	0,0333	0,0121	1,488	2,0	3,3
MICA*008:01-MICB*002:01	0,0204	0,0253	-0,235	1,2	2,0
MICA*009:02-MICB*002:01	0,0204	0,0063	1,367	1,2	2,0
MICA*010:01-MICB*002:01	0,0204	0,0095	0,865	1,2	2,0
MICA*002:01-MICB*002:01	0,0204	0,0126	0,531	1,2	2,0
MICA*018:01-MICB*002:01	**0,0204**	**0,0032**	**2,376**	**1,2**	**2,0**

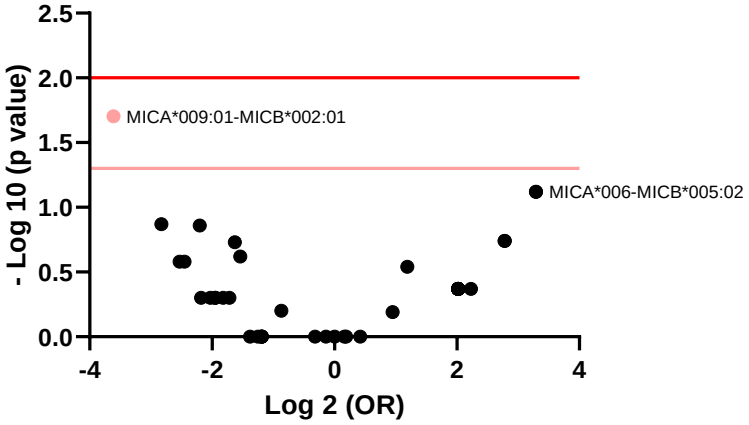
ХЧ, хаплотипна честота; Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Наблюдавана ХЧ, изчислената хаплотипна честота за изследвана група; Очаквана ХЧ, очаквана хаплотипна честота; Стн Ост, стандартизирани остатъци. С удебелен шрифт са представени тези със стойности над 2. В таблицата се представени хаплотипи с честота ≥ 2%.

2. Сравнителен анализ на MICA-MICB хаплотипните честоти при пациенти с OSCC и здрави индивиди от българската популация

Силна позитивна асоциация с оралния спиноцелуларен карцином ($p < 0.01$) се установява за MICA*006-MICB*005:02 хаплотипа, който не се наблюдава в групата от здрави индивиди от българската популация. С повишена честота при пациенти и гранични стойности на статистическа значимост се установява и MICA*012:01-MICB*005:02 хаплотип.



Фигура 45. Разпределение на MICA-MICB дву-локусните хаплотипи при здрави индивиди от българската популация и пациенти с OSCC. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Непрекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Непрекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

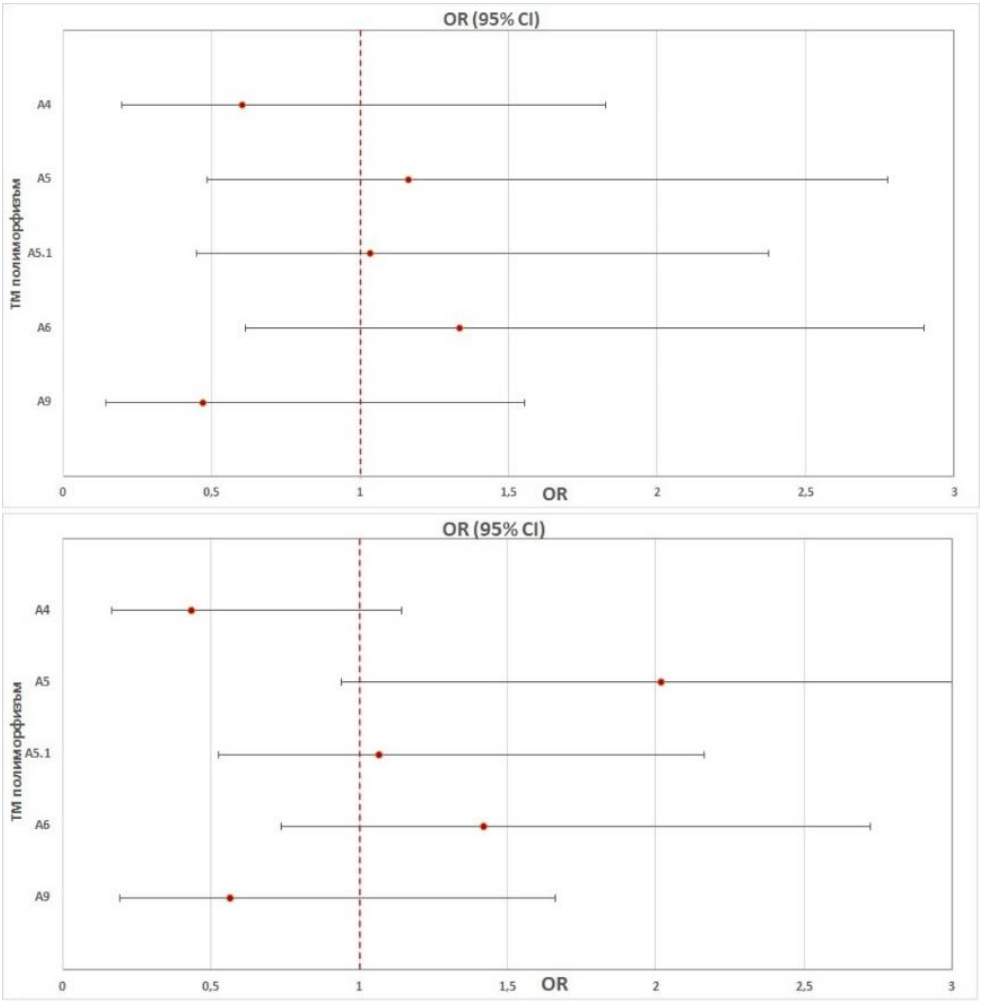


Фигура 46. Разпределение на MICA-MICB дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни индивиди от българската популация и пациенти с OSCC. *Volcano plot графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите. Непрекъснатата червена линия отговаря на p= 0.01, като точки над линията са със стойности на p <0.01 и точки под линията с p> 0.01. Непрекъснатата розова линия отговаря на p= 0.05, като точки над линията са със стойности на p <0.05 и точки под линията с p> 0.05.*

Хаплотип, който не се наблюдава в изследваната група от пациенти със спиноцелуларен карцином и се установява със статистически значима повишена честота при здрави дълголетници е **MICA*009:01-MICB*002:01**. Този хаплотип се установява с повишена честота при дълголетници и при извършения сравнителен анализ на MICA-MICB хаплотипните честоти при здрави възрастни и млади индивиди.

3. Сравнителен анализ на MICA трансмембранния полиморфизъм при пациенти с OSCC и две изследвани групи здрави индивиди от българската популация

Изследване на трансмембранния полиморфизъм характерен за MICA молекулата при пациенти и здрави индивиди, не разкри наличието на статистическа значима разлика между изследваните групи. Тенденция към повишена честота на A4 и A9 полиморфизмите се наблюдава при двете изследвани групи от здрави индивиди.



Фигура 47. Графика тип „гора“ (forest plot) изразяваща съотношението на шансовете (OR) и 95% доверителен интервал (95% CI) за MICA ТМ полиморфизъм наблюдавани при пациенти с OSCC и здрави, възрастни индивиди от българската популация (горна графика); при пациенти с OSCC и здрави индивиди (млади + възрастни) от българската популация (долна графика)

III. Изследване на нивата на разтворими MIC молекули в серуми на пациенти с орален спиноцелуларен карцином и две групи здрави представители на българската популация

Анализ на ковариацията (ANCOVA) бе извършен, за да се определи съществува ли статистически значима разлика между пациенти с OSCC и здрави индивиди от българската популация в нивата на разтворими MIC молекули като се вземат предвид възрастта и пола на изследваните индивиди. Анализ на равенството на разпределение на нива на разтворими MIC молекули между здрави индивиди от българската популация и пациенти проявен чрез тест на Левин, не установи наличието на статистически значима разлика между изследваните групи както за нивата на sMICA (p

= 0.374), така и за sMICB (p = 0.993), т.е. вариацията между групите е еднаква. Извършения анализ на ковариацията (ANCOVA), установи липса на статистическа значимост в нивата на разтворими sMICA [F (1, 73) = 0.198, p=0.658, ηp2=0.003] и sMICB [F (1, 35) = 0.541, p=0.467, ηp2=0.0152] молекули между изследваните групи (пациенти и здрави индивиди), като се вземат предвид възрастта и пола като ковариабилни фактори.

Таблица 57. Резултати от анализ на ковариацията между пациенти с OSCC и здрави индивиди от българската популация с ковариабилни фактори пол и възраст

	df		F		p		частичен Ета на квадрат (ηp2)	
	sMICB	sMICA	sMICB	sMICA	sMICB	sMICA	sMICB	sMICA
Възраст	1	1	0,0053	2,1170	**0,942**	**0,150**	0,0002	0,028
Пол	1	1	2,9050	0,6890	**0,097**	**0,409**	0,0766	0,009
Изследвани групи	1	1	0,5406	0,1980	**0,467**	**0,658**	0,0152	0,003
Грешка	35	73						
Общо	39	77						

Df, степени на свобода (degree of freedom); F, Функция на разпределение; P стойностите са определени чрез Ancova тест. За статистически значими се приемат стойности на p ≤ 0.05.

Стареенето е главен рисков фактор за развитието на злокачествени заболявания, какъвто е и най-често срещания тип орално раково заболяване - спиноцелуларен карцином, характеризиращ се със средна възраст на диагностициране около 62 години. В контекста на механизмите стоящи в основата на „успешното“ стареене, интерес представлява сравняването на генетичния фон на здрави, възрастни индивиди от българската популация и на индивиди диагностицирани с тази агресивната неоплазия. В частност изследването на алелния полиморфизъм на стрес-индуцируемите MIC гени, чиято роля е описана в редица проучвания като благоприятстваща инициирането на HLA независим цитотоксичен имунен отговор и унищожаването на туморни клетки, би хвърлило допълнително светлина върху генетичната същност на дълголетието в българската популация. Допълнително, 92% до 98% от случаите на туморите в лицево-челюстната област при своето развитие имат пред-туморен стадий, като ранната диагностика с цел превенция развитието и/или прилагане на навременна терапия с цел контрол над заболяването, са от изключително значение, като в тези случай преживяемостта на пациентите достига до 80%. Това налага допълнителни

изследвания с оглед изясняване ролята на MIC алелния полиморфизъм като предразполагащ фактор за развитие на орален спиноцелуларен карцином.

Наблюдават се някой съществени различия в алелните честоти на най-често представените MICA и MICB алели между пациенти с OSCC и двете изследвани групи здрави индивиди от българската популация. Интересно е наблюдението, че MICA*008:01 алела се наблюдава с най-висока честота в изследваната групата от здрави, възрастни индивиди от българската популация (фигура 44). Както бе описано по-рано, при здрави възрастни и млади индивиди, MICA*008:01 се характеризира с различен модел на значими асоциации с класическите HLA алели. По тази причина високата честота на срещане на алела и в трите изследвани групи следва да се интерпретира в контекста на различните хаплотипи, от които са част. За MICA не се установяват статистически значими различия в алелните честоти наблюдавани при здрави, възрастни и пациенти с OSCC. При извършения обаче сравнителен анализ обхващаш представители на здравата българска популация в по-широк възрастов диапазон (20 – 99г.) и пациенти с OSCC, **MICA*018:01** се откроява с тенденция към повишена честота при здрави индивиди.

От своя страна, MICB алел, който се открояват със значително висока алелната честота при дълголетници, в сравнение с изследваните групи от пациенти с OSCC и здрави, млади индивиди от българската популация е MICB*002:01 (фигура 45). По-рано, MICB*002:01 бе описан като позитивно асоцииран с процесите на успешно стареене, както на алелно ниво, така и като част от разгърнати хаплотипи. При извършения сравнителен анализ между здрави дълголетници и пациенти с OSCC, това наблюдение се запазва, като **MICB*002:01** отново се откроява със значима повишена честота при здрави възрастни индивиди. При същия сравнителен анализ и **MICB*004:01** алелната специфичност се откроява с повишена честота при здрави, възрастни индивиди. След прилагане на корекцията на Бонферони, значимостта на наблюдаваните разлики се губи. Интересно е наблюдението, че при сравнителен анализ на MICB алелните честоти при пациенти със спиноцелуларен карцином и цялостната група здрави индивиди от българската популация, от двете MICB алелни специфичности, само MICB*004:01 алела, запазва своята негативна асоциация със спиноцелуларния карцином. Като се вземат предвид описаните данни в настоящата работа, засягащи индивиди от българската популация, MICB*002:01 алелната специфичност се очертава като генетичен маркер позитивно асоцииран в частност с дълголетието, докато MICB*004 алела вероятно има роля на протективен алел при

орален спиноцелуларен карцином. Потвърждаването на тези резултати следва да се извърши в по-голяма група от изследвани индивиди.

Интересно е наблюдението, че при здрави дълголетници, MICA*018 е единствената MICA алелна специфичност за която се установява наличие на неравновесна връзка с MICB*002:01 алела. MICA*018:01-MICB*002:01 е втория най-често представен хаплотип в изследваната група здрави, възрастни индивиди, като при извършения сравнителния дву-локусен хаплотипен анализ между здрави възрастни индивиди и пациенти със спиноцелуларен карцином се разкрива тенденция към повишена честота на хаплотипа при дълголетници.

Сравнителния анализ на MIC алелните честоти при здрави, възрастни и пациенти с OSCC от българската популация, допълнително разкри някой негативни асоциации с дълголетието. MICB*018 и MICB*019 алелните специфичности, посочени със статистически значима повишена честота в изследваната група от здрави, млади индивиди в настоящия дисертационен труд, се установяват и с повишена честота и в изследваната група от пациенти със спиноцелуларен карцином, като след прилагане корекцията на Бонферони само MICB*019 запазва статистическата значимост на наблюдаваната разлика. Функциите на кодираните от тях протеини все още не са известни, предвид рядката честота на срещане на тези алели в световен мащаб. Тези две позитивни асоциации с оралния спиноцелуларен карцином обаче се губят при извършения сравнителен анализ засягащ по-голямата група, здрави индивиди от българската популация, където позитивна асоциация с карцинома се установява за **MICA*006** алела. Характерния за MICA*006 A6 TM полиморфизъм е силно асоцииран с развитието на OSCC в тайванската популация (210), а в японската е описан като предразполагащ фактор за развитие на хепатоцелуларен карцином (284). Допълнително, асоциацията на **MICA*006** алела с **MICB*005:02** също се установява със статистически значима повишена честота при пациенти с орален спиноцелуларен карцином в сравнение с здравата контролна група.

Сравнителен анализ на характерния за MICA молекулата трансмембранен полиморфизъм, не разкрива статистически значима разлика между здрави дълголетници и пациенти с OSCC. Наблюдава се тенденция към повишена честота на A4 и A9 алелите при здрави индивиди от българската популация (фигура 48). MICA*018 алела, установен в настоящата работа като негативно асоцииран с орален спиноцелуларен карцином се характеризира с A4 TM полиморфизъм. Тази наблюдавана тенденция, е в съответствие с други проучвания изследващи асоциацията

на ТМ полиморфизма и риска за развитие на злокачествени заболявания. А4 алела е описан като протективен при рак на маточната шийка в шведската популация (285) и рак на гърдата в иранската (286). Мащабно мета-проучване посочва А9 алела като важен протективен фактор за развитието на злокачествени заболявания в кавказоидната раса (287). В датската популация MICA-A9 е асоцииран с намален риск от развитие на орален спиноцелуларен карцином (211).

На база описаните резултати, може да се изведе заключението, че различни алели/хаплотипи стоят в основата на различните изследвани ефекти. Така например при дълголетници, MICB*002:01 алелната специфичност, както и неговата асоциация с MICA*009:01 (MICA*009:01-MICB*002:01) се открояват със значително повишена честота както при сравнителния анализ с здрави, млади индивиди от българската популация, така и при пациенти с орален спиноцелуларен карцином. Тези позитивни асоциации с дълголетието обаче се губят при разширяване на възрастовия диапазон на здравата контролна група, където се очертават други позитивни или негативни тенденции на асоциация със оралния спиноцелуларен карцином. Така, MICA*018:01 и MICB*004 алелите се наблюдават с тенденция към негативна асоциация с OSCC. Това следва да се докаже в по-голяма група от изследвани индивиди. Негативна асоциация с дълголетието се установява за MICB*018 и MICB*019 алелните специфичности, които не се установяват в изследваната група от здрави, възрастни индивиди, а в изследваните групи от млади, здрави индивиди и пациенти с орален спиноцелуларен карцином, тези специфичности се установяват с честота над 10%. Отново, тази негативна асоциация с дълголетието се губи при извършения сравнителен анализ включващ здравата контролна група в по-широк възрастов диапазон. Тук се разкрива тенденция към позитивна асоциация на MICA*006 алела и принадлежащия към него А6 полиморфизъм с орален спиноцелуларен карцином. Друга установена тенденция е към повишена честота на А4 и А9 ТМ алелите при здрави индивиди от българската популация.

ОБОБЩЕНИЕ

Застаряващото население е висок рисков фактор за развитието на редица възрастово-асоциирани заболявания, което води до увеличено търсене на медицинска помощ и изисква по-добре подготвени медицински специалисти. Мнозинството проучвания изследващи различните състояния на отклонение от нормалната жизнена дейност на организма, се концентрират върху изучаване на индивиди засегнати от съответния абнормален ефект, тъй като при тях лесно могат да се открояят генетичните или други биологични разлики, стоящи в основата на проявата. Последните години, голям интерес от изследователска гледна точка представлява точно противоположната стратегия: изследване на възрастни индивиди, които са успели да достигнат определен етап от жизнения си цикъл (над 65 години), без да развият хронични, застрашаващи живота заболявания. Изследването на такива индивиди, би могло да разкрие каква е тяхната тайна – какво седи в основата на биологичните им успех да се запазят ментално и физически здрави, въпреки напредването на възрастта и всички съпътстващи я промени. Според едни от водещите изследователи в сферата, в основата на процесите на „успешно“ стареене стоят гени, които от една страна намаляват риска за развитието на хронични заболявания, а от друга такива, които придават устойчивост на разрушаващия им ефект. Откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към възрастово асоциирани заболявания ще допринесе за развитието на стратегии за възстановяване на имунната система и превенцията на репликативното стареене.

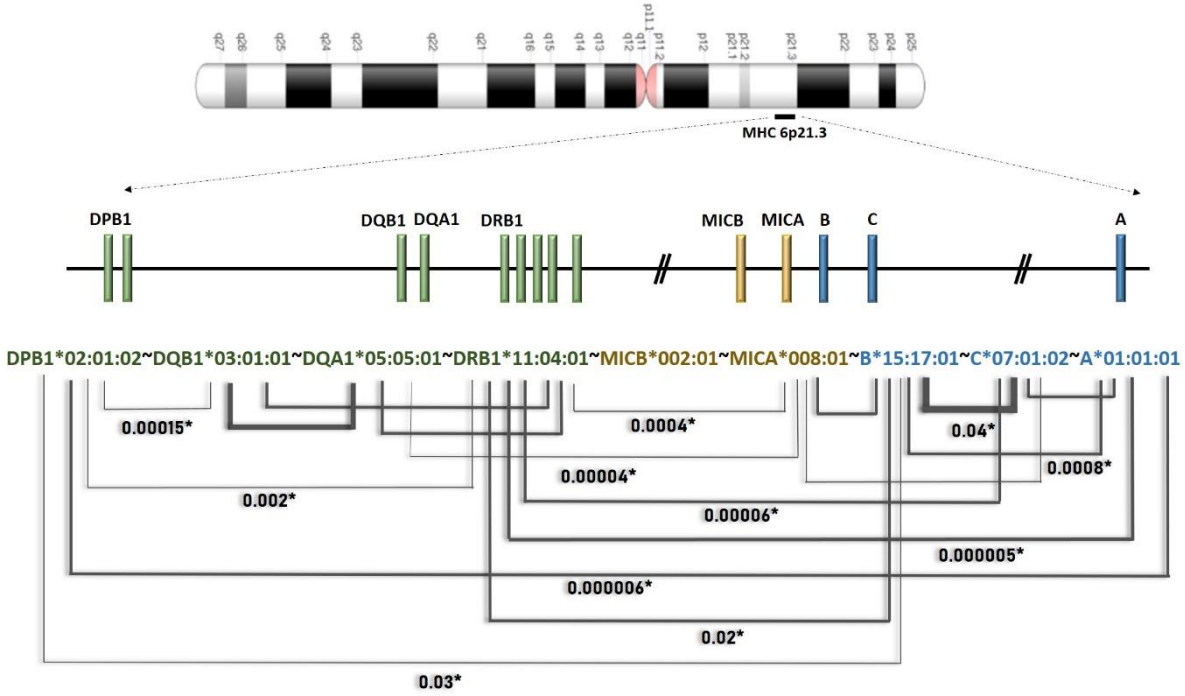
Основната научна хипотеза на настоящия дисертационен труд, е че дълголетието се асоциира с гени, регулиращи имунологичните функции, като полиморфизмът на тези гени може да повлияе процесите на „успешно остаряване“ и дълголетие чрез модулиране на отговора на индивида към живото-застрашаващи заболявания. Класическите, антиген-представящи HLA клас I и клас II молекули играят ключова роля за активирането на придобития имунитет, а некласическите клас I свързани MIC (MICA,MICB) и HLA клас Ib (HLA-E,-F, -G, -H) молекули участват в инициирането на антиген-зависим и антиген-независим имунен отговор, като по този начин се осигуряват различни механизми за защита на организма срещу инфекциозни, автоимунни заболявания и тумори. Изхождайки от значението на класическите и некласическите HLA в инициирането и регулирането на имунния отговор, изследването на полиморфизма на тази група гени при клинично здрави възрастни индивиди от

българската популация позволи откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към заболявания.

В настоящата работа, за пръв път чрез използване на PCR-базирани и ново въведената от нас хибридизационна технология секвениране от следващо поколение се анализира полиморфизма на некласическите MIC и HLA клас Ib гени на алелно и хаплотипно ниво, и се идентифицират разширени HLA профили при здрави възрастни индивиди от българската популация. Допълнително, бе анализиран полиморфизма на класическите HLA клас I и клас II гени в разширена група здрави индивиди от българската популация. Една от целите на настоящия дисертационен труд е освен откриване на нови и потвърждаване на стари наблюдавани асоциации с процесите на успешно стареене при индивиди от българската популация, е и да разширят познанията ни отвъд рамките на класическите HLA клас I и клас II, обхващайки и некласическите HLA клас I гени. Определен е MICA и MICB полиморфизма при индивиди диагностицирани с агресивната неоплазия орален спиноцелуларен карцином, чиято честота на поява се увеличава с напредване на възрастта и е извършен сравнителен анализ с контролна група здрави индивиди от българска популация и селекционирана група здрави възрастни индивиди. Основната научна хипотеза на извършените сравнения е, че различни полиморфизми стоят в основата на различните наблюдавани ефекти – дълголетие, здраве и патология.

На алелно ниво силна позитивна асоциация с дълголетието е установена за ***MICB*002:01*** алелната специфичност, която се откроява с висока честота при дълголетници от българската популация. Сравнително малко популации в световен мащаб са изследвали MICB полиморфизма, като основната част от проучванията са концентрирани в югоизточните азиатски популации. От наличните данни към днешна дата на алелно ниво MICB*002:01 е описан като протективен алел при СЛЕ и РА (1,2). Описана е и протективната роля на този алел при бактериални и вирусни инфекции (3-4). При дълголетници от българската популация, силна позитивна асоциация с дълголетието се установява за няколко MICA*008:01 хаплотипни асоциации. Въпреки множеството сведения за ролята на MICA*008 и характерния за него A5.1 TM полиморфизъм в избягването на антитуморен имунен отговор, високата честота на срещане на този алел в световен мащаб, предполага неговата позитивна селекция в хода на еволюцията. Освен това по-голямата част от проучванията са концентрирани върху изследването на самостоятелния ефект на MICA полиморфизма, без да вземат предвид други близко разположени локуси намиращи се в неравновесна скаченост. И наистина,

въпреки че MICA*008:01 е най-често представената MICA алелна специфичност и в двете изследвани групи, при дълголетници и млади индивиди този алел се характеризира с два различни модела на значима неравновесна асоциация с класическите HLA алели. Такива различия между двете изследвани групи в модела на значими неравновесни асоциации, се установяват и за други алели в хода на настоящата работа, което подчерта значението на изследването на разгърнати хаплотипи, а не на индивидуални полиморфизми засягащи отделни локуси, за правилна интерпретация на наблюдаваните резултати. Установена е позитивна асоциация с дълголетието за разгърнатия хаплотип ***HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02***.



Фигура 48. Разгърнат HLA-A, -B, -C, -MICA, -MIB, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1 хаплотип, позитивно асоцииран с дълголетието при здрави, възрастни индивиди от българската популация. *Алели в състава на разгърнатия хаплотип, между които се установя наличие на значима, неравновесна скаченост са представени като са свързани с линии. Широчината на линията свързваща два алела, отговаря на силата на установената неравновесна връзка между тях.*

**За дву-локусни хаплотипи, наблюдавани със статистически значима повишена честота ($p \leq 0.05$) в изследваната група от здрави възрастни индивиди от българската популация, са представени и съответните p стойности.*

Анализ на алелните и хаплотипните честоти, засягащ само класическите HLA клас I гени, в голяма група от здрави индивиди от българската популация - 94 възрастни и 541 млади – потвърждава високата честота на поява при дълголетници, на някой от алелите и хаплотипите описани в състава на горе изложения разгърнат

хаплотип. Извършеният анализ потвърди и някой установени класически HLA асоциации с дълголетието при предходни проучвания на научния колектив, изследващи здрави възрастни индивиди от българската популация. HLA-C*07 алелната група в състава на хаплотипа, е асоциирана с по-добро изчистване на CMV инфекция. При носителите на A*01:01 алелната специфичност се наблюдава предизвикване на силен, цитотоксичен Т клетъчен имунен отговор към консервативни епитопи, срещани при аденовируси и туморни антигени. HLA-DRB1*11:04:01, DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01 алелите в състава на хаплотипа са описани като протективни в българската и други популации при редица заболявания: автоимунни заболявания (ювенилен идиопатичен артрит, множествена склероза, диабет тип 1, системен лупус еритроматозус), астма, хепатит С (DRB1*11); диабет тип 1 и цьолиакия при кавказоиди (DQA1*05:05-DQB1*03:01). Отделните алели и хаплотипи в състава на описания разгърнат хаплотип са описани в редица асоциативни проучвания като протективни или предразполагащи фактори в различни популации. Освен със силно изразена популационната вариация определяща се от населената географска територия, HLA генетичния комплекс се характеризира с изключително сложна генетична организация. В контекста на получените данни, вероятно въпреки асоциацията на определени алели с патологични процеси, то намирането им в хаплотип с алелни специфичности осигуряващи протекция срещу дадени заболявания, осигурява благоприятната им изява. Ето защо извършването на популационно специфични проучвания, изследващи алелния/хаплотипен HLA полиморфизъм и определящи разгърнати хаплотипни профили, е от изключително значение, за правилната интерпретация на наблюдаваните за българската популация асоциации с процесите на здраво остаряване. За некласическите HLA клас Ib са изведени някой тенденции към повишена честота на определени алели и хаплотипи при дълголетници, но тяхното доказване следва да се извърши в по-голяма група от изследвани индивиди. При извършения сравнителен анализ засягащ пациенти с OSCC и две групи представители на здравата българска популация, характеризиращи се с различен възрастов диапазон на включените здрави индивиди, се открояват алели и хаплотипи асоциирани поотделно със стареенето и такива с тенденция към протекция или предразположение за развитие на OSCC.

Имунологичното стареене, като направление в науката набира все повече интерес, както в научните среди, така и в секторите за здравни грижи. Независимо от това, че имунологичното стареене е сравнително млада наука, много до този етап е открито и описано. Преминаването от описателната фаза на изследването, през

намирането на причинно-следствени връзки и прилагането им в терапии е от изключителна значение предвид нарастващата средна възраст на популацията. Това ще позволи избягването на заболяванията и увреждания настъпващи с напредване на възрастта, както и поддържането на оптимални физиологични и имунологични функции във възрастните индивиди. Идентифицирането на разширени HLA профили е от значение за по-добро разбиране на генетичната основа на процесите свързани с „успешно стареене“ и по-добро разбиране на механизмите отговорни за възрастово-асоциираната дисфункция на имунната система, което от своя страна е ключът към успешното имунологично възстановяване в бъдеще и достигането на дълголетие.

ИЗВОДИ

1. Въведеният нов хибридизационен NGS подход се характеризира с лесно изпълнение на метода, по-кратко технологично време, преодоляване на някой от ограниченията на PCR-базираните NGS подходи (алелен дисбаланс, отпадане на алели) и възможност за едновременно анализиране на класически и некласически HLA гени в една реакция.
2. Позитивна асоциация с процесите на успешно стареене се установява за няколко класически HLA клас I и клас II алели: HLA-C*07:01:02 и -DRB1*04:10:01 и хаплотипи, описани като протективни за автоимунни заболявания в българската популация и включващи HLA-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01.
3. Алелното разпределение на некласическите HLA клас Ib (HLA-E, -F, -G, -H) и клас I свързаните MICA и MICB гени при здрави индивиди от българската популация е в съответствие с това описано в други Европейски популации. Най-голяма степен на полиморфизъм е установена за MICA локуса с 36 наблюдавани алела, а най-ниска за HLA-F с три алела.
4. На алелно и хаплотипно ниво силна позитивна асоциация с дълголетието се установява за MICB*002:01, който е описан като протективен за системен лупус еритематозус и ревматоиден артрит.
5. Статистически значима повишена честота при възрастни е установена за хаплотипи, включващи MICA*008:01 алелът, кодиращ скъсен протеин: HLA-A*01:01:01-MICA*008:01, -MICA*008:01-DRB1*11:04:01, -MICA*008:01-DRB1*13:01:01, -MICA*008:01-DQA1*05:05:01, -MICA*008:01-DQB1*03:01:01, -MICA*008:01-DQB1*06:03:01 и -MICA*008:01-DPB1*02:01:02.
6. Установена е позитивна асоциация с дълголетието за разгърнатия хаплотип HLA-A*01:01:01-C*07:01:02-B*15:17:01-MICA*008:01-MICB*002:01-DRB1*11:04:01-DQA1*05:05:01-DQB1*03:01:01-DPB1*02:01:02, в чиито състав влизат алели и хаплотипни описани като протективни за заболявания в българската и други популации.
7. При пациенти с орален спиноцелуларен карцином е установена силна предразполагаща асоциация за MICB*019 алелната специфичност.
8. Нивата на секреторни MICA и MICB молекули не са асоциирани с предразположеност и стадий на орален спиноцелуларен карцином.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. World health organization. Ageing and health. A review [online]. 2018 [cited 2018 Feb 5] Available from: URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health. 2018;2018.
2. Naumova E, Ivanova M, Pawelec G. Immunogenetics of ageing. Int J Immunogenet. 2011;38(5):373–81.
3. Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G, Lo C. The Hallmarks of Aging. Cell. 2013;153(6):1194–1217.
4. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. 2014;69:4–9.
5. Lucia P, Antonino M, Giuseppe C, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging : The Role of Cytokines in Extreme Longevity. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2015;
6. Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens. 2009;74(5):101–16.
7. Choo SY. The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Vol. 48, Yonsei Medical Journal. 2007. p. 11–23.
8. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: Allele variant databases. Nucleic Acids Res. 2015;43(D1):D423–31.
9. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map : expression , interaction , diversity and disease. J Hum Genet. 2009;54:15–39.
10. Rodgers JR, Cook RG. MHC CLASS IB MOLECULES BRIDGE INNATE AND ACQUIRED IMMUNITY. Nat Rev Immunol. 2005;5(June):459–71.
11. Dawkins R, Gaudieri S, Hui J. Genomics of the major histocompatibility complex : haplotypes , duplication , retroviruses and disease. Immunol Rev. 1999;167:275–304.
12. Наумова, Елисавета, Иванова, Милена. Главен комплекс за тъканна съвместимост. София, Лице, 2006. 17 с. 2006;2006.
13. Laethem F Van, Tikhonova AN, Singer A. MHC restriction is imposed on a diverse TCR repertoire by CD4 and CD8 coreceptors during thymic selection. Trends Immunol. 2012;33(9):437–41.
14. Halenius A, Gerke C, Hengel H. Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus : so many targets — but how many arrows in the quiver ? Cell Mol Immunol. 2014;1–15.
15. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung H, et al. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon- h in vitro and in vivo : rationale for the therapy of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2005;159:155–64.
16. Comiskey M, Goldstein CY, Fazio SR De, Mammolenti M, Newmark JA, Warner CM. Evidence That HLA-G is the Functional Homolog of Mouse Qa-2 , the Ped Gene Product. Hum Immunol. 2003;64:999–1004.
17. Winchester RJ. The major histocompatibility complex [Internet]. Third Edit. Clinical Immunology (Third Edition) Principles and Practice. Elsevier; 2008. 79–90 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-04404-2.10005-3
18. Creelan BC, Antonia SJ. The NKG2A immune checkpoint — a new direction in cancer immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2018; Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0182-8
19. Kanevskiy L, Erokhina S, Kobyzeva P, Streltsova M, Sapozhnikov A, Kovalenko E. Dimorphism of HLA-E and Its Disease Association. Int J Mol Sci. 2019;1–16.
20. Garc P, Llano M, Heredia B De, Willberg CB, Aparicio P. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. Eur J Immunol. 2002;32:936–44.
21. Romagnani C, Pietra G, Falco M, Mazzarino P, Moretta L, Mingari MC. HLA-E – Restricted Recognition of Human Cytomegalovirus by a Subset of Cytolytic T Lymphocytes. Hum Immunol. 2004;65:437–45.
22. Heinzel AS, Grotzke JE, Lines RA, Lewinsohn DA, Mcnabb AL, Streblow DN, et al. HLA-E – dependent Presentation of Mtb-derived Antigen to Human CD8 ∂ T Cells. J Exp Med.

2002;196(11):1473–81.
23. Housseau F, Bright RK, Simonis T, Nishimura I, Topalian SL. Recognition of a Shared Human Prostate Cancer-Associated Antigen by Nonclassical MHC-Restricted CD8 + T Cells. J Immunol. 1999;163:6330–6337.
24. Goldman-Wohl, D. S., Ariel, I., Greenfield, C., Hanoch, J., & Yagel S. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: A lesson learned from ectopic pregnancies. Mol Hum Reprod. 2000;6(6):535–540.
25. Li J, Koike-Soko C, Sugimoto J, Yoshida T, Okabe M, Nikaido T. Human amnion-derived stem cells have immunosuppressive properties on NK cells and monocytes. Cell Transplantation. 2014;
26. Hviid T V., Larsen LG, Hoegh AM, Bzorek M. HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. Am J Reprod Immunol. 2004;52(3):212–7.
27. Favier B, Lemaoult J, N. R-F, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update. Tissue Antigens. 69:207–211.
28. Carosella ED, Rouas-freiss N, Roux DT, Moreau P, Lemaout J. HLA-G : An Immune Checkpoint Molecule [Internet]. 1st ed. Advances in Immunology. Elsevier Inc.; 2015. 33–144 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/bs.ai.2015.04.001
29. Clark GF, Schust DJ. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. Front Immunol. 2013;4(February):1–15.
30. Favier B, Lemaoult J, D. CE. Functions of HLAG in the immune system. Tissue Antigens 2. 69((Suppl. 1)):150–15.
31. X Z, A L, JG Z, WG B, DP X, YY R, et al. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2013;132:82–9.
32. M T, JA L, X G, E S, SL H, JL T, et al. The principal genetic determinants for nasopharyngeal carcinoma in China involve the HLA class I antigen recognition groove. PLoS Genet. 2012;
33. MY W, SJ H, F Y, XT Q, D L, Y D, et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma susceptibility with single nucleotide polymorphism analysis using next-generation sequencing technology. Oncotarget. 2017;8:52708–23.
34. Lunemann S, Schöbel A, Kah J, Fittje P, Hölzemer A, Langeneckert AE, et al. Interactions Between KIR3DS1 and HLA-F Activate Natural Killer Cells to Control HCV Replication in Cell Culture. Gastroenterology [Internet]. 2018;155(5):1366-1371.e3. Available from: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.019
35. Laaribi AB, Hannachi N, Ben Yahia H, Marzouk M, Mehri A, Belhadj M, et al. Human leukocyte antigen (HLA-F) polymorphism is associated with chronic HBV infection. 3 Biotech [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: https://doi.org/10.1007/s13205-017-1079-9
36. Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. HLA-F Complex without Peptide Binds to MHC Class I Protein in the Open Conformer Form. J Immunol. 2010;184(11):6199–208.
37. Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. HLA-F and MHC Class I Open Conformers Are Ligands for NK Cell Ig-like Receptors. J Immunol. 2013;191(7):3553–62.
38. Dulberger CL, McMurtrey CP, Hölzemer A, Neu KE, Liu V, Steinbach AM, et al. Human Leukocyte Antigen F Presents Peptides and Regulates Immunity through Interactions with NK Cell Receptors. Immunity. 2017;46(6):1018-1029.e7.
39. Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H. Comparative genomic analysis of the MHC : the evolution of class I duplication blocks , diversity and complexity from shark to man. Immunol Rev. 2002;190:95–122.
40. Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics. 1996;44(1):80–1.
41. Zhang J, Basher F, Wu JD. NKG2D ligands in tumor immunity: Two sides of a coin. Front Immunol. 2015;6(MAR):1–8.
42. Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. Carcinogenesis. 2014;35(12):2633–42.
43. Choy M-K, Phipps M. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. Trends Mol Med. 2010;16(3).
44. Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Fuertes M, et al. Broad MICA / B

Expression in the Small Bowel Mucosa : A Link between Cellular Stress and Celiac Disease. 2013;8(9).
45. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. sci. 1999;285:727–9.
46. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. J Mol Diagnostics. 2001;3(3):98–104.
47. Poluektov YO, Kim A, Sadegh-nasseri S. HLA-DO and its role in MHC class II antigen presentation. Front Immunol. 2013;4(August):1–6.
48. Fernando MMA, Vyse TJ. Systemic Lupus Erythematosus (Fifth Edition). 2011. 3–19 p.
49. Doxiadis GGM, Hoof I, Groot N De, Bontrop RE. Evolution of HLA-DRB Genes. Mol Biol Evol. 2012;29(12):3843–53.
50. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases Nucleic Acids Research (2015) 43 :D423-431. 2015;2015.
51. Mungall* AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. Nature. 2003;425(6960):805–12.
52. Little AM, Parham P. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. Rev Immunogenet. 1999;1(1):105–23.
53. Owen J, Punt J, Stranford SA, Jones PP. Kuby Immunology (Seventh edition). 2013.
54. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Blumenstiel B, Higgins J, et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. Science (80-). 2002;296(5576):2225–9.
55. Hildesheim A, Apple RJ, Chen C, Wang SS, Klitz W, Mack SJ, et al. Association of HLA Class I and II Alleles and Extended Haplotypes With Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan. J Natl Cancer Inst. 2002;94(23):1780–9.
56. Erlich HA. HLA Polymorphism and Disease Susceptibility. Computational Genetics and Genomics. 2005. 255–268 p.
57. Ellis MC, Hetisimer AH, Ruddy DA, Hansen SL, Kronmal GS, McClelland E, et al. HLA class II haplotype and sequence analysis support a role for DQ in narcolepsy. Immunogenetics. 1997;46(5):410–7.
58. Bettencourt A, Carvalho C, Leal B, Brás S, Lopes D, Martins A, et al. The Protective Role of HLA-DRB1 ∗ 13 in Autoimmune Diseases. J Immunol Res. 2015;2015:6.
59. Candore G, Assunta M, Lio D, Colonna-romano G, Listì F, Paola M, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8 . 1 ancestral haplotype : a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. Biomed Pharmacother. 2003;57:274–7.
60. DAVIDSON A, DIAMOND B. AUTOIMMUNE DISEASES. N Engl J Med. 2001;345(5):340–50.
61. Aiello CMGA, Caruso GAC. Autoimmune diseases and 8.1 ancestral haplotype: An update. HLA immune response Genet. 2018;(February):1–7.
62. Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: Effect of multiple gene interactions. Autoimmun Rev. 2002;1(1–2):29–35.
63. Caruso C, Candore G, Colonna Romano G, Lio D, Bonafè M, Valensin S, et al. HLA, aging, and longevity: A critical reappraisal. Hum Immunol. 2000;61(9):942–9.
64. Price P, Alicock R. The genetic basis for the association of the 8 . 1 ancestral haplotype (Al , B8 , DR3) with multiple immunopathological diseases. Immunol Rev. 1999;167:257–74.
65. Garcia-Merino A, Alper CA, Usuku K, Marcus-Bagley D, Lincoln R, Awdeh Z, et al. Tumor necrosis factor (TNF) microsatellite haplotypes in relation to extended haplotypes, susceptibility to diseases associated with the major histocompatibility complex and TNF secretion. Hum Immunol. 1996;50(1):11–21.
66. Lio D, Candore G, Colombo A, Colonna Romano G, Gervasi F, Marino V, et al. A genetically determined high setting of TNF-α influences immunologic parameters of HLA-B8,DR3 positive subjects: Implications for autoimmunity. Hum Immunol. 2001;62(7):705–13.
67. Gambelunghe G, Brozzetti AL, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A. MICA A8: a New Allele Within MHC Class I Chain-Related A Transmembrane Region With Eight GCT Repeats. Hum

Immunol. 2006;67(12):1005–7.
68. Rueda B, Pascual M, López-Nevot MA, González E, Martín J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. Tissue Antigens. 2002;60(6):526–8.
69. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. Adv Immunol [Internet]. 2000;76:1–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079097
70. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1997;94(4):1298–303. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
71. Martinez-Chamorro A, Moreno A, Gómez-García M, Cabello MJ, Martin J, Lopez-Nevot MA. MICA*A4 protects against ulcerative colitis, whereas MICA*A5.1 is associated with abscess formation and age of onset. Clin Exp Immunol. 2016;184(3):323–31.
72. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. Biochem J [Internet]. 2013;454(2):295–302. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20130194
73. Li Z, Groh V, Strong RK, Spies T. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. Immunogenetics. 2000;51(3):246–8.
74. Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, et al. Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. Tissue Antigens. 2001;57(6):520–35.
75. Huang Y, Tan Y, Xu X, Wei Y, Xia W, Ye X. Identification of a novel allele, MICA*063N, in a Chinese lung cancer patient. Tissue Antigens. 2011;78(4):297–8.
76. Zhang S, Wang J, Luo M, Li X, Chen Q. A novel allele: MICA*064N with a stop codon in exon 4. Tissue Antigens. 2012;79(4):313–4.
77. Schroeder M, Elsner HA, Kim TD, Blasczyk R. Eight novel MICB alleles, including a null allele, identified in gastric MALT lymphoma patients. Tissue Antigens. 2004;64(3):276–80.
78. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. The HLA FactsBook, Academic Press. 2000.
79. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Carrington MN, Erlich HA, Fernández-Vina M, et al. Nomenclature for Factors of the HLA System [Internet]. 2019. Available from: http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html
80. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. Curr Diab Rep. 2012;11(6):533–42.
81. Marsh S, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Dupont B, Erlich H, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens. 2010;75:291–455.
82. Carapito R, Radosavljevic M, Bahram S. Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. Hum Immunol [Internet]. 2016;77(11):1016–23. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.04.002
83. Kishore A, Petrek M. Next-Generation Sequencing Based HLA Typing: Deciphering Immunogenetic Aspects of Sarcoidosis. Front Genet. 2018;9(October):1–8.
84. Zhou F, Cao H, Zuo X, Zhang T, Zhang X, Liu X, et al. Deep sequencing of the MHC region in the Chinese population contributes to studies of complex disease. Nat Genet. 2016;48(7):740–6.
85. Hopp A, Rupp A, Lukacs-kornek V. Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. Front Immunol. 2014;5(February):1–14.
86. Heemst J Van, Jansen DTSL, Polydorides S, Moustakas AK, Bax M, Bontrop-elferink G, et al. Crossreactivity to vinculin and microbes provides a molecular basis for HLA-based protection against rheumatoid arthritis. Nat Commun. 2015;(May).
87. Nishino S, Okuro M, Kotorii N, Anegawa E, Ishimaru Y, Matsumura M. Hypocretin / orexin and narcolepsy : new basic and clinical insights. Acta Physiol. 2010;209–22.
88. Karan MA, Tascioglu NE, Ozturk AO, Palanduz S, Carin M. The role of HLA antigens in

chronic hepatitis B virus infection. J Pak Med Assoc. 2002;52(6):253–6.
89. Wu Y, Wang L, Lee T, Lin HH, Hu C, Cheng M, et al. HLA Phenotypes and Outcomes of Hepatitis B Virus Infection in Taiwan. J Med Virol. 2004;72:17–25.
90. Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. World J Gastroenterol. 2003;9(10):2221–5.
91. Meng XQ, Chen HG, Ma YL, Liu KZ. Influence of HLA class II molecules on the outcome of hepatitis B virus infection in population of Zhejiang Province in China. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2003;2(2):230–3.
92. Cheng Y qiao, Lin J sheng, Huang L hong, Tian D ying, Xiong P. The association of HLA-DRB1 allele polymorphism with the genetic susceptibility to liver cirrhosis due to hepatitis B virus. Chinese J Med Genet. 2003;20(3):247–9.
93. Han YN, Yang JL, Zhen SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. World J Gastroenterol. 2005;11(36):5721–4.
94. Popov EA, Levitan BN, Alekseev LP, Pronina OA, Suchkov S V. Immunogenetic HLA markers of chronic viral hepatitides. Ter Arkh. 2005;77(2):54–9.
95. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, et al. Comprehensive Analysis of Class I and Class II HLA Antigens and Chronic Hepatitis B Virus Infection. J Virol. 2003;77(22):12083–7.
96. Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, et al. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. Hepatology. 1998;27(1):240–4.
97. Aikawa T, Kojima M, Onishi H, Tamura R, Fukuda S, Suzuki T, et al. HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. J Med Virol. 1996;49(4):274–8.
98. Yoshizawa K, Ota M, Saito S, Maruyama A, Yamaura T, Rokuhara A, et al. Long-term follow-up of hepatitis C virus infection: HLA class II loci influences the natural history of the disease. Tissue Antigens. 2003;61(2):159–65.
99. Higashi Y, Kamikawaji N, Suko H, Ando M. Analysis of HLA alleles in japanese patients with cirrhosis due to chronic hepatitis c. J Gastroenterol Hepatol. 1996;11(3):241–6.
100. Bondarenko AL, Baramzina S V. Role of HLA phenotype in the formation of chronic hepatitis C virus infection. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002;(2):55–7.
101. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. Lancet. 1999;354:2119–24.
102. Scotto G, Fazio V, D'Allessandro G, Monno L, Saracino A, Palumbo E, et al. Association between HLA class II antigens and hepatitis C virus infection. J Biol Regul Homeost Agents. 2003;17(4):316–21.
103. Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. J Hepatol. 1999;30(6):984–9.
104. Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, et al. Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus-related chronic liver disease. Hepatology. 1999;29(4):1272–9.
105. Ogusku MM, Porto M. Alleles of HLA-DRB1*04 Associated with Pulmonary Tuberculosis in Amazon Brazilian Population. PLoS One. 2016;92:1–13.
106. López-Larrea C, Mijiyawa M, González S, Fernández-Morera JL, Blanco-Gelaz MA, Martínez-Borra J, et al. Association of ankylosing spondylitis with HLA-B*1403 in a West African population. Arthritis Rheum. 2002;46(11):2968–71.
107. Wei JCC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. Rheumatology. 2004;43(7):839–42.
108. Jaakkola E, Herzberg I, Laiho K, Barnardo MCNM, Pointon JJ, Kauppi M, et al. Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2006;65(6):775–80.
109. Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, et al. Interaction between

ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. Nat Genet. 2011;43(8):761–7.
110. Fiorillo MT, Dupuis ML, Sorrentino R, Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, et al. restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis Find the latest version : self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. 2000;106(1):47–53.
111. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. Mol Immunol [Internet]. 2014;57(1):44–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013
112. Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W, Damle A, Xiao X, et al. Dissecting the Genetic Complexity of the Association between Human Leukocyte Antigens and Rheumatoid Arthritis. Am J Hum Genet. 2002;71:585–94.
113. Sandoughi M, Fazaeli A, Bardestani G, Hashemi M. Frequency of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis patients in Zahedan, southeast Iran. Ann Saudi Med. 2011;31(2):171–3.
114. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An Approach to Understanding The Molecular Genetics of Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 1987;30.
115. Drongelen V Van. Human Leukocyte Antigen – Disease Associations in Rheumatoid Arthritis. Rheum Dis Clin NA [Internet]. 2017;43(3):363–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2017.04.003
116. Korendowych E, Dixey J, Cox B, Jones S, McHugh N. The Influence of the HLA-DRB1 rheumatoid arthritis shared epitope on the clinical characteristics and radiological outcome of psoriatic arthritis. J Rheumatol. 2003;30(1):96–101.
117. Mil AHMVDH, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Vries RP De, Toes EM. An Independent Role of Protective HLA Class II Alleles in Rheumatoid Arthritis Severity and Susceptibility. ARTHRITIS Rheum. 2005;52(9):2637–44.
118. Woude D Van Der, Lie BA, Lundstro E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-duistermaat JJ, et al. Protection Against Anti–Citrullinated Protein Antibody–Positive Rheumatoid Arthritis Is Predominantly Associated With HLA–DRB1*1301. ARTHRITIS Rheum. 2010;62(5):1236–45.
119. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, et al. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population : effects of * 09:01 allele on disease phenotypes. Rheumatology. 2013;52(February):1172–82.
120. Varney MD, Valdes AM, Carlson JA, Noble JA, Tait BD, Bonella P, et al. HLA DPA1, DPB1 Alleles and Haplotypes Contribute to the Risk Associated With Type 1 Diabetes. Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. Diabetes. 2010;59(August):2055–62.
121. Noble JA, Valdes AM, Varney MD, Carlson JA, Moonsamy P, Fear AL, et al. HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes. Results From the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Diabetes. 2010;59:2972–9.
122. Cruz TD, Valdes AM, Santiago A, Llado TF De, Raffel LJ, Zeidler A, et al. DPB1 Alleles Are Associated With Type 1 Diabetes Susceptibility in Multiple Ethnic Groups. Diabetes. 2004;53(August):9–12.
123. Antigens HL, Lupus S. 1. Antigens HL, Lupus S. Human Leukocyte Antigens and Systemic Lupus Erythematosus : A Protective Role for the HLA-DR6 Alleles DRB1*13:02 and *14:03. PLoS One. 2014;9(2):1–7.
124. Niu Z, Zhang P, Tong Y. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis : a meta-analysis. Int J Rheum Dis. 2014;1–12.
125. Reinders J, Rozemuller EH, Otten HG, van der Veken LTJN, Slootweg PJ, Tilanus MGJ. HLA and MICA associations with head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2007;43(3):232–40.
126. Poulain M, Pes GM, Grasland C, Carru C, Ferrucci L, Baggio G, et al. Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: The AKEA study. Exp Gerontol. 2004;39(9):1423–9.
127. Piazza A, Olivetti E, Rm G, Rendine S, Amoroso A, Barbanti M, et al. The distribution of HLA antigens in Italy. Gene Geogr. 1989;3(2–3):141–64.

128. Ferlazzo V, Lio D, Mario G, Carru C, Listı F, Candore G, et al. Association between the HLA-DR alleles and longevity : a study in Sardinian population. Exp Gerontol. 2003;38:313–8.
129. Bera O, Cabre P, Alizadeh M, Smadja D, Jugde F, Edan G, et al. Genetic and functional studies in multiple sclerosis patients from Martinique attest for a specific and direct role of the HLA-DR locus in the syndrome. Tissue Antigens. 2003;61:166–71.
130. Scholz EM, Marcilla M, Daura X, Arribas-Layton D, James EA, Alvarez I. Human Leukocyte Antigen (HLA)-DRB1*15:01 and HLA-DRB5*01:01 Present Complementary Peptide Repertoires. Front Immunol. 2017;8(August):1–12.
131. Handunnetthi L, Ramagopalan S V, Ebers GC. Multiple sclerosis , vitamin D , and HLA-DRB1*15. Neurology. 2010;74:1905–10.
132. Mosca L, Mantero V, Mantia L La, Marazzi MR. HLA-DRB1 * 15 association with multiple sclerosis is confirmed in a multigenerational Italian family. Funct Neurol. 2017;32(2):83–8.
133. Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. VIRAL HEPATITIS HLA and Cytokine Gene Polymorphisms Are Independently Associated With Responses to Hepatitis B Vaccination. Hepatology. 2004;39:978–88.
134. Yang G, Liu J, Han S, Xie H, Du R, Yan Y, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DRB1 genotyping in Shaanxi Han patients in northwestern China. Tissue Antigens. 2007;69:170–5.
135. Akisaka M, Suzuki M, Akisakal M, Suzuki M. Molecular genetic studies on DNA polymorphism of the HLA class II genes associated with human longevity. 1997;489–93.
136. Willcox BJ, Willcox DC, He Q, Curb JD, Suzuki M. Siblings of Okinawan Centenarians Share Lifelong Mortality Advantages. J Gerontol. 2006;61(4):345–54.
137. Rea IM, Middleton D. Is the Phenotypic Combination A1B8Cw7DR3 a Marker for Male Longevity? J Am Geriatr Soc. 1994;42(9):978–83.
138. Ross OA, Curran MD, Rea IM, Hyland P, Duggan O, Barnett CR, et al. HLA haplotypes and TNF polymorphism do not associate with longevity in the Irish. Mech Ageing Dev. 2003;124(4):563–7.
139. Scola L, Lio D, Candore G, Forte GI, Crivello A, Colonna-Romano G, et al. Analysis of HLA-DRB1,DQA1,DQB1 haplotypes in Sardinian centenarians. Exp Gerontol. 2008;43(2):114–8.
140. Naumova E, Pawelec G, Ivanova M, Constantinescu I, Bogunia-Kubik K, Lange A, et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report on the immunogenetics of aging. Tissue Antigens. 2007;69(SUPPL. 1):304–10.
141. PROUST J, MOULIAS R, FUMERON F, BEKKHOUCHA F, BUSSON M, SCHMID M, et al. HLA and longevity. Tissue Antigens. 1982;19:168–73.
142. Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Lio D, Listì F, Vasto S, et al. Gender-Related Immune-Inflammatory Factors, Age-Related Diseases, and Longevity. Rejuvenation Res. 2010;13(2–3):292–7.
143. Lagaay AM, D Amaro J, Ligthart GJ, Schreuder GM V, Rood JJ HW. Longevity and heredity in humans. Association with the human leucocyte antigen phenotype. Ann N Y Acad Sci. 1991;621:78–89.
144. Ivanova R, Hénon N, Lepage V, Charron D, Vicaut E, Schächter F. HLA-DR alleles display sex-dependent effects on survival and discriminate between individual and familial longevity. Hum Mol Genet. 1998;7(2):187–94.
145. Soto-Vega E, Richaud-Patin Y, Llorente L. Human leukocyte antigen class I, class II, and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in a healthy elder Mexican Mestizo population. Immun Ageing [Internet]. 2005;2:13. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1291388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
146. Papasteriades C, Boki K, Pappa H AS, Papasteriadis E EJ. HLA phenotypes in healthy aged subjects. Gerontology. 1997;43:176–81.
147. Kraat YJ, Christiaans MHL, Nieman FHM, Berg-Loonen PM van den, Hooff JP van, Bruggeman CA. Risk factors for cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients : HLA-DR7 and triple therapy. Transpl Int. 1994;7:362–7.
148. Schrier RD, Freeman WR, Wiley CA, Mccutchan JA. Immune Predispositions for Cytomegalovirus Retinitis in AIDS. J Clin Invest. 1987;95:1741–6.

149. Almarri A, Batchelor R. HLA and hepatitis B infection. Lancet. 1994;344:1194–5.
150. Hill AVS. THE IMMUNOGENETICS OF HUMAN INFECTIOUS DISEASES. Annu Rev Immunol. 1998;16(593):593–617.
151. Fernandez-arquero M, Figueredo MA, Maluenda C, Concha EG De. HLA-Linked Genes Acting as Additive Susceptibility Factors in Celiac Disease. Hum Immunol. 1995;300:295–300.
152. Zeliszewski D, Mougenot JF, Dormoy A, Gaudebout C, Tongio MM, Baudon JJ, et al. Reevaluation of the Relative Risk for Susceptibility to Celiac Disease of HLA-DRBl,-DQAl, -DQBl, -DPBl, and -TAP2 Alleles in a French Population. Hum Immunol. 1995;8859(95).
153. Michalski JP, McCombs CC, Arai T, Elston RC, Cao T, McCarthf CF, et al. HLA-DR, DQ genotypes of celiac disease patients and healthy subjects from the West of Ireland. Tissue Antigens. 1996;47(9):127–33.
154. Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y, Hirankarn N. Association of HLA-DRB1 * 13 and TNF- a gene polymorphisms with clearance of chronic hepatitis B infection and risk of hepatocellular carcinoma in Thai population. J Viral Hepat. 2007;14:841–8.
155. Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. World J Gastroenterol ISSN. 2007;13(12):1770–87.
156. Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L, et al. HLA DR13 and HCV Vertical Infection. Pediatr Res. 2002;51(6):746–9.
157. Yang F, Sun L, Zhu X, Han J, Zeng Y, Nie C, et al. Identification of new genetic variants of HLA - DQB1 associated with human longevity and lipid homeostasis — a cross - sectional study in a Chinese population. Aging (Albany NY). 2017;9(11):2316–33.
158. Listì F, Caruso C, Colonna-Romano G, Lio D, Nuzzo D, Candore G. HLA and KIR Frequencies in Sicilian Centenarians. Rejuvenation Res [Internet]. 2010;13(2–3):314–8. Available from: http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/rej.2009.0984
159. Ricci G, Colombo C, Ghiazza B, Illeni MT. Association between longevity and allelic forms of human leukocyte antigens (HLA): Population study of aged Italian human subjects. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1998;46(1):31–4.
160. Yong-Xing M, Yue Z, Zan-Shun W, Chuan-Fu W, Su-Ying C, Mao-Tong Z, et al. HLA and longevity or aging among Shanghai Chinese. Mech Ageing Dev. 1997;94(1–3):191–8.
161. Ivanova M, Creary LE, Al Hadra B, Lukanov T, Mazzocco M, Sacchi N, et al. 17th IHIW component “Immunogenetics of Ageing” – New NGS data. Hum Immunol. 2019;80(9).
162. Caruso C, Candore G, Colonna G, Lio D, Bonafe M. Immunogenetics of longevity . Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity ? A review of literature data. Mech Ageing Dev. 2001;122:445–62.
163. Candore G, Caruso C, Colonna-romano G, Lio D. Major Histocompatibility Complex Polymorphisms and Ageing [Internet]. Vol. 4, The Neuroendocrine Immune Network in Ageing. Elsevier Masson SAS; 2004. 91–101 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1567-7443(04)80008-5
164. Ping Yu, Quan Zhu, Chunjing Chen, Xiaoling Fu, Yu Li, Limin Liu, Qizhi Luo FW and YW*. Association between MIC gene polymorphisms and susceptibility of systemic lupus erythematosus. Am J Med Sci. 2017;
165. Abbas M, Berka N, Khraiwesh M, Ramadan A. Autoimmune and Infectious Diseases : Open Access Genetic Polymorphisms of TLR4 and MICA are. 2016;3–8.
166. Wang Y, Li S, Chen C, Luo Q, Li Y, Liu L, et al. MICB * 002 and MICB * 014 protect against rheumatoid arthritis , whereas MICA * 009 and MICA * A6 are associated with rheumatoid arthritis in a Hainan Han Chinese population. Int J Rheum Dis. 2018;5–10.
167. Chen D, Hammer J, Lindquist D, Idahl A, Gyllensten U. A variant upstream of HLA-DRB1 and multiple variants in MICA influence susceptibility to cervical cancer in a Swedish population. Cancer Med. 2014;3(1): 190–.
168. Luo QZ, Lin L, Gong Z, Mei B, Xu YJ, Huo Z, et al. Positive association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism with leukemia susceptibility in the people of Han nationality of Southern China. Tissue Antigens. 2011;78(3):178–84.

169. Viny AD, Clemente MJ, Jasek M, Askar M, Ishwaran H, Nowacki A, et al. MICApolymorphism identified by whole genome array associated with NKG2D-mediated cytotoxicity in T-cell large granular lymphocyte leukemia. Haematologica. 2010;1713–21.
170. Garcîa G, Pêrez AB, Sierra B, Aguirre E, Kikuchi M, Sânchez L, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. Hum Immunol. 2011;72:904–7.
171. Souza CF, Noguti EN, Visentainer JEL, Cardoso RF, Tsuneto LT. HLA and MICA genes in patients with tuberculosis in Brazil. Tissue Antigens. 2011;58–63.
172. Lee H, Bae C, Kim H, Song G. Meta-analysis of the association between functional MICA-TM polymorphisms and systemic lupus erythematosus , rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Z Rheumatol. 2014;1–7.
173. Mariaselvam CM, Boukouaci W, Charron D, Krishnamoorthy R, Tamouza R, Misra DP, et al. Association of MICA-129 polymorphism and circulating soluble MICA level with rheumatoid arthritis in a south Indian Tamil population. 2017;1–8.
174. Kumar N, Sharma G, Kaur G, Tandon N, Bhatnagar S, Mehra N. Major histocompatibility complex class I chain related gene-A microsatellite polymorphism shows secondary association with type 1 diabetes and celiac disease in North Indians. Tissue Antigens. 2012;1–7.
175. Augello G, Balasus D, Fusilli C, Emma MR, Giannitrapani L, Agliastro R. Association Between MICA Gene Variants and the Risk of Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Cancer in a Sicilian Population Sample. J Integr Biol. 2018;22(4):1–9.
176. Michel S, Naegely L, Aouadi I, Kwemou M. A new MHC-linked susceptibility locus for primary Sjögren ' s syndrome : MICA. Oxford Univ Press. 2017;
177. Cho WK, Jung MH, Park SH, Baek IC, Choi H, Kim T, et al. Association of MICA Alleles with Autoimmune Thyroid Disease in Korean Children. 2012;2012.
178. Tamaki S, Kawakami M, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Ishida J ichi, et al. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Immunol [Internet]. 2009;130(3):331–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.09.004
179. Stephens HAF. MICA and MICB genes: Can the enigma of their polymorphism be resolved? Trends Immunol. 2001;22(7):378–85.
180. Suresh P. Membrane-bound versus soluble major histocompatibility complex Class I-related chain A and major histocompatibility complex Class I-related chain B differential expression: Mechanisms of tumor eradication versus evasion and current drug development strate. J Cancer Res Ther [Internet]. 2016;12(4):1224–33. Available from: http://www.cancerjournal.net/text.asp?2016/12/4/1224/176169
181. Quatrini L, Molfetta R, Zitti B, Peruzzi G, Fionda C, Capuano C, et al. Ubiquitin-dependent endocytosis of NKG2D-DAP10 receptor complexes activates signaling and functions in human NK cells. Sci Signal. 2016;8(400):1–11.
182. Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D, et al. Natural killer cells and malignant haemopathies: A model for the interaction of cancer with innate immunity. Cancer Immunol Immunother. 2011;60(1):1–13.
183. Klöß S, Chambron N, Gardlowski T, Arseniev L, Koch J, Esser R, et al. Increased sMICA and TGFβ1 levels in HNSCC patients impair NKG2D-dependent functionality of activated NK cells. Oncoimmunology. 2015;4(11).
184. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, et al. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2008;99(8):1643–9.
185. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, et al. Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. PLoS One. 2012;7(9):5–10.
186. Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain – related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. J Clin Invest [Internet]. 2004;114(4):560–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314693%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC503776

187. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. Int J Cancer. 2006;118(3):684–7.
188. Esteso G, Luzón E, Sarmiento E, Steinle A, Murphy G, Valés-gómez M, et al. Altered MicroRNA Expression after Infection with Human Cytomegalovirus Leads to TIMP3 Downregulation and Increased Shedding of Metalloprotease Substrates, Including MICA. J Immunol. 2014;193:1344-1.
189. Markel G, Imazio M, Koren-morag N, Galore-haskel G, Besser M, Cumetti D, et al. CEACAM1 and MICA as novel serum biomarkers in patients with acute and recurrent pericarditis. Oncotarget. 2016;7(14):17885–95.
190. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, Hiraki A, Suzuki T, Yatabe Y, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. Carcinogenesis. 2008;29(2):316–20.
191. Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M, et al. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. Leukemia. 2007;21(10):2103–8.
192. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, Eberle J, Steinle A, Diederichs S, et al. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. Cancer Res. 2012;72(2):460–71.
193. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. Cancer Res. 2010;70(2):481–9.
194. Douik H, Chaaben A Ben, Romdhane NA, Ben Romdhane H, Mamoghli T, Fortier C, et al. Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population. Hum Immunol [Internet]. 2009;70(1):45–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2008.10.008
195. Isernhagen A, Malzahn D, Bickebï¿½ller H, Dressel R. Impact of the MICA-129Met/val dimorphism on NKG2D-mediated biological functions and disease risks. Front Immunol. 2016;7(DEC):1–9.
196. Fayza A, Arij BC, Olfa B, Nesrine O, Hajer A, Latifa H, et al. MICAMICA-129 Met/Val Variant as Possible Biomarker of Diagnosis and Prognostic of Gastro-Intestinal Tract Carcinomas. J Mol Biomark Diagn. 2017;8(s2).
197. Ouni N, Ben Chaaben A, Kablouti G, Lajnef M, Ayari F, Abaza H, et al. MICA-129Met/Val Polymorphism Is Associated with Early-Onset Breast Cancer Risk. Immunol Invest. 2017;46(6):603–14.
198. Isernhagen A, Schilling D, Monecke S, Shah P, Elsner L, Walter L, et al. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. Immunogenetics. 2016;68(2):109–23.
199. Garavello W, Foschi R, Talamini R, La Vecchia C, Rossi M, Dal Maso L, et al. Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. Int J Cancer. 2008;122(8):1827–31.
200. R M, S. Y. Oral squamous cell carcinoma: etiology,pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. Indian J Cancer. 2006;43:60–6.
201. DP K, PP W, TN P, AK P, SV. C. Mechanisms involved in the down-regulation of TCR zeta chain in tumor versus peripheral blood of oral cancer patients. Int J Cancer. 2009;124:1605–13.
202. Narayan Biswal B, Narayan Das S, Kumar Das B, Rath R. Trends in oral squamous cell carcinoma: Diagnosis for effective, evidence-based treatment 2017. J oral Maxillofac Pathol. 2017;21(3):244–51.
203. Markopoulos AK. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. Open Dent J. 2012;6(1):126–30.
204. J L, DO L, G A. Intra-oral squamous cell carcinoma in Ibadan: a review of 90 cases. Afr J Med Med Sci. 1997;26(3–4):187–8.
205. P S, S S, P. A. Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: An institutional study. Indian J Dent Res. 2010;21(3):316–9.
206. Pires FR, Ramos AB, de Oliveira JBC, Tavares AS, de Luz PSR, dos Santos TCRB. Oral squamous cell carcinoma: Clinicopathological features from 346 cases from a single oral

pathology service during an 8-year period. J Appl Oral Sci. 2013;21(5):460–7.
207. Alves AM, Correa MB, Da Silva KD, De Araújo LMA, Vasconcelos ACU, Gomes APN, et al. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma from a service-based population. Braz Dent J. 2017;28(3):301–6.
208. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. Pathol Oncol Res. 2008;14(1):85–92.
209. Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral Squamous Cell Carcinoma: A Clinicopathologic Review of 233 Cases in Lagos, Nigeria. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(8):1595–9.
210. Liu Chung-Ji, Lee Yann-Jinn, Liu Hsin-Fu, Dang Ching-Wen, Chang Che-Shoa, Leu Yi-Shing CK-W. The increase in the frequency of MICA gene A6 allele in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2002;31:323–8.
211. Reinders J, Rozemuller EH, van der Ven KJW, Caillat-Zucman S, Slootweg PJ, de Weger RA, et al. MHC Class I Chain-Related Gene A Diversity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Hum Immunol. 2006;67(3):196–203.
212. Tamaki S, Sanefuzi N, Ohgi K, Imai Y, Kawakami M, Yamamoto K, et al. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. J Oral Pathol Med. 2007;36(6):351–6.
213. Gauthier L, Blery M. ANTI - MICA ANTIBODIES. Pat Appl Publ. 2017;1(15 / 458, 123).
214. El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and Conflicting Roles of the Human NKG2D Lymphocyte Receptor and Its Ligands in Cancer. J Immunol. 2013;191(4):1509–15.
215. Fernández-messina L, Reyburn HT, Valés-gómez M. Human NKG2D-ligands : cell biology strategies to ensure immune recognition. 2012;3(September):1–10.
216. Aunan JR, Cho WC, Sø K. The Biology of Aging and Cancer : A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. Ageing Dis. 2017;8(5):628–42.
217. Р. У. Тумори в лицево-челюстната и шийна области. 2009.
218. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: The senieur protocol. Mech Ageing Dev. 1984;28(1):47–55.
219. Nunes JM. Using uniformat and gene [rate] to Analyze Data with Ambiguities in Population Genetics. Evol Bioinforma. 2015;11(Ld):19–26.
220. Nunes JM, Riccio ME, Buhler S, Di D, Currat M, Ries F, et al. Analysis of the HLA population data (AHPD) submitted to the 15th International Histocompatibility / Immunogenetics Workshop by using the G ENE [RATE] computer tools accommodating ambiguous data (AHPD project report). Tissue Antigens. 2010;18–30.
221. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-mazas A. The HLA-net G ENE [RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. Tissue Antigens. 2014;(2):307–23.
222. SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.
223. GraphPad Software, San Diego, California USA,. Available from: www.graphpad.com
224. Microsoft Corporation. (2018). Microsoft Excel. Retrieved from https://office.microsoft.com/excel.
225. Klussmeier A, Massalski C, Putke K, Schäfer G, Sauter J, Bahram S, et al. High-Throughput MICA / B Genotyping of Over Two Million Samples : Workflow and Allele Frequencies. Front Immunol. 2020;11(February):1–9.
226. Tang M, Zeng Y, Poisson A, Marti D, Guan L, Zheng Y, et al. Haplotype-dependent HLA susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Southern Chinese population. 2010;334–42.
227. Traversari C, Bruggen P van der, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Pel A Van, et al. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLAA1 by cytolytic t lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. J Exp Med. 1992;176(5):1453–7.
228. Kumar P, Vahedi-Faridi A, Saenger W, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. Conformational changes within the HLA-A1:MAGE-A1 complex induced by binding of a recombinant antibody fragment with TCR-like specificity. Protein Sci. 2009;18(1):37–49.
229. Keib A, Mei Y-F, Cicin-Sain L, Busch DH, Dennehy KM. Measuring Antiviral Capacity of T Cell Responses to Adenovirus. J Immunol. 2019;202(2):618–24.

230. Giam K, Ayala-Perez R, Illing PT, Schittenhelm RB, Croft NP, Purcell AW, et al. A comprehensive analysis of peptides presented by HLA-A1. Tissue Antigens. 2015;85(6):492–6.
231. Asemissen AM, Keilholz U, Tenzer S, Müller M, Walter S, Stevanovic S, et al. Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1. Clin Cancer Res. 2006;12(24):7476–82.
232. Quiñones-Parra S, Grant E, Loh L, Nguyen THO, Campbell KA, Tong SYC, et al. Preexisting CD8+ T-cell immunity to the H7N9 influenza a virus varies across ethnicities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(3):1049–54.
233. Brennan RM, Burrows SR. A mechanism for the HLA-A*01 associated risk for EBV + hodgkin lymphoma and infectious mononucleosis. Blood. 2008;112(6):2589–90.
234. Chen J, Yang F, Zhang Y, Fan X, Xiao H, Qian W, et al. HLA-A*01:01 in MHC is associated with psoriatic arthritis in Chinese Han population. Arch Dermatol Res [Internet]. 2019;311(4):277–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00403-019-01902-3
235. Cucca F, Lampis R, Congia M, Angius E, Nutland S, Bain SC, et al. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. Hum Mol Genet. 2001;10(19):2025–38.
236. Fiorillo MT, Paladini F, Tedeschi V, Sorrentino R. HLA Class i or Class ii and Disease Association : Catch the Difference if You Can. Front Immunol. 2017;8(November):1–5.
237. Chikata T, Murakoshi H, Koyanagi M, Honda K, Gatanaga H, Oka S, et al. Control of HIV-1 by an HLA-B∗52:01-C∗12:02 Protective Haplotype. J Infect Dis. 2017;216(11):1415–24.
238. Thomas GP, Brown MA. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. Immunol Rev. 2010;233:162–80.
239. Beksac M, Gragert L, Fingerson S, Maiers M, Zhang M, Albrecht M, et al. HLA polymorphism and risk of multiple myeloma. Leukemia [Internet]. 2016;(July):1–18. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.199
240. Mattey DL, Dawes PT, Gonzalez-gay MA, Garcia-porrua C, Thomson W, Hajeer ALIH, et al. HLA-DRB1 Alleles Encoding an Aspartic Acid at Position 70 Protect Against Development of Rheumatoid Arthritis. J or Rheumatol. 2001;3:232–9.
241. Kaimen-maciel DR, Maria E, Reiche V, Borelli SD, Morimoto HK, Melo FC, et al. HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. Mol Med Rep. 2009;993–8.
242. Marangon A V, Silva GF, Moraes CFV De, Grotto RMT, Pardini MIMC, Pauli DS De, et al. Protective Effect of HLA-DRB1 * 11 and Predisposition of HLA-C * 04 in the Development of Severe Liver Damage in Brazilian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. Clin Immunol. 2012;76(4):440–7.
243. Martyn MB, Molis W, Jacobson RM, Poland GA, Weaver AL, Juhn YJ. Human leukocyte antigen type and progression from onset of symptoms to development of asthma. Allergy Asthma Proc. 2016;31(2):120–5.
244. Silva B, Cerda-flores RM, Vargas-alarcon G, Granados J. Association of HLA DRB1 alleles with juvenile idiopathic arthritis in Mexicans. Clin Exp Rheumatol. 2010;28(January):124–7.
245. Ivanova M, Creary LE, Al Hadra B, Lukanov T, Mazzocco M, Sacchi N, et al. 17th IHIW component “Immunogenetics of Ageing” – New NGS data. Hum Immunol [Internet]. 2019;(May 2018):1–11. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885919309942
246. Наумова, Е., Иванова М. Главен комплекс на тъканната съвместимост - факти, хипотези , приложение в медицината. 2006. “Лице”: София.
247. Guerin1 V, Leniaud1 L, Pedron B, Guilmin-Crepon S, Tubiana-Rufi N, Sterkers1 G. HLA-associated genetic resistance and susceptibility to type I diabetes in French North Africans and French natives. Tissue Antigens. 2007;70:214–8.
248. Krini M, Chouliaras G, Kanariou M, Varela I, Spanou K, Panayiotou J, et al. HLA class II high-resolution genotyping in greek children with celiac disease and impact on disease susceptibility. Pediatr Res. 2012;72(11):625–30.
249. Alshiekh1 S, Zhao LP, Lernmark Å, Geraghty DE, Naluai5 ÅT, Agardh D. Different DRB1 * 03 :01-DQB1*02 :01 haplotypes confer different risk for celiac disease. HLA. 2017;90:95–101.
250. Tinto N, Cola A, Piscopo C, Capuano M, Galatola M. High Frequency of Haplotype HLA-

DQ7 in Celiac Disease Patients from South Italy : Retrospective Evaluation of 5 , 535 Subjects at Risk of Celiac Disease. PLoS One. 2015;(9):1–7.
251. Gudeta AN, Ramelius A, Ilonen J, Agardh D. Distribution of HLA-DQ risk genotypes for celiac disease in Ethiopian children. HLA immune response Genet. 2020;(August):681–7.
252. Anagnostouli M, Artemiadis A, Gontika M, Skarlis C, Markoglou N, Katsavos S, et al. HLA-DPB1*03 as Risk Allele and HLA-DPB1*04 as Protective Allele for Both Early- and Adult-Onset Multiple Sclerosis in a Hellenic Cohort. Brain Sci. 2020;
253. Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orru S, et al. HLA-G Gene Polymorphism in Human Placentas : Possible Association of G * 0106 Allele with Preeclampsia and Miscarriage. Biol Reprod. 2008;467(May):459–67.
254. Tan CY, Ho JF V, Chong YS, Loganath A, Huak Y, Ravichandran J, et al. Paternal contribution of HLA-G * 0106 significantly increases risk for pre-eclampsia in multigravid pregnancies. Mol Hum Reprod. 2008;14(5):317–24.
255. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G Promoter Region Influences Miscarriage Rates. Am J Hum Genet. 2003;72:1425–35.
256. Gustavo R, Roberto P, Botogosque S, Piccioni E, Silva S, Pirri A, et al. Association of HLA-G alleles and 3'UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. Hum Immunol. 2011;72:479–85.
257. Kuroshli Z, Gourabi H, Bazrgar M, Sanati MH, Esteki MZ. The Relationship between HLA-G Gene Polymorphisms and Repeated Implantation Failure in Infertile Couples Undergoing Assisted Reproductive Technique. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2015;14(October):535–42.
258. Project G, Project G, Asia E, Asia S, Table S, Fig ED, et al. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015;526:68–74.
259. Paganini J, Abi-rached L, Gouret P, Pontarotti P, Chiaroni J, Di J. HLAIb worldwide genetic diversity : New HLA-H alleles and haplotype structure description. Mol Immunol [Internet]. 2019;112(April):40–50. Available from: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.017
260. Hò GT, Heinen FJ, Huyton T, Blasczyk R, Bade-döding C. HLA-F * 01:01 presents peptides with N-terminal flexibility and a preferred length of 16 residues. Immunogenetics. 2019;71:353–60.
261. Gia-gia TH, Heinen FJ, Blasczyk R, Pich A, Bade-doeding C. HLA-F Allele-Specific Peptide Restriction Represents an Exceptional Proteomic Footprint. Int J Mol Sci. 2019;20:1–11.
262. Santos MR, Couto AR, Foroni I, Bettencourt BF, Li Z, Meneses R, et al. Non-classical human leucocyte antigens in ankylosing spondylitis: Possible association with HLA-E and HLA-F. RMD Open. 2018;4(1):1–9.
263. Cristofaro J Di. HLA-G*01:04-UTR3 Recipient Correlates With Lower Survival and Higher Frequency of Chronic Rejection After Lung Transplantation. Am J Transplanta. 2015;3:2413–20.
264. Mobilization H, Jordier F, Gras D, Grandis M De, Journo XD, Paganini J, et al. HLA-H : Transcriptional Activity and HLA-E mobilization. Front Immunol. 2020;10(January):1–7.
265. Tous A, Carlini F, Ferreira V, Chiaroni J, Picard C, Di J. Association of HLA-A and Non-Classical HLA Class I Alleles. PLoS One. 2016;1–17.
266. Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty DE. HLA-E allelic variants: Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. J Biol Chem. 2003;278(7):5082–90.
267. Bossard C, Bezieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisse CL, Jotereau F, et al. HLA-E/b2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor. Int J cancer. 2012;
268. Zeng X, Chen H, Gupta R, Paz-Altschul O, Bowcock AM, Liao W. Deletion of the activating NKG2C receptor and a functional polymorphism in its ligand HLA-E in psoriasis susceptibility. Exp Dermatol. 2013;22(10):679–81.
269. Paladini F, Belfiore F, Cocco E, Carcassi C, Cauli A, Vacca A, et al. HLA-E gene polymorphism associates with ankylosing spondylitis in Sardinia. Arthritis Res Ther. 2009;11(6):1–6.
270. Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. The HLA-E locus is associated with age at onset and susceptibility to type 1 diabetes mellitus. Hum Immunol. 2000;61(3):290–5.

271. Chen E, Chen C, Chen F, Yu P, Lin L. Positive association between MIC gene polymorphism and tuberculosis in Chinese population. Immunol Lett [Internet]. 2019;213(August):62–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.07.008
272. Luo Q, Guo X, Peng S, Luo W, Tian F, Yu P, et al. The association between MICA/MICB polymorphism and respiratory syncytial virus infection in children. Int J Immunogenet. 2017;44(6):328–36.
273. Baek IC, Shin DH, Choi EJ, Kim HJ, Yoon JH, Cho BS, et al. Association of MICA and MICB polymorphisms with the susceptibility of leukemia in Korean patients. Blood Cancer J [Internet]. 2018;8(6):10–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0092-5
274. Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. Immunol Rev. 2015;267(1):88–116.
275. Shi C, Li H, Couturier JP, Yang K, Guo X, He D, et al. Allele Specific Expression of MICA Variants in Human Fibroblasts Suggests a Pathogenic Mechanism. Open Rheumatol J. 2015;9(1):60–4.
276. Hughes EH, Collins RWM, Kondeatis E, Wallace GR, Graham EM, Vaughan RW, et al. Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. Tissue Antigens. 2005;66(3):195–9.
277. Thomas M, Boname JM, Field S, Nejentsev S, Salio M, Cerundolo V, et al. Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. PNAS. 2008;105(5):1656–61.
278. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. NKG2D Ligand MICA Is Retained in the cis -Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142 □. J Virol. 2009;83(23):12345–54.
279. JR B, A M-P, G PDN, B C, JC V, F V, et al. HLA-DRB1 and MICA in autoimmunity: common associated alleles in autoimmune disorders. Ann N Y Acad Sci. 2003;1005:314–8.
280. Pollock R, Chandran V, Barrett J, Eder L, Pellett F, Yao C, et al. Differential major histocompatibility complex class I chain-related A allele associations with skin and joint manifestations of psoriatic disease. 2011;(6):554–61.
281. Ji M, Wang J, Yuan L, Zhang Y, Zhang J, Dong W, et al. Original Article MICA polymorphisms and cancer risk : a meta-analysis. 2015;8(1):818–26.
282. Peña-oyarzu D. Role of Autophagy in the Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. Front Immunol. 2020;10(December):1–11.
283. Montero PH, Snehal PG. Cancer of the Oral Cavity. Surg Oncol Clin NA [Internet]. 2015;24(3):491–508. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006
284. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. Nat Genet. 2011;43(5):455–8.
285. Access O, Chen D, Hammer J, Lindquist D, Idahl A, Gyllensten U. A variant upstream of HLA-DRB1 and multiple variants in MICA influence susceptibility to cervical cancer in a Swedish population. Cancer Res. 2014;3(1):190–8.
286. Vallian S, Rad MJ, Tavallaei M, Tavassoli M. Correlation of major histocompatibility complex class i related A (MICA) polymorphism with the risk of developing breast cancer. Med Oncol. 2012;29(1):5–9.
287. Mengyao Ji, Wang J, Yuan L, Zhang Y, Zhang J, Dong W, et al. MICA polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med. 2015;8(1):818–26.