



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Бушра Набил Ал Хадра

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН**

„ДОКТОР“

на тема

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

Област на висше образование: 7.Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Имунология

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. МИЛЕНА ИВАНОВА ИВАНОВА–ШИВАРОВА, ДМ

София, 2021

Дисертационният труд е в обем от 197 страници включващи 48 фигури и 57 таблици. Библиографският списък е 13 страници и съдържа 287 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Клинична Имунология при Медицински факултет на Медицински университет с протокол № 5/03.06.2021, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.10.2021 от 14:00 часа в аула „Максима“ на УМБАЛ „Св. Екатерина“, град София, съобразно заповед на Ректора на МУ – София № РК36-1382/01.07.2021г., пред научно жури в състав:

Научно жури:

Председател:

1. Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова-Григорова, дмн – вътрешен – становище

Членове:

2. Проф. Алексей Славков Савов, дб – вътрешен член – рецензия
3. Проф. д-р Фани Георгиева Мартинова, дмн – външен член - становище
4. Проф. д-р Виктория Степан Озаян-Сарафян – външен член - рецензия
5. Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, дм – външен член – становище

Резервни членове:

1. Доц. д-р Снежина Михайлова Кандиларова, дм – вътрешен резервен член
2. Проф. д-р Марта Петрова Балева, дмн – външен резервен член

Технически сътрудник: Ас. Цветелин Иванов Луканов, дм

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински Университет – София и са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към МУ-София.

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	1
ВЪВЕДЕНИЕ	2
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	4
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	5
I. Материали	5
II. Методи	6
III. Статистически анализ	30
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	31
Въвеждане на нов метод за HLA генотипизиране с висока разграничителна способност (NGS)	31
Изследване на равновесието на Харди-Уайнбърг и глобалната неравновесна скаченост на изследваните класически и неklasически HLA гени	34
Класически HLA	36
I. Изследване на алелния полиморфизъм на класически HLA клас I и клас II гени при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация	36
II. Дву-локусни хаплотипи	40
Неklasически HLA гени	48
Алелно и хаплотипно разпределение на неklasическите HLA-E, -F, -G, -H гени при здрави, възрастни индивиди от българската популация	48
I. Изследване на HLA-E, -F, -G, -H полиморфизма на алелно ниво при здрави индивиди от българската популация	48
II. Дву-локусни хаплотипи, засягащи класическите HLA клас I, клас II локуси и неklasическите HLA клас I гени	50
Изследване на MICA и MICB полиморфизма на алелно и хаплотипно ниво при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация	52
I. MICA, MICB алелен полиморфизъм при здрави дълголетници и млади индивиди от българската популация	52
II. Дву-локусни хаплотипи	55
Изследване на полиморфизма на неklasическите MHC клас I свързани (MIC) гени при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и сравнителен анализ с две групи здрави индивиди от българската популация	60
ИЗВОДИ	69
ПРИНОСИ	70
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	71

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АЧ – Алелна честота

ДТ1 - Диабет тип 1

РА - Ревматоиден артрит

СЗО - Световна здравна организация

СЛЕ - Системен лупус еритематозус

ХЧ - Хаплотипна честота

hCMV - Human cytomegalovirus (Човешки цитомегаловирус)

HLA - Human Leukocyte Antigen (Човешки левкоцитен антиген)

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

NGS – Next generation sequencing (Следващо поколение секвениране)

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

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 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%). Застаряващото поколение е висок рисков фактор за развитието на редица заболявания, поради което при тях се наблюдава увеличено търсене на медицинска помощ. Това се явява важен проблем на съвременните общества от социално-икономическа гледна точка. Откриването на потенциални нови биомаркери, които повлияват продължителността на живот и придават устойчивост към развитието на животнозастрашаващи заболявания ще допринесе за развитието на стратегии за поддържане на оптимални физиологични функции във възрастния организъм.

Старенето 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). Фамилни проучвания предполагат, че до 30% от продължителността на живот е генетично обусловена (Naumova, Ivanova, and Pawelec 2011; Blasco et al. 2013). С напредване на възрастта имунната система претърпява редица промени, в резултат на които постепенно губи способността да реагира ефикасно на инфекции и ваксини, повишава се честотата на автоимунни и злокачествени заболявания, което води до по-високата степен на заболяемост и смъртност при възрастните хора.

Научната 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 заболявания. Изхождайки от значението на класическите и некласическите човешки левкоцитни антигени (Human leukocyte antigen - HLA) 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 „здрavo 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.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изясни ролята на полиморфизма на класическите и неklasическите 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 неklasически 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 неklasическите HLA клас I свързани MIC и неklasическите HLA клас Ib гени (HLA-E, -F, -G, -H) гени в българската популация.
4. Проучване на разпределението на неklasическите 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 селектирана 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

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 селектирани съобразно SENIEUR протокола, а здравите млади индивиди са селектирани съобразно JUNIER протокола (Ligthart et al. 1984).

Таблица 1. Характеристика на изследваните индивиди и тяхното разпределение по пол и възраст

Изследвани гени		Брой изследвани индивиди			Възраст (г)		Пол	
		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 2). Включените индивиди са на възраст между 55г и 85 години, като 66.7% от пациентите попадат във възрастовия диапазон 60 - 69 години. 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“. Всички пациенти са включени в изследването след писмено деклариране на информирано съгласие.

Таблица 2. 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		

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).

Изпълнение на метода:

1. Като изходен материал се използва 350 µL периферна кръв (или концентрирана левкоцитна проба).
2. За всяка кръвна проба се приготвя единичен стрип, съдържащ магнитни микросфери и разтвори (iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit). Стрипът се вортексирва 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°C за няколко седмици или при -20°C за по-продължителен период от време.

2. Методи за типизиране на класически и неklasически 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 неklasическите HLA клас I гени: HLA-E, -F, -G, -H, MICA и MICB.

Изпълнение на метода:

Подготовка на библиотеката:

1. Тагментиране

1.1. За целите на метода се използват 10 µL ДНК с концентрация 10-100 ng/µL

1.2. Приготвя се тагментационен мастер микс от следните реагенти (количествата са дадени за една проба): Тагментационен буфер: 10 µL, Стерилна вода: 20 µL, Тагментационни микросфери: 10 µL, Общо количество за проба: 40 µL.

1.3. Приготвената смес се миксира чрез вортексиране, след което се центрофугира за кратко и се добавя се по 40 µL от към всяка ямка с предварително накапана ДНК проба. Плаката се запечатва с фолио и се центрофугира на 280 x g за 30 секунди

1.4. Плака се поставя във високоскоростна клатачка) и се клати за 1 минута на 1600 rpm, след което се поставя в PCR апарата:

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, след което се добавя по 10 µL стоп буфер и плаката се запечатва отново с фолио

2.2. Плака се поставя на клатачка за микроплаки и се клати за 1 минута на 1600 rpm. След приключване, плаката се инкубира за 5 минути на стайна температура.

2.3. Реакционната смес се измива три пъти с тагментационен измиващ буфер, като фолиото се премахва и плаката се поставя върху магнит за 1 минута. Супернатантата се отстранява, без да се нарушава целостта на микросферите в ямките. Бавно се добавя 100 µL тагментационен измиващ буфер към всяка ямка. Плаката отново се запечатва с фолио и се поставя на клатачка за микроплаки и се

клати за 2 минути на 1800 грт на стайна температура. Описаните стъпки се повтарят още два пъти за общо 3 измивания.

3. Индексиране

3.1. Приготвя се PCR мастер микс, както следва (количествата са дадени за една проба):

Стерилна вода: 20 μL , PCR микс: 20 μL , Общо количество за една проба: 40 μL .

3.2. След третото измиване на плаката, фолиото се отлепя, като плаката се поставя върху магнит за 1 минута, супернатантата се премахва и плаката се отстранява от магнитната стойка.

3.3. Добавя се 40 μL PCR мастер микс към всяка ямка, плаката се запечатва с фолио и се поставя на клатачка за микроплаки да се клати за 2 минути на 1800 грт на стайна температура, след което се центрофугира на 280 x g за 1 минута.

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

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

#	Температура	Време	Брой 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). Приготвя се и достатъчно количество (около 15ml) 80% етанол

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). 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.

4.3. Дълбокодънната MIDI плака се запечатва с фолио, след което се поставя на клатачката за 2 минути на 1800 rpm. Плаката се инкубира на стайна температура за 5 минути. По време на тази инкубация фрагментите с най-голяма дължина се свързват за микросферите.

4.4. Центрофуга на 280 x g за 1 минута, след което фолиото се отлепя и плаката се поставя на магнитна плоча за 5 минути.

4.5. 260 µL от супернатантата се прехвърлят в нова дълбокодънна MIDI плака или в чисти, неизползвани ямки на същата плака. Добавят се 20,8 µL неразредени пречистващи, магнитни микросфери (Purification beads) към всяка проба, след което плаката се запечатва с фолио.

4.6. 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.

4.7. Фолиото се отлепя и плаката се поставя на магнитна плоча за 5 минути. След това с помощта на пипета, се аспирира и изхвърля супернатанта от всяка ямка.

4.8. Без да се премахва плаката от магнита, магнитните микросфери се промиват два пъти с 80% етанол, както се добавя 200 µL 80% етанол към всяка проба. Следва инкубация се за 30 секунди на стайна температура, след което супернатантата се аспирира и премахва. Стъпките се повтарят до общо 2 измивания.

4.9. След премахване на супернатантата от последното миене от всички ямки, плаката се оставя върху магнитната плоча за 5 минути. След това към всяка ямка се добавя по 17 µL ресуспендиращ буфер, за елуиране на таргетните фрагменти.

4.10. Плаката се запечатва и се поставя на клатачката за 2 минути на 1800 rpm. Следва инкубиране на плаката за 5 минути при стайна температура и центрофугиране за кратко. Плаката се поставя на магнитната плоча за 5 минути.

4.11. 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 изема 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 микроцентрифужна епруветка (Епендорф). Извършва се стъпка на концентриране.

6. Концентриране

6.1. Към 1.5 mL микроцентрифужната епруветка, съдържаща обединените библиотеки се прибавят 108 μL Purification beads. Епруветката се вортексира се на максимална скорост и се центрофугира за кратко.

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

6.3. Без да се премахва от магнитния държател, микросферите се промиват два пъти с 80% етанол, както се добавя се 200 μL 80% етанол. Инкубира се за 30 секунди на стайна температура. Супернатантата се аспирира и премахва. Стъпки се повтарят до общо 2 измивания.

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

6.5. Добавя се 32 μL ресуспендиращ буфер в епруветка, за елуиране на библиотеките. Епруветката се вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, след което се инкубира на стайна температура в продължение на 5 минути. Центрофугира се за кратко.

6.6. Епруветката се поставя на магнитния държател за 1 минута, след което 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:

7.1. За всяка хибридизационна реакция се комбинират следните реагенти в епруветка на PCR стрип: Обединена библиотека: 30 μL , AlloSeq Tx панел от сонди: 10 μL , Хибридизационен буфер 1: 50 μL , Хибридизационен буфер 2: 10 μL . Общо количество на цялата реакция 100 μL .

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

Количество на реакционната смес: 100 μL

Предварително загряват капак на PCR апарат: 100°C

#	Температура	Време	Брой 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

7.3. 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 30 минути преди работа и загряване на HuxbeX системата до 58°C, където да се инкубира Capture Wash Buffer. Когато не се използва Capture Wash Buffer трябва да се държи в загряващата HuxbeX системата, за да поддържа 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 (количествата са за една библиотека): Улавящ елуиращ буфер 1: 28.5 µL и 2N NaOH: 1.5 µL.

8.2. За всяка хибридационна реакция се добавят 250 µL от улавящите микросфери (Capture Beads) в нова 1,5 ml микроцентрифужна епруветка. Към улавящите микросфери се прибавят 100 µL от хибридационна смес от предишната стъпка.

8.3. Епруветката се вортексира на максимална скорост, след което се инкубира на 58 ° C в HuxbeX системата за 15 минути, след което се центрофугира за кратко.

8.4. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява. Микросферите се промиват три пъти с Capture Wash Buffer, както следва: Епруветката се премахва от магнитния държател. Добавят се 200 µL от загретия Capture Wash Buffer (58 ° C). Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Не се центрофугира. Епруветката се инкубира на 58 ° C в загряващата HuxbeX система за 5 минути, след което се центрофугира за кратко. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява. Стъпки от се повтарят още два пъти за общо 3 измивания.

8.5. Микроцентрифужната епруветка се премахва от магнитния държател и се добавят 200 µL от загретия Capture Wash Buffer (58°C). Вортексира се на максимална скорост за 10 секунди, 3 пъти. Не се центрофугира.

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

- 8.7. Епруветката се поставя на магнитен държател за 1 минута, след което супернатантата се отстранява. Епруветката се премахва от държателя.
- 8.8. Приготвения по-рано елуиращ мастер микс се вортексира и се добавят 23 μL към епруветката съдържаща улавящите микросфери. Вортексира се, след което епруветката се инкубира на стайна температура в продължение на 2 минути и се центрофугира за кратко. Поставя се на магнитния държател за 1 минута.
- 8.9. В нова 0,2 епруветка на PCR стрип се прехвърлят 21 μL от супернатантата.
- 8.10. Добавят се 4 μL улавящ елуиращ буфер 2 (Capture elution buffer 2) (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 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

- 10.1. Приготвя се пресен 80% разтвор на етанол. В нова 1,5 ml микроцентрифужна епруветка се добавят 27 μL пречистващи микросфери.
- 10.2. Прехвърлят се 45 μL от PCR реакционната смес в епруветката съдържаща микросферите.
- 10.3. Епруветката се вортексира и се центрофугира за кратко, след което се инкубира за 5 минути на стайна температура. Поставя се на магнитен държател за 1 минута. Супернатантата се отстранява

- 10.4. Без да се премахва от магнитния държател, микросферите се промиват с 80% етанол два пъти, както следва: Добавя се 200 μL 80% етанол. Инкубира се за 30 секунди на стайна температура. Супернатантата се аспирира и премахва. Стъпките се повтарят до общо 2 измивания.
- 10.5. Епруветката се оставя отворена върху магнитния държател в продължение на 5 минути за да се изпари остатъчното количество етанол, след което се премахва от магнитния държател и се добавят 32 μL ресуспендиращ буфер за елуиране на целевите фрагменти. Вортексира се и се инкубира на стайна температура за 5 минути. Центрофугира се за кратко.
- 10.6. Епруветката се поставя на магнитния държател за една минута, след което се прехвърлят 30 μL от супернатантата в нова 1.5 ml епруветка.
Библиотеците 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. Генерира се разрежена библиотека с концентрация 1 nM, като се използва ресуспендиращ буфер.
- 11.3. 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.
- 11.4. След края на инкубацията се добавят 5 μl ресуспендиращ буфер. Епруветката се вортексира и центрофугира за кратко. 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.
- 11.5. Необходимо е крайно разреждане на библиотеката до концентрация 1,6 pM в краен обем от 500 μl .
- 11.6. В предварително размразената касета с реагенти се добавят 500 μl от денатурираната и разрежена библиотека. Касетата се поставя в секвенатора и се задава начало на секвенционния рън.
- 11.7. Анализ на данните - за анализ на секвенциите беше използван софтуерния продукт AlloSeq™ Assign. Програмата използва консенусно 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 неklasическите HLA клас I свързани гени MICA и MICB. Амплификацията на неklasическите 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.

1.2.Лиофилизираните MICA и MICB праймери се ресуспендират, като към всяка от епруветките се добавя по 106 µl вода без нуклеази.

1.3.Приготвят се отделни реакционни смеси за MICA и MICB локус-специфичните амплификации, както следва (количествата са представени за една проба): Вода без нуклеази: 4.5 – 5.5 µl, GenDx-LongMix (4x): 2.5µl, MICA/MICB праймери: 1µl, Геномна ДНК: 1-2 µl, Общо количество за една реакция: 10µl.

1.4.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).

1.5.Стартира се следната PCR програма:

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

1.6.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 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 се ресуспендират, като към всяка от епруветките се добавя по 27 µl вода без нуклеази (за 24 реакции).

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. 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 мин.	1
2	95°C	15 сек.	35
3	65°C	30 сек.	
4	68°C	6 мин.	
5	68°C	10 мин.	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.

3. Определяне концентрацията на ампликоните: се извършва чрез използване на кит Qubit™ dsDNA High Sensitivity, като предварително ампликоните се разреждат десет пъти. 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 и стойностите се нанасят в работни файлове предоставени от GenDx, които изчисляват необходимото количество ампликон за всеки локус на проба, което трябва да се отпипетира, за да се постигне еквимоларно обединяване. Работният файл изчислява

и обема, които е необходим да се иземе от всяка еквимоларно обединена проба за осъществяване на следващата фрагментационна стъпка.

5. Фрагментация и поправка на краищата (End repair):

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.4.1 количество обединени ампликони. Реакционната смес се вортексира и центрофугира за кратко.

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

Стъпка	Време (мин.)	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:

6.1. Приготвя се реакционна смес за лигиране на адапторите, както следва (количествата са представени за една проба): Лигазна смес: 7.5µl, Лигиращ енхансер: 0.5µl, Общо количество за една проба: 8 µl.

6.2. Към ДНК фрагментите от точка 5 (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 (общо количество реакционна смес е 41,75 µl).

6.3. Плаката се поставя в PCR апарата и се инкубира на 20°C за 15 минути, след което веднага се прехвърля 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 Eppendorf 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 $N \times 10 \mu\text{l}$ количество обединена библиотека, където N е броя на обединените проби се прибавя $N \times 10 \times 0,45 \mu\text{l}$ 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 $900 \mu\text{l}$ 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. Епруветката се оставя с отворена капачка за около 3-5 минути.
- 8.4. За елуиране на таргетните фрагменти от микросферите, епруветката се премахва от магнитния държател и се прибавят $50 \mu\text{l}$ елуиращ буфер или 0,1 TE буфер. Инкубира се на стайна температура за 2 минути. Епруветката се поставя на магнитен държател за 5 минути, след което се прехвърлят $46 \mu\text{l}$ 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 ($198 \mu\text{l}$ Qubit работен разтвор + $2 \mu\text{l}$ библиотека).
 - 9.2. Необходимата таргетна концентрация за зараждане на Ion Chef™ апарата е 60 pM.
10. Емулсионен PCR: извършва се 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 зараждат 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. Анализ 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. 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). 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 (количествата са представени за една проба): PCR смес: 25µl, ДНК полимераза: 2 µl, Дейонизирана вода: 13 µl, Общо количество за една проба: 40 µl.

1.4. Към съответните ямки на двете плаки се добавят по 40 µl от приготвените смеси. 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 мин	1
2	94°C	30 сек	10
3	55°C	2 мин	
4	72°C	15 мин	
5	94°C	30 сек	
6	60°C	2 мин	20
7	72°C	15 мин	
8	72°C	10 мин	
9	10°C	∞	1

Програма 2			
№	Температура	Време	Брой цикли
1	94°C	3 мин	1
2	94°C	30 сек	30
3	60°C	2 мин	
4	68°C	15 мин	
5	68°C	10 мин	
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 високоскоростна клатка за микроплаки и се клати за 2 минути на 1800 rpm. Инкубира се на стайна температура за 2 минути, след което се поставя на магнитната поставка за 2 минути. Супернатантата се премахва.

- 2.3. Към всяка ямка се прибавят 200 μ l прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнита за 30 секунди и след което супернатантата се отстранява. Стъпката се повтаря за общо две миенета.
- 2.4. Плаката се оставя на магнитна поставка за 5 минути. Към всяка ямка се прибавя 30 μ l ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 2 минути при 1800 rpm, инкубира се на стайна температура за 2 минути, след което се поставя на магнитна поставка за 2 минути. В нова дълбокодънна плака (0,8 ml) се прехвърля 20 μ l 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 μ l нормализиращи микросфери - Library Normalization Beads 1 (LNB1). Необходимо е пълно ресуспендиране на микросферите.
- 3.2. Към всеки пречистен ампликон се добавя 45 μ l от приготвената LNB1/LNA1 смес. Плаката се клати за 30 минути при 1800 rpm. Поставя се на магнитна поставка за 2 минути до пълно избистряне, след което супернатантата се отстранява.
- 3.3. Към всяко гнездо се прибавя 45 μ l ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 5 минути при 1800 rpm, след което се поставя на магнита за 2 минути и супернатантата се премахва.
- 3.4. Към всяко гнездо се прибавя 40 μ l 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
- 4.1. Към всеки ампликон се добавят 10 μ l тагментационна смес, след което плаката се поставя в PCR апарат за 12 минути при 58°C.
- 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 μ l) 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 изема по 10 μ l, с изключение на DRB, от който се отпипетират 20 μ l.
- 5.2. Към всяка ямка се добавят 63 μ l Sample Purification Beads (пречистващи микросфери). Плаката се клати за 2 минути на 1800 rpm, след което се инкубира на стайна температура за 2 минути. Поставя се на магнитната поставка за 5 минути и супернатантата се премахва.

- 5.3. Към всяка ямка се прибавят 200 μ l прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнита за 30 секунди и след това супернатантата се отстранява. Стъпката се повтаря до общо две стъпки на миене.
- 5.4. Плаката се оставя на магнита за 5 минути, след което към всяка ямка се прибавят 22.5 μ l ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 2 минути при 1800 rpm, след което се инкубира на стайна температура за 2 минути и се поставя върху магнитна поставка за ~2 минути до избистряне на разтвора.
- 5.5. 20 μ l от супернатантата се прехвърля в нова 96-ямкова PCR плака
6. Вторична амплификация – използва се кит Nextera XT Index (24 индекса, 96 проби) и Nextera Library Amplification Mix (NLM). Към всяка ямка последователно се добавят по 5 μ l от съответните адаптори индекс 1 и индекс 2 и 20 μ l 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:

- 7.1. В нова 96-ямкова дълбокодънна 0.8 ml плака се прехвърлят 45 μ l от PCR продуктите. Към всяка ямка се прибавят 31,5 μ l 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 и се поставя на магнитна поставка за 2 минути. След като разтворът се избистри супернатантата се премахва.
- 7.3. Към всяка ямка се прибавят 200 μ l прясно приготвен 80% разтвор на етанол. Инкубира се върху магнитна поставка за 30 секунди и след това супернатантата се отстранява. Стъпката се повтаря за общо две стъпки на миене.
- 7.4. Плаката се оставя на магнитната поставка за 5 минути, след което към всяка ямка се добавя 32.5 μ l ресуспендиращ буфер. Плаката се клати за 2 минути на 1800 rpm, след което се инкубира се на стайна температура за 2 минути.

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

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

8.6. В предварително размразената касета с реагенти се добавят 600 µl от денатурираната и разрежена 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.

2.4. Omixon Holotype HLA v2

Секвенционният 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. 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.Необходимата изходна концентрация ДНК е 20-30 ng/μl в минимален обем от 45 μl.

1.2. В две PCR плаки се накапват по 5μl ДНК за всеки локус клас I (в първата плака) и 5μl ДНК за всеки локус клас II (втората плака).

1.3.Приготвя се комбиниран енхансер като към епруветката с енхансер 1 се прибавят 132 μl от епруветката с енхансер 2. В 1.5 ml Eppendorf епруветки се приготвят отделни амплификационни смеси за HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DPB1 и DQA1 както следва (количествата са дадени за една проба): Праймерна смес: 2 μl, 10X Long Range PCR буфер: 2.5μl, Смес на dNTP (всяко 10 mM): 1.25 μl, Стерилна дейонизирана вода: 13.85μl, ДНК полимераза: 0.4 μl, Общо количество за една проба: 20 μl.

1.4.За HLA-DQB1 се приготвя отделна амплификационна смес, както следва (количествата са дадени за една проба): Праймерна смес: 2 μl, 10X Long Range PCR буфер: 2.5μl, Смес от dNTPs (всяко 10 mM): 1.25μl, Комбиниран Enhancer: 5.6μl, Стерилна дейонизирана вода: 7.85μl, ДНК полимераза: 0.8 μl, Общо количество за проба: 20 μl.

1.5.Към съответните ямки на двете плаки се прибавят по 20 μl от локус-специфични амплификационни смеси. Плаките се поставят в PCR апарат (Veriti™, Applied Biosystems Inc, USA), като 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
95°C	3 мин.	1
95°C	15 сек.	35
65°C	30 сек.	
68°C	5 мин.	
68°C	10 мин.	1
4°C	∞	

Програма 2		
Температура	Време	Брой цикли
95°C	3 мин.	1
93°C	15 сек.	35
60°C	30 сек.	
68°C	9 мин.	
68°C	10 мин.	1
4°C	∞	

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.

2.3. Приготвя се 1x багрилен разтвор на QuantiFluor, както следва: 0,5 μl багрило QuantiFluor (200X) + 99,5 μl 1x TE буфер. Приготвя се достатъчно количество 1x багрилен работен разтвор на QuantiFluor – необходимото количество за проба е 50 μl.

2.4. Приготвят се нови две 96-ямкови 0.2 ml PCR плаки за количествено определяне на ампликоните. Към всяка от ямките, в които ще се извърши измерване се накапват по 50 μl от 1x багрилен работен разтвор QuantiFluor и 50 μl от разредените предварително ампликони и приготвените стандарти.

2.5. Плаките се запечатват с оптично-пропускливо фолио за real-time PCR. Получените RFU данни за концентрацията на ампликоните от qPCR се конвертират в ng/μl.

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

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
37°C	4 мин.	1
80°C	1 мин.	1

4°C	∞	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):

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.В нова 96-ямкова PCR плака се прибавят по 4 µl от приготвената фрагментационна смес. Към съответните ямки се добавят 16 µl от всяка проба. Стартира се следната програма:

Температура	Време	Брой цикли
37°C	10 мин.	1
70°C	15 мин.	1
4°C	∞	1

5.3.В нова 1.5 ml Eppendorf епруветка се приготвя реакционна смес за поправка на краищата, както следва (количествата са за една проба): Дейонизирана вода: 1.25µl, Ензим за поправка на краищата: 1.25µl, Буфер за поправка на краищата: 2.5 µl.

5.4.Към съответните ямки на PCR плаката се добавят по 5 µl от приготвената смес за поправка на краищата. Стартира се следната PCR програма:

Температура	Време	Брой цикли
20°C	30 мин.	1
70°C	5 мин.	1
4°C	∞	1

6. Добавяне на адаптори - необходимите индексирани адаптори са разпределени в 96-ямкова плака.

6.1.Към съответните ямки на плаката с индексирани адаптори се прехвърля цялото количество (~25 µl) от всяка проба с поправени краища, след което сместа от индексите и ампликоните се прехвърля изцяло, обратно в изходната PCR плака, спазвайки реда на пробите.

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

6.3.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
25°C	10 мин.	1
70°C	10 мин.	1
4°C	∞	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 μ l. При по-малко от 16 проби се прехвърлят по 60 μ l от всяка библиотека.
- 7.2. Към епруветката се добавя еквивалентно количество AMPure XP Beads (900 μ l 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. Супернатантата се премахва.
- 7.4. Към епруветката се добавя 2 ml прясно приготвен 80% етанол. Инкубира се на стайна температура за 30 секунди, след което внимателно се отстранява супернатантата. Стъпката се повтаря.
- 7.5. След премахване на супернатантата епруветката се оставя върху магнитния държател за 5 минути, след което към епруветката се добавя 31 μ l стерилна дейонизирана вода. Микросферите се ресуспендират чрез вортексиране и се инкубират на стайна температура за 2 минути.
- 7.6. 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.). Инструментът се стартира и след изтичане на изследването, се изема (~40 μ l) селектирана библиотека от елуиращата камера на касетата и се прехвърля в нова 1.5 ml Eppendorf LoBind епруветка.
На този етап, селектираната 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. Правят се две измервания на библиотеката, като за всяко измерване се смесват 2 μ l библиотека и 198 μ l работен разтвор.
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 μ l.
 - 10.2. Приготвя се 1 nM денатурирана библиотека – към разредената библиотека се добавя 10 μ l 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 pM 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 (v).

3. Методи за определяне на серумни нива на разтворими MHC молекули Elisa кит за определяне на серумно ниво на човешки MHC молекули

Изпълнение на метода за определяне концентрация на разтворими MICA молекули:

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 Eppendorf 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 Eppendorf епруветка с предварително накапан 450 µl 1x Assay Diluent – стандарт 1 с концентрация 10 000 pg/ml. В нови седем 1,5ml Eppendorf 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).

Изпълнение на метода за определяне концентрацията на разтворими МІВ молекули:

1. Приготвяне на 1x Assay Diluent В: този разтвор се използва за разреждане само на реагентите (без серумите). Изходния разтвор 5x Assay Diluent В 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 А, за който не е необходимо предварително разреждане.
 - 2.2. Серумите се разреждат в съотношение 1:1 (100 µl серум + 100 µl 1x Assay Diluent А) 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 А, 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 А. Правят се падащи разреждания, като от стандарт 1 се изземат 150 µl и се прехвърлят в първата епруветка съдържаща 300 µl 1x Assay Diluent А (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 А (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 А (в него не се прехвърля нищо).

От тук нататък изпълнението на Elisa метода е идентично и за двете изследвани разтворими молекули (sMICA и sMICB).

3. Свързване на разтворимите MIC молекули за имобилизираните MIC 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.
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 (За MICB реагента е 1x 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 1x Assay Diluent (За MICB реагента е 1x 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 1x измиващ буфер, след което буфера се отстранява чрез рязко обръщане на плаката (пълното премахване на остатъчен буфер е препоръчително).
- 6.2. Стъпка 6.1 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 анализирани ямки на плаката (стандарт + 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 образувани преципитати. Изчислява се необходимия краен обем от реагента, след което се разрежда 300 пъти с 1x Assay Diluent. За MICB стрептавидин-HRP реагента се разрежда 200 пъти с 1x 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 анализирани 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 ТМВ субстрат (тетраметилбензидин): Към всяка от анализираните ямки се прибавя по 100 μ l ТМВ 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 μ l 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

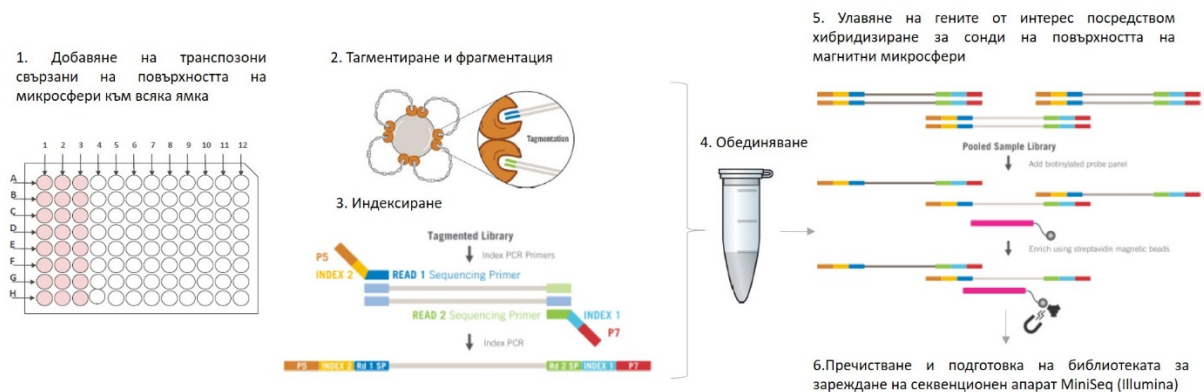
Алелните и дву-локусните хаплотипни честоти бяха определени чрез използване на т.н. алгоритъмът за максимизиране на очакванията (expectation–maximization / EM) заложен в програмата Gene[Rate] (José Manuel Nunes 2015). Тестване за отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг (Hardy–Weinberg equilibrium / HWE) се осъществи като се използва тест за съотношение на вероятностите (Likelihood ratio test / LRT) (J M Nunes et al. 2010). 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 (J M Nunes et al. 2014; José Manuel Nunes 2015). 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 χ^2 тест (Chi-square test) и/или точен тест на Фишер (Fischer exact test) чрез използване на статистически софтуерен пакет SPSS (“SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.,” n.d.). 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)(“GraphPad Software, San Diego, California USA,” n.d.), програмата Gene[Rate] и Microsoft Excel версия 2103 (“Microsoft Corporation. (2018). Microsoft Excel. Retrieved from <https://Office.Microsoft.Com/Excel>,” n.d.).

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 неklasически 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 хибридиране 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.

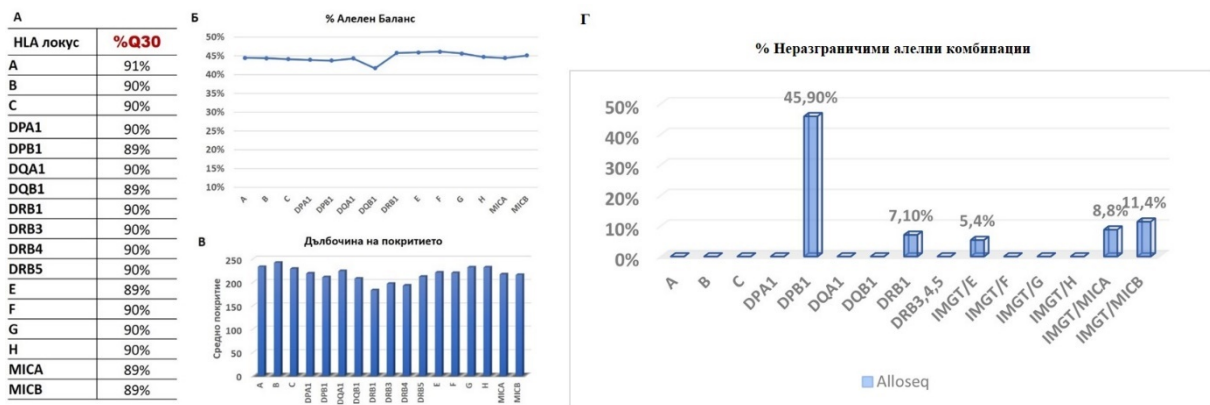
Подготовка на библиотеката е многостъпателен процес (фигура 1). Секвенирането се извършва на секвенционен апарат MiniSeq.



Фигура 1. 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 2). 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 2).



Фигура 2. Качествени параметри на генерираните секвенции и процент неразграничими алелни комбинации чрез използване методологията на CareDx - AlloSeq Tx17

За всеки анализиран локус са определени А) средния процент бази с качество на прочитите над 30 (%Q30); Б) Среден алелен баланс; В) Средна дълбочина на покритието Г) Процент неразграничими алелни комбинации за всички анализиран локуси

Установихме 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. Най-честата неразграничима алелна комбинация наблюдавана в настоящото проучване, като резултат от проблем с фазирането е MICB*002, MICB*005/MICB*018, MICB*019. Двете алелни двойки се характеризират с различия в интронните последователности при идентична секвенция на екзоните. 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. 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. При анализа на данните генерирани чрез методологията на AlloSeq Tx17, в резултат на липса на покритие на цялата геномна секвенция и липсваща секвенционна информация за некодиращите последователности се наблюдава т.н. проблем с фазирането и AlloSeq Assign софтуера не успява да разграничи двете алелни комбинации. Използването на секвенционните китове осигуряващи покритие на цялата геномна секвенция, в конкретния случай на GenDx, позволява при анализа на данните посредством NGSengine софтуер, да бъдат определени правилно ориентацията на екзонните и интронни хетерозиготни позиции. Това осигурява 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.

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 хибридна 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 някои от локусите установяваме и намален процент неразграничени 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 неразграничени 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

При изследване равновесието на Харди-Уайнбърг за всички анализирани локуси в различните изследвани групи здрави индивиди от българската популация не се установява отклонение от равновесието (таблица 3). Изключение прави MICB локуса. 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. Вероятно именно високата честота на срещане на тези MICB алели е и причината за наблюдаваното отклонение от равновесието на Харди-Уайнбърг.

Таблица 3. Изследване за отклонения от равновесието на Харди-Уайнбърг за всички локуси, при всички изследвани групи от българската популация

<i>Локус</i>	<i>Изследвани индивиди</i>	<i>Брой изследвани</i>	<i>p</i>
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 ($p \leq 0.05$) са означени с удебелен шрифт.

Глобална неравновесна скаченост

	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 3. Heat Map графика отразяваща силата на неравновесна скаченост между класически и неklasически гени от HLA комплекса

Както става ясно от heat map графиката (фигура 3), 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 неklasическите 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 неklasически HLA клас I гени, което се изразява в малко по-високи p стойности в сравнение с останалите локуси.

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 4). Очаквано, най-висока степен на полиморфизъм се установява за HLA-B локуса с 59 наблюдавани алели. Най-често представените класически клас I алели в здравата българска

популяция 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 популяция е съпоставима с алелната честота наблюдавана в съседни Балкански популации и някои страни от централна и западна Европа.

Таблица 4. HLA клас I алелно разпределение при здрави индивиди от българската популяция (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 5). Най-често представените клас II алели при здрави индивиди от българската популация 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 5. 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 извършения сравнителен анализ се установяват няколко статистически значими различия в алелното разпределение на класическите HLA при дълголетници и млади индивиди (таблица 6). 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. Алелната група HLA-C*07 е описана като протективна за аксиален спондилоартрит и с по-добро представяне на пептиди получени от широко разпространения при всички човешки популации

цитомегаловирус (human cytomegalovirus - hCMV) на Т клетките и съответно по-голяма устойчивост на инфекцията (Tang et al. 2010). Сравнителния анализ на HLA клас II алелните честоти разкри статистически значима повишена честота при възрастни за сравнително рядко описаната **HLA-DRB1*04:10:01** алелна специфичност, която 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 (Cucca et al. 2001). HLA-DRB1*11:04:01 е най-често представената алелна специфичност и в двете изследвани групи. В съответствие с предходни проучвания на изследователския колектив върху дълголетници от българската популация (M. Ivanova et al. 2019), **HLA-A*01:01:01**, **C*07:01:02** и **HLA-B*15:17:01** алелните специфичности се наблюдават с по-високата честота при дълголетници в сравнение с изследваната група от млади индивиди, като след лед прилагане корекцията на Бонферони, статистическата значимост на наблюдаваните разлики се губи.

Таблица 6. 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

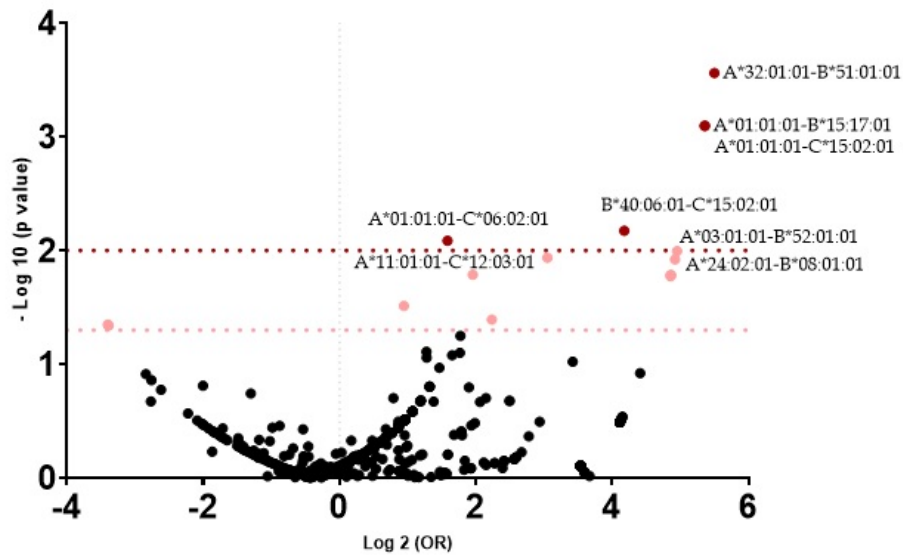
Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; n, брой изследвани индивиди; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). Корекцията на Бонферони е извършена с коефициент равен на броя извършени независими сравнения. Коригирани P стойности (Pc)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

II. Дву-локусни хаплотипи

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

От извършения сравнителен анализ пет класически HLA клас I дву-локусни хаплотипа се открояват със силна, статистически значима ($p \leq 0.01$) повишена честота при дълголетници (фигура 4). HLA клас I алелни специфичности в състава на тези

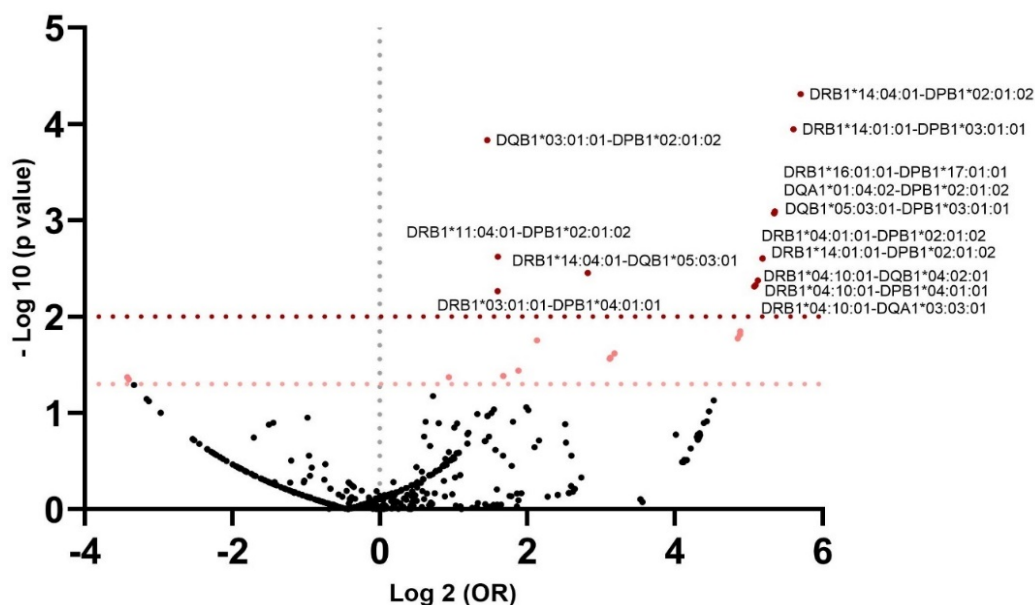
хаплотипи са HLA-A*01:01, *03:01, *32:01; -B*15:17, *40:06, B*51:01, *52:01, -C*06:02, *15:02.



Фигура 4. 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 $p > 0.05$.

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

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 възрастни индивиди от българската популация (фигура 5). 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.



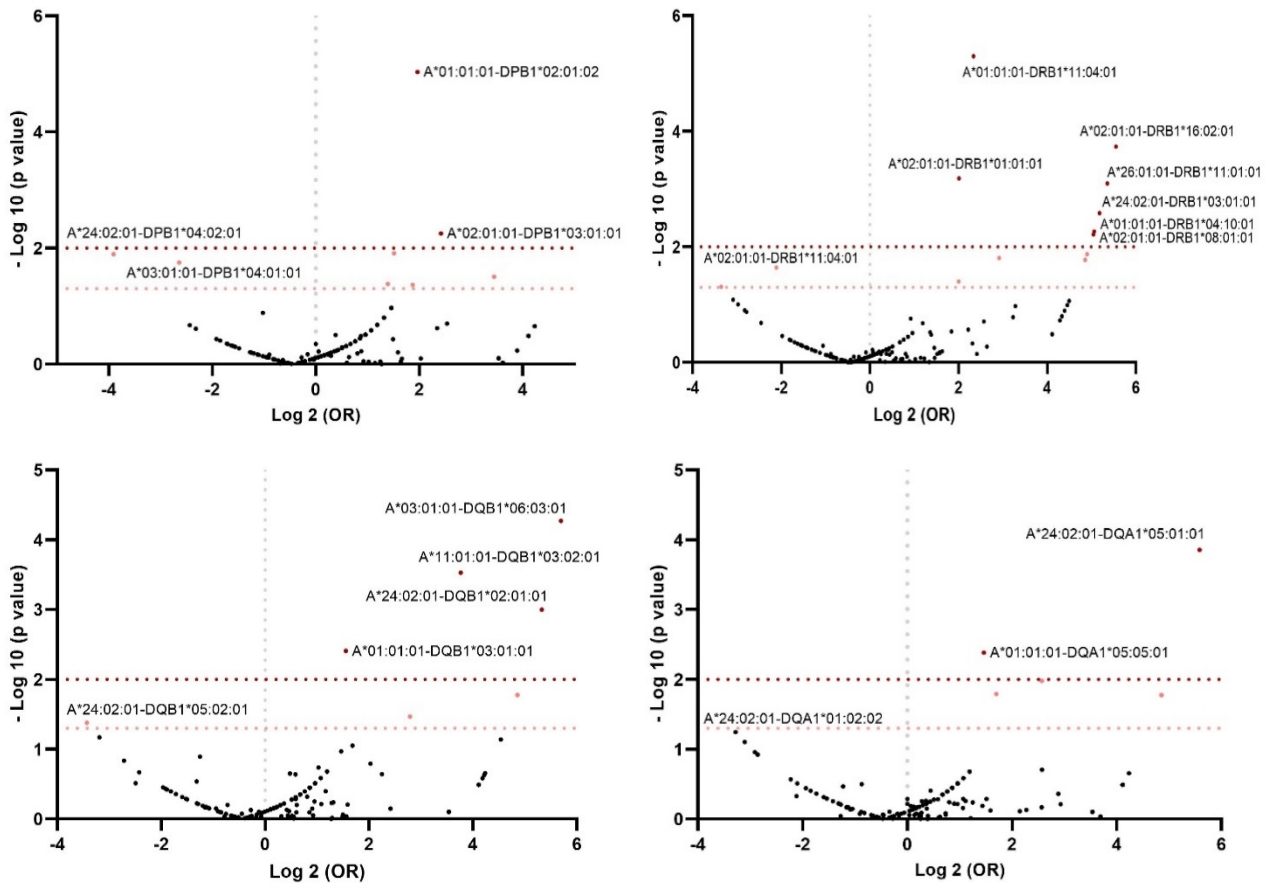
Фигура 5. Разпределение на HLA клас II дву-локусните хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot* графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p -стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на $p = 0.01$, като точки над линията са със стойности 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 $p > 0.05$.

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

3.1. 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, открояващи се със силно изразена ($p \leq 0.01$) статистически значима повишена честота при дълголетници (фигура 6). 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.

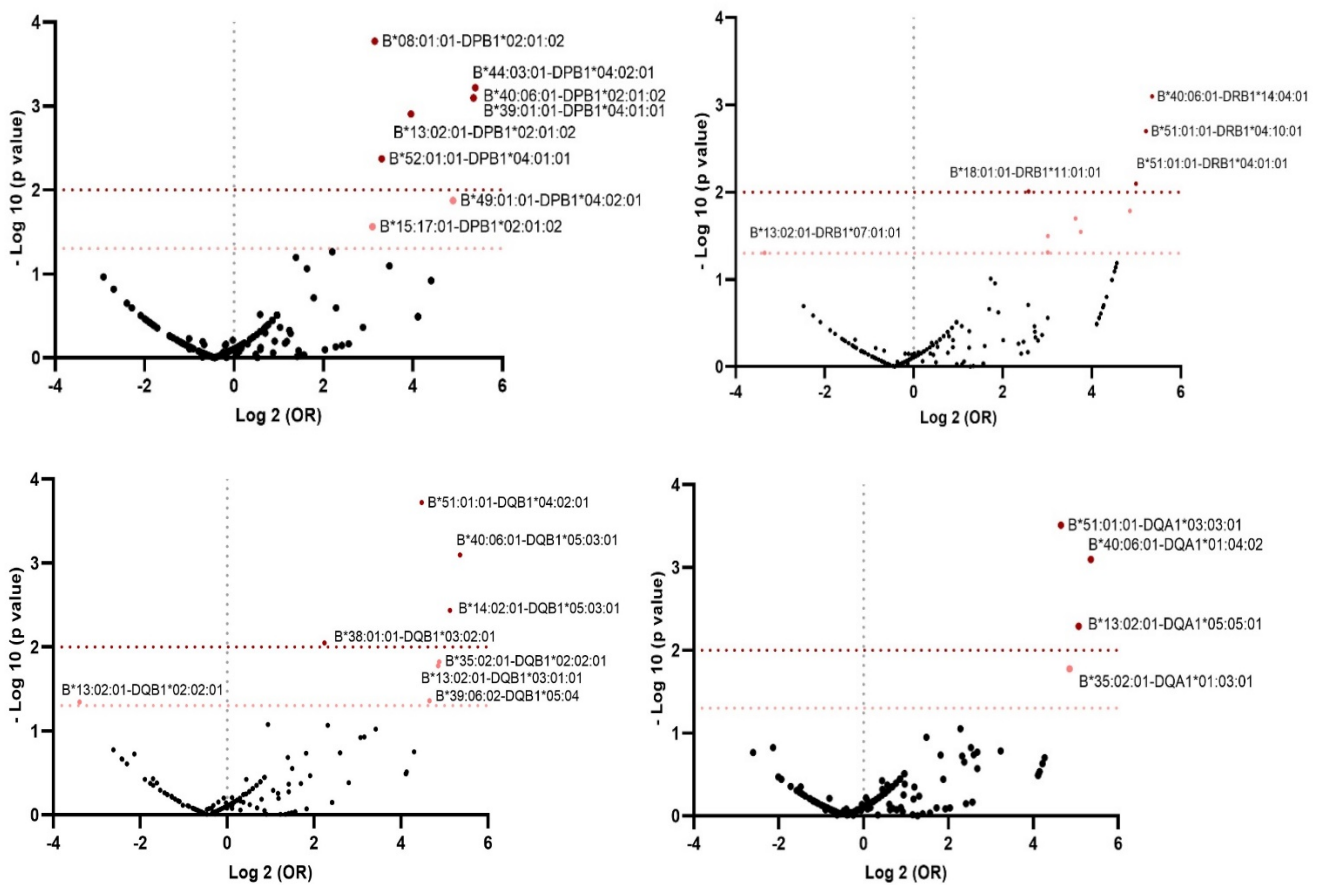


Фигура 6. Разпределение на HLA-A - HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot* графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p -стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на $p = 0.01$, като точки над линията са със стойности на $p < 0.01$ 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 $p > 0.05$.

3.2. 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 7). Осем от седемнадесетте хаплогена 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 хаплогена 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. С гранични стойности на статистическа значимост, негативна асоциация с дълголетието се установяват за два хаплогена: HLA-B*13:02:01-DQB1*02:02:01 и -B*13:02:01-DRB1*07:01:01.

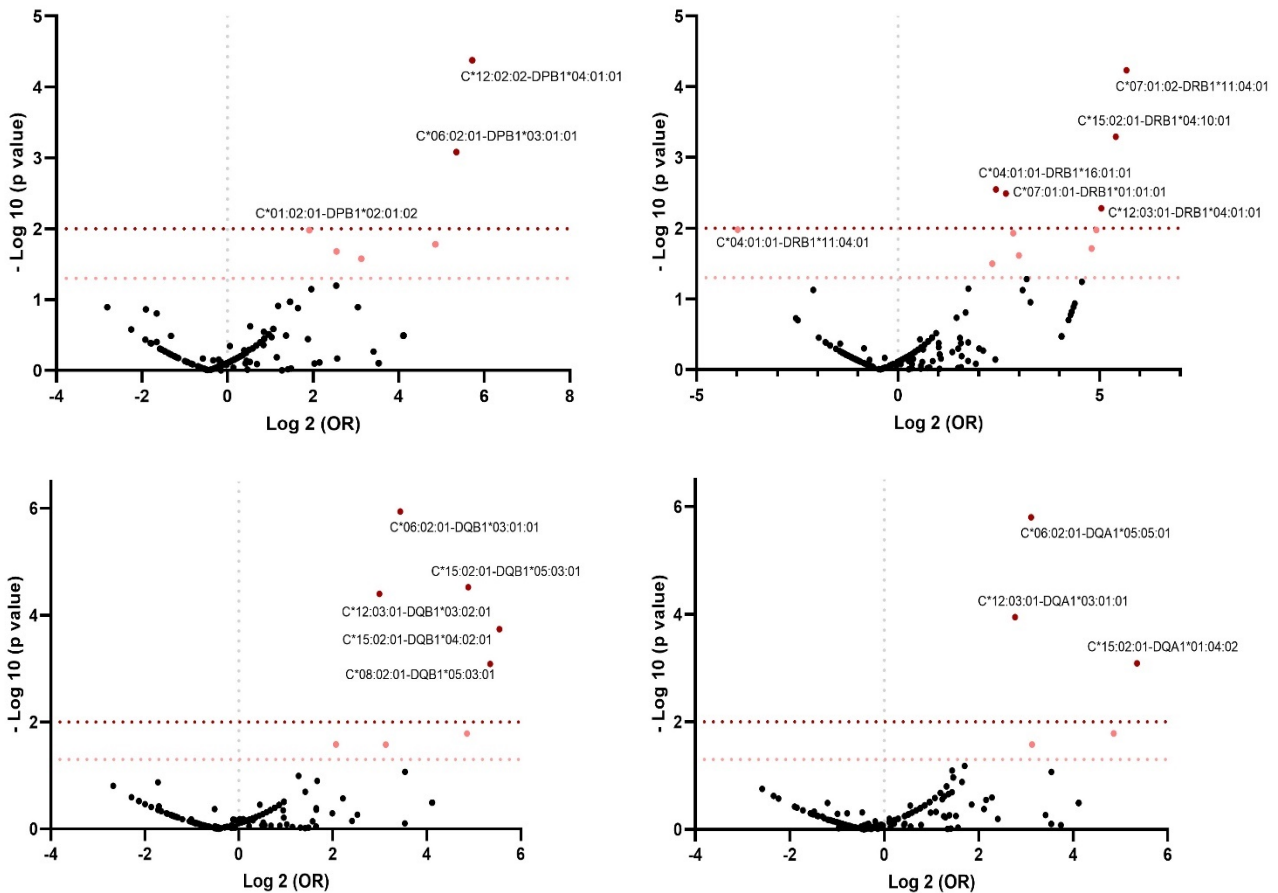


Фигура 7. Разпределение на HLA-B - HLA клас II хаплогена при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot* графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо *p*-стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на $p = 0.01$, като точки над линията са със стойности 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 $p > 0.05$.

3.3. Сравнителен анализ на HLA-C - HLA клас II хаплогените честоти при двете изследвани групи

Сравнителния анализ разкри наличието на 16 хаплогена със силна, статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници (фигура 8). HLA-

С 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.

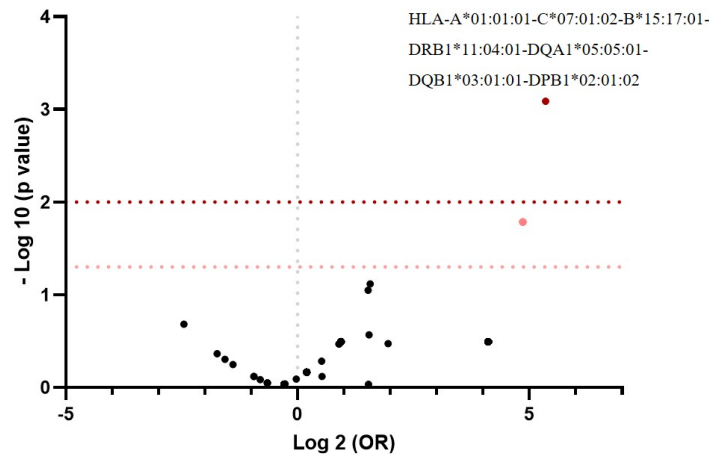


Фигура 8. Разпределение на HLA-C - HLA клас II хаплотипи при здрави възрастни и млади индивиди от българската популация. *Volcano plot* графика представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p -стойностите. Прекъснатата червена линия отговаря на $p = 0.01$, като точки над линията са със стойности на $p < 0.01$ 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 $p > 0.05$.

4. Разгърнат HLA-A-C-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 хаплотип наблюдаван със значителна повишена честота при здрави възрастни индивиди от българската популация

Извършения разгърнат хаплотипен анализ включващ класическите HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1 локуси, разкрива силна, позитивна асоциация с дълголетие 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 9).



Фигура 9. 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 състава на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със силна, статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници от българската популация, преобладаващи (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. 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 като силно асоциирани протективни алели за синдрома на придобитата имунна недостатъчност (СПИН), като резултат от генерирането на силно афинитетни ХИВ-специфични цитотоксични Т клетки (Fiorillo et al. 2017; Chikata et al. 2017).

Негативна асоциация с дълголетие се установява за няколко дву-локусни класически HLA хаплотипа, всички характеризирани се със стойности на статистическа значимост варираща 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

субтипозете също асоцииран със заболяването (G. P. Thomas and Brown 2010). Хаплотипната асоциация на В*27:02 алелната специфичност наблюдавана с повишена честота в изследваната група от млади индивиди и гранични стойности на статистическа значимост е В*27:02:01-С*02:02:02. HLA-С*02:02 от своя страна е описан като предразполагащ алел за развитието на В-клетъчната неоплазия - множественият миелом (Veksac et al. 2016).

В състава на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със силна, статистически значима повишена честота при дълголетници от българската популация, преобладават 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. HLA-DRB1*11 алелната група в редица проучвания е описана като протективна срещу развитието на: ревматоиден артрит (РА) (Mattey et al. 2001), на тежки чернодробни увреждания при пациенти с хронична хепатит С инфекция, на множествена склероза (Kaimen-maciel et al. 2009; Marangon et al. 2012), на астма (Martyn et al. 2016), както и на ювенилен идиопатичен артрит (Silva et al. 2010). 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 (Milena Ivanova et al. 2019). 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 (Наумова, Е., Иванова 2006). HLA-DQB1*03:01 алелната специфичност при пациенти от българската популация е описана като протективна за диабет тип 1, множествена склероза и системен лупус (Наумова, Е., Иванова 2006). 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 е като протективен за диабет тип 1 (ДТ1) при две френски етнически групи (Guerin1 et al. 2007), а в съседна Гърция е описан като протективен за цъолиакия (глутенова ентеропатия) при деца (Krini et al. 2012). За българската популация HLA-DRB1*11-DQB1*03:01-DQA1*05 е описан като протективен за редица аутоимунни заболявания в частност инсулин зависим захарен диабет, системен лупус еритроматозус, множествена склероза и пемфигус (Наумова, Е., Иванова 2006).

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 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 чрез използване на следваща генерация секвениране. Най-висока степен на полиморфизъм се наблюдава за HLA-H гена с установени 9 алела, следван от HLA-G - 8 алела (таблица 7). 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 7. 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

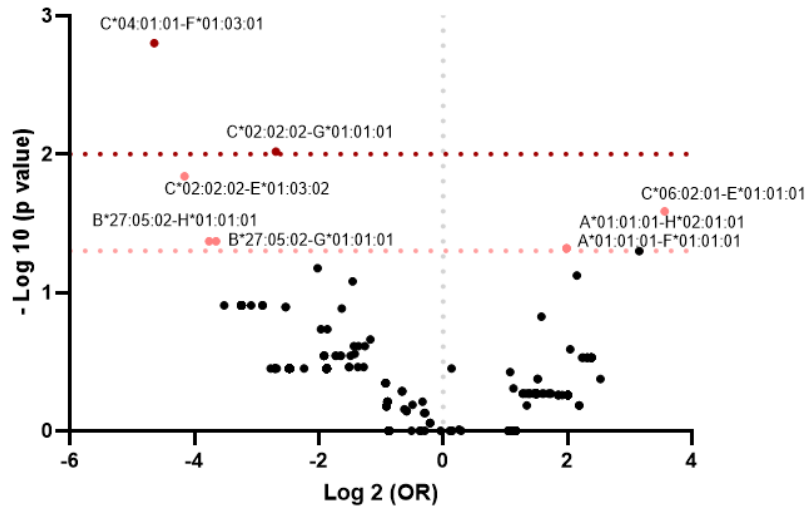
АЧ, алелна честота; Брой, колко пъти се среща/преброява съответния алел в изследваната група; n, Брой изследвани индивиди

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

При извършения сравнителен анализ на алелните честоти на неklasическите HLA клас Ib при възрастни и млади индивиди от българската популация, два алела се установяват с повишена честота при дълголетници: **HLA-G*01:06** (АЧ стари:0.175, АЧ млади: 0.0455, $p=0.04$, $P_c=0.3$) и **H*02:01:01** (АЧ стари:0.2703, АЧ млади: 0.1053, $p=0.03$, $P_c=0.3$), но статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи след прилагане корекцията на Бонферони. Повишената честота на тези две алелни специфичности при дълголетници би могла да се обясни с наличието на силна, неравновесна връзка между HLA-A*01:01:01 (наблюдаван с повишена честота при дълголетници) с всеки от HLA-G*01:06 (стн. остатък: 5.992) и H*02:01:01 алелите (стн. остатък: 5.771). HLA-G*01:06 се среща със сравнително висока честота (АЧ > 0.07) в Европейските популации, за които има данни. Някои популационни проучвания, описват HLA-G*01:06 като предразполагащ за усложнения при бременност (пreekлампися) и спонтанни аборти (Moreau et al. 2008; Tan et al. 2008). Други изследвания обаче не установяват такава зависимост (Ober et al. 2003; Gustavo et al. 2011; Kuroshli et al. 2015). 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 варираща между 0.021 – 0.044 (Project et al. 2015; Paganini et al. 2019). 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**).

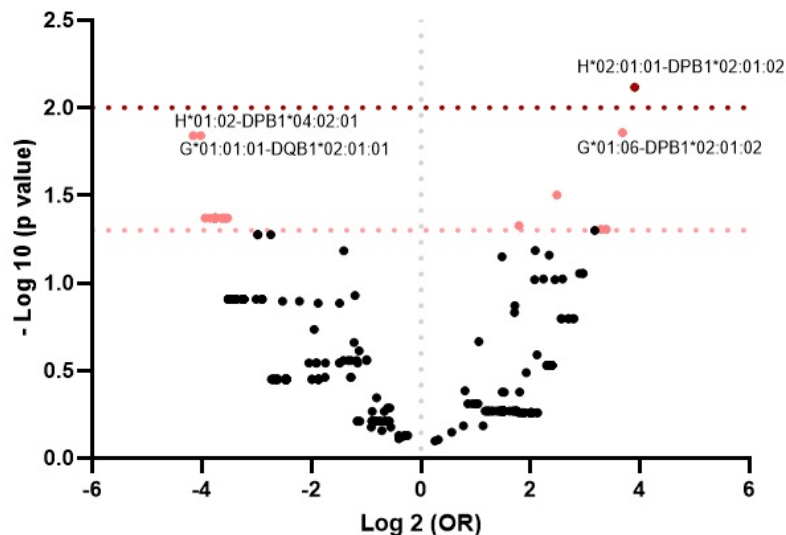
II. Дву-локусни хаплотипи, засягащи класическите HLA клас I, клас II локуси и неklasическите HLA клас I гени

1. Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на класически HLA клас I – неklasически HLA клас I хаплотипи при двете изследвани групи



Фигура 10. Сравнителен анализ на класическите HLA клас I – неklasически 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 $p > 0.05$

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



Фигура 11. Сравнителен анализ на класическите HLA клас II – неklasически 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 $p > 0.05$

До тук получените резултати, очертават определени тенденции за двете изследвани групи. При дълголетници неklasическите 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. 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 (Hò et al. 2019). Допълнително, HLA-F*01:01 се характеризира с по-добро представяне на протеини, ангажирани с ензимни регулаторни процеси (Gia-gia et al. 2019). Проучване проведено в Португалската популация, описва HLA-F*01:01:02 алелната специфичност като протективна за анкилозираш спондилит (Santos et al. 2018). При дълголетници, H*02:01:01 се наблюдава с повишена честота на алелно ниво ($P=0.03$, $P_c=0.3$), 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. 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. При рак на дебелото черво, HLA-E*01:03 се асоциира с туморната прогресия (Bossard et al. 2012). От друга страна съществуват данни за асоциацията на ниско-експресивната HLA-E*01:01 специфичност с някои автоимунни заболявания като псориазис (Zeng et al. 2013), анкилозираш спондилит (Paladini et al. 2009) и диабет тип 1 (Hodgkinson, Millward, and Demaine 2000), 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 стои 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 неklasическите HLA клас I свързани гени MICA и MICB при представители на здравата българска популация чрез използване на секвениране от следващо поколение. 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 8). 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 групов специфичност (MICB*005:02, *005:03, *005:01, *005:08, *005:06).

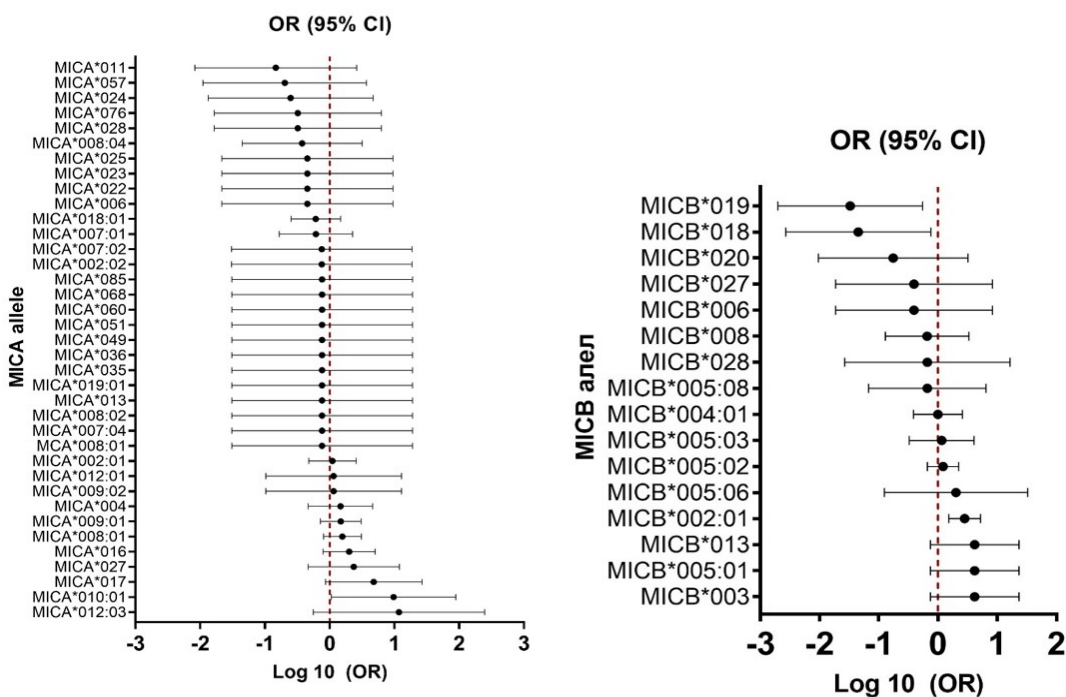
Таблица 8. MICA и MICB полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

MICA алел (n=132)	АЧ	Брой	%	MICB алел (n=118)	АЧ	Брой	%
MICA*008:01	0,1667	44	16,7	MICB*005:02	0,2587	68	25,9
MICA*009:01	0,1402	37	14,0	MICB*002:01	0,2417	63	24,2
MICA*018:01	0,1212	32	12,1	MICB*019	0,1058	28	10,6
MICA*002:01	0,1061	28	10,6	MICB*004:01	0,0888	23	8,9
MICA*016	0,0758	20	7,6	MICB*018	0,0803	21	8,0
MICA*007:01	0,053	14	5,3	MICB*005:03	0,0466	12	4,7
MICA*004	0,0492	13	4,9	MICB*008	0,0339	9	3,4
MICA*008:04	0,0265	7	2,7	MICB*003	0,0254	7	2,5
MICA*011	0,0265	7	2,7	MICB*005:01	0,0254	7	2,5
MICA*017	0,0227	6	2,3	MICB*013	0,0254	7	2,5
MICA*027	0,0227	6	2,3	MICB*020	0,0212	6	2,1
MICA*057	0,0189	5	1,9	MICB*005:08	0,0169	4	1,7
MICA*010:01	0,0189	5	1,9	MICB*006	0,0085	2	0,9
MICA*024	0,0152	4	1,5	MICB*027	0,0085	2	0,9
MICA*028	0,0114	3	1,1	MICB*005:06	0,0085	2	0,9
MICA*076	0,0114	3	1,1	MICB*028	0,0044	1	0,4
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				
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				
MICA*008:01	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

Анализ на MICA алелното разпределение в българската популация показва, че няма статистически значима разлика в MICA алелните честоти при здрави възрастни и млади индивиди (фигура 12).



Фигура 12. Графика тип „гора“ (forest plot) изразяваща съотношението на шансовете (OR) и 95% доверителен интервал (95% CI) за MICA и MICB 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. 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. MICB*002:01 (АЧ млади: 0.1734, АЧ стари: 0,3718, $P_C=0.01$), който е и най-често срещания MICB алел при възрастни (37,18%), се наблюдава със статистически значима по-висока честота при възрастни индивиди от българската популация. MICB*002:01 е описан като протективен алел при автоимунни заболявания, като системен лупус еритематозус (СЛЕ) и РА в китайската популация (Wang et al. 2018; Ping Yu, Quan Zhu, Chunjing Chen, Xiaoling Fu, Yu Li, Limin Liu, Qizhi Luo 2017). 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 (Chen et al. 2019). Този алел е описан и като протективен за респираторна синцитиална вирусна инфекция при деца (Luo et al. 2017). На този етап сравнително малко проучвания са изследвали значението на MICB алелния и хаплотипен полиморфизъм при физиологични и патологични

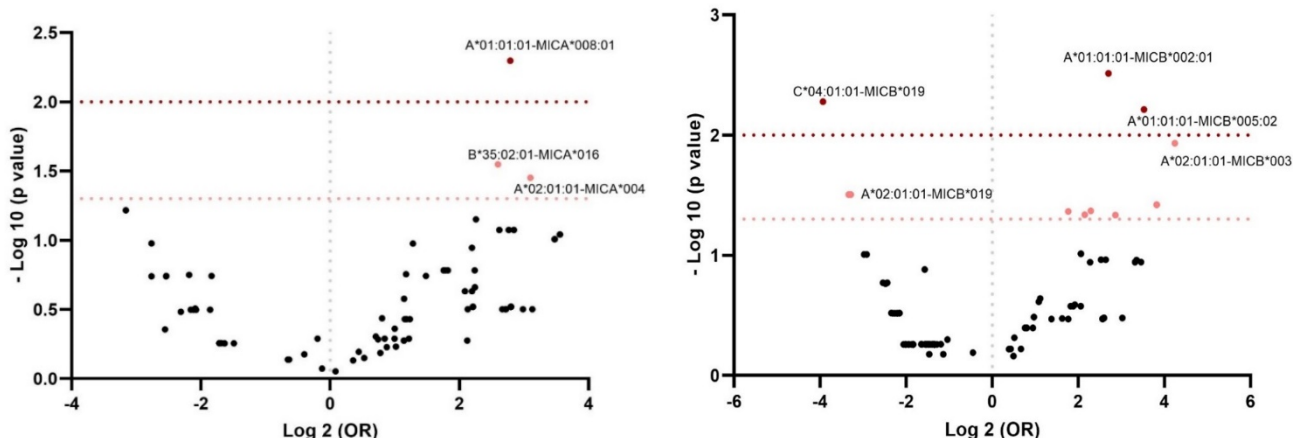
условия, като основния дял от тези проучвания обхваща популациите от източна и югоизточна Азия.

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 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, някои предполагат неговата положителната 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 (Baek et al. 2018; Shi et al. 2015; Hughes et al. 2005). Допълнително, често срещаната във всички човешки популации CMV инфекция се характеризира с блокиране експресията на MICA молекулите на повърхността на инфектираните клетки, като само MICA*008 алела се явява устойчив на това потискане (M. Thomas et al. 2008; Ashiru et al. 2009).

II. Дву-локусни хаплотипи

1. Сравнителен анализ на HLA клас I –MICA хаплотипните честоти при двете изследвани групи здрави възрастни и млади индивиди от българската популация

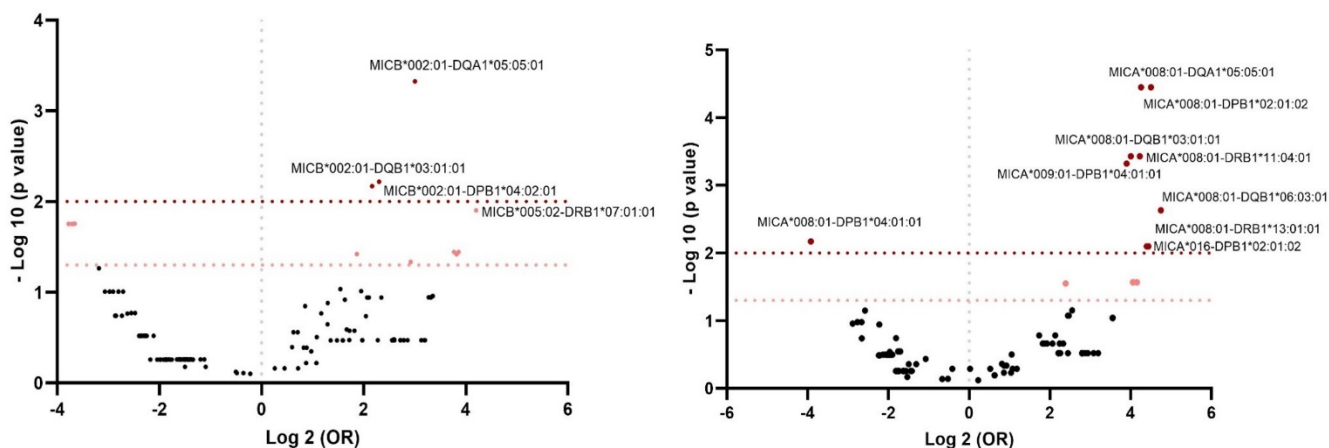
Няколко хаплотипни асоциации на HLA-A локуса с MICA и MICB гените се наблюдават със силна статистически значима повишена честота при дълголетници ($p \leq 0.01$) (фигура 13). Наблюдаваните разлики в хаплотипните честоти на HLA-B-MIC и HLA-C-MIC хаплотипните са със гранични стойности на статистическа значимост ($0.05 \geq p \geq 0.01$). Установяват се някои негативни асоциации със стареенето.



Фигура 13. Сравнителен анализ на HLA клас I – MICA, 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 $p > 0.05$

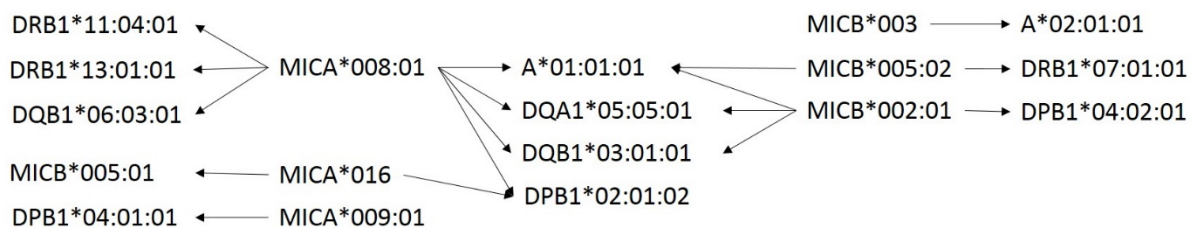
2. Сравнителен анализ на MIC – HLA клас II хаплотипните честоти при двете изследвани групи

Редица MIC – HLA клас II хаплотипи се проявяват със силна статистически значима повишена честота при дълголетници ($p \leq 0.01$) (фигура 14).



Фигура 14. Сравнителен анализ на MICA - 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 $p > 0.05$

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 15.



Фигура 15. Дву-локусни МІС-класически HLA хаплотипи, наблюдавани със силно изразена статистически значима повишена честота ($p \leq 0.01$) при дълголетници от българската популация

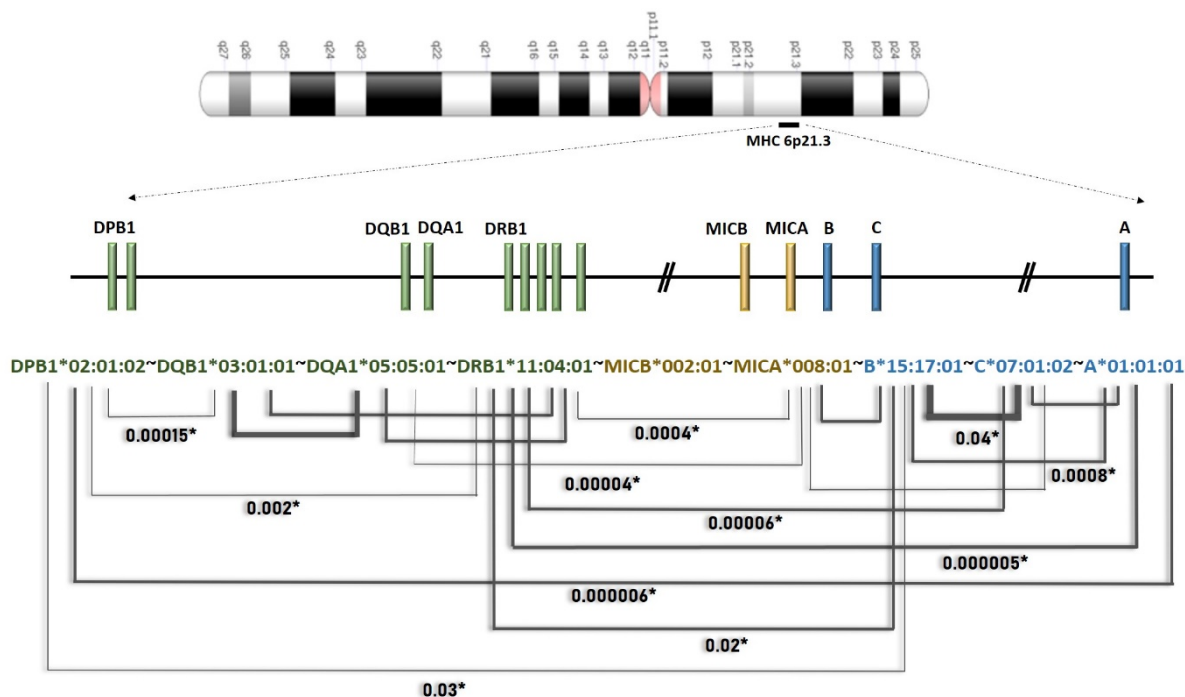
Прави впечатление, че три MICA алелни специфичности са в основата на дву-локусните хаплотипи наблюдавани със статистически значима повишена честота при възрастни: MICA*008:01, MICA*016 и MICA*009:01, което е в съответствие с MICA алелното разпределение при дълголетници. Единствената силно изразена ($p \leq 0.01$) асоциация с HLA клас I алел се установява за хаплотип **HLA-A*01:01:01~MICA*008:01**, който е и най-често представения HLA-A-MICA хаплотип при възрастни. Това е съответствие с предходни проучвания на изследователския колектив върху дълголетници от българската популация (M. Ivanova et al. 2019) 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 в основата на още два дву-локусни MICA 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 15 дву-локусни хаплотипи, открояващи се със силно изразена, статистически значима позитивна асоциация с дълголетие ($p \leq 0.01$) 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 $0.05 \geq p > 0.01$. 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. Останалите MICA*008:01 дву-локусни хаплотипи наблюдавани със значителна повишена честота при дълголетници, 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**.

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. Тези асоциации на MICA*008:01 са с HLA клас II алелни специфичности (DRB1*11:04:01, -DQB1*03:01:01) описани като протективни за редица аутоимунни заболявания при индивиди от българската популация и наблюдавани в настоящата работа с повишена честота в хаплотипни асоциации при дълголетници. 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. 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 са част от HLA 8.1 потомствения хаплотип, описан като един от големите генетични детерминанти на редица аутоимунни заболявания.

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 дълголетници (фигура 15). 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 сравнителния анализ на В-MICB и С-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 алелните 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, -DQA1, -DQB1 и -DPB1 потвърждава по-голямата част от описаните до тук статистически значими, дву-локусни и разгърнати хаплотипни асоциации с дълголетие. Сравнителен анализ на хаплотипните честоти на разгърнати хаплотипи обхващащи некласическите MIC и седем класически HLA клас I и клас II локуси установи статистически значима повишена честота на **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** хаплотипа (ХЧ стари: 0.0375, ХЧ млади: 0, P=0.03), което е в съответствие с наблюдаваните в настоящия дисертационен труд асоциации (фигура 16).



Фигура 16. Разгърнат HLA-A, -B, -C, -MICA, -MIB, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1 хаплотип, позитивно асоцииран с дълголетие при здрави, възрастни индивиди от българската популация. Алели в състава на разгърнатия хаплотип, между които се установява 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.

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

Старенето 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 (Peña-ouarzu 2020). Оралният спиноцелуларен 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 (Montero and Snehal 2015).

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 9).

Таблица 9. MICA, MICB алелни честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином

MICA алел	АЧ	Брой	%	MICB алел	АЧ	Брой	%
MICA*008:01	0,1551	9,3	15,5	MICB*005:02	0,3000	18,0	30,0
MICA*016	0,1207	7,2	12,1	MICB*002:01	0,1833	11,0	18,3
MICA*009:01	0,1034	6,2	10,3	MICB*019	0,1334	8,0	13,3
MICA*002:01	0,069	4,1	6,9	MICB*018	0,1000	6,0	10,0
MICA*010:01	0,0517	3,1	5,2	MICB*005:01	0,0667	4,0	6,7
MICA*006	0,0517	3,1	5,2	MICB*008	0,0667	4,0	6,7
MICA*004	0,0517	3,1	5,2	MICB*028	0,0333	2,0	3,3
MICA*024	0,0517	3,1	5,2	MICB*020	0,0333	2,0	3,3
MICA*012:01	0,0517	3,1	5,2	MICB*010	0,0167	1,0	1,7
MICA*009:02	0,0345	2,1	3,5	MICB*013	0,0167	1,0	1,7
MICA*013	0,0345	2,1	3,5	MICB*005:03	0,0167	1,0	1,7
MICA*042	0,0345	2,1	3,5	MICB*005:06	0,0167	1,0	1,7
MICA*028	0,0345	2,1	3,5	MICB*003	0,0167	1,0	1,7
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				

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

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. 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 10).

Таблица 10. Сравнителен анализ на MICA алелното разпределение при пациенти с OSCC и две групи здрави представители на българската популация (здравя възрастни и здрава контролна група)

MICA алел	Брой Здравя възрастни (n=40)	Брой Здравя индивиди (n=132)	Брой пациенти OSCC (n=30)	P	Pc	OR (95% CI)
MICA*002:01	9,0	28,0	4,1	0,38		0,59 (0,17-1,97)
				0,39		0,62 (0,21-1,83)
MICA*004	5,0	13,0	3,1	1,00	1	0,82 (0,19-3,51)
						1,05 (0,30-3,76)
MICA*006	0,0	2,0	3,1	0,08	1,74	7,12 (1,18-43,01)
				0,045		
MICA*007:01	3,0	14,0	1,0	0,64		0,45 (0,05-4,32)
				0,32		0,31 (0,04-2,36)
MICA*008:01	17,0	45,0	9,3	0,39		0,68 (0,28-1,64)
				0,77		0,89 (0,41-1,93)
MICA*008:04	1,0	7,0	0,0	1,00		
				0,36		
MICA*009:01	14,0	37,0	6,2	0,23		0,54 (0,20-1,50)
				0,45		0,71 (0,29-1,74)
MICA*009:02	1,0	3,0	2,1	0,58		2,82 (0,25-31,46)
				0,23		3,10 (0,52-18,61)
MICA*010:01	4,0	5,0	3,1	1,00		1,04 (0,23-4,75)
				0,17		2,83 (0,67-12,02)
MICA*011	0,0	7,0	1,0	0,43		
				1		0,64 (0,08-5,18)
MICA*012:01	1,0	3,0	3,1	0,31		4,31 (0,44-42,09)
				0,08		4,73 (0,94-23,69)
MICA*012:03	2,0	2,0	0,0	0,51		
				1		
MICA*013	0,0	1,0	2,1	0,18		
				0,09		9,37 (0,85-103,39)
MICA*016	9,0	20,0	7,2	0,88		1,08 (0,38-3,07)
				0,26		1,67 (0,68-4,12)
MICA*017	4,0	6,0	0,0	0,13		
				0,6		
MICA*018:01	7,0	32,0	1,0	0,14	0,62	0,18 (0,02-1,48)
				0,016		0,13 (0,02-0,92)
MICA*022	0,0	2,0	1,0	0,43		
				0,46		2,29 (0,21-24,97)
MICA*024	0,0	4,0	3,1	0,08		
				0,12		3,53 (0,78-15,98)
MICA*027	3,0	6,0	1,0	0,64		0,45 (0,05-4,32)
				1		0,75 (0,09-6,20)
MICA*028	0,0	3,0	2,1	0,18		
				0,23		3,10 (0,52-18,61)
MICA*035	0,0	1,0	1,0	0,43		
				0,34		4,59 (0,29-72,67)
MICA*042	0,0	0,0	2,1	0,18	1,29	
				0,03		
MICA*049	0,0	1,0	1,0	0,43		
				0,34		4,59 (0,29-72,67)
MICA*063N	0,0	0,0	1,0	0,43		
				0,19		

MICA*076	0,0		1,0	0,43		
		3,0			0,56	
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 M1CB алелните честоти при пациенти с орален спиноцелуларен карцином и две изследвани групи здрави индивиди от българската популация

M1CB 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 M1CB*002:01 (таблица 11). При извършения сравнителен анализ между здрави възрастни индивиди и пациенти с OSCC, това наблюдение се запазва, като M1CB*002:01 отново се откроява с повишена честота при дълголетници. При същия сравнителен анализ и M1CB*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 M1CB алелните честоти при пациенти със спиноцелуларен карцином и цялостната група здрави индивиди от българската популация, от двете M1CB алелни специфичности, само M1CB*004:01 алела, запазва негативна асоциация със спиноцелуларния карцином (АЧ здрави: 0.0888, АЧ пациенти: 0, P= 0.01, Pc=0.18). Като се вземат предвид описаните данни в настоящата работа, засягащи индивиди от българската популация, M1CB*002:01 алелната специфичност се очертава като генетичен маркер позитивно асоцииран в частност с дълголетието, докато M1CB*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.

Таблица 11. Сравнителен анализ на MICB алелното разпределение при пациенти с OSCC и две групи здрави представители на българската популация (здравни възрастни и здрава контролна група)

MICB алел	Брой Здравни възрастни (n=40)	Брой здравни (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		
MICB*003	4,0		1,0	0,39	1	0,31 (0,03-2,88)
		6,7		0,65 (0,08-5,43)		
MICB*004:01	7,0		0,0	0,019	0,28	
		23,3		0,011		
MICB*005:01	4,0		4,0	0,73	0,13	1,32 (0,32-5,51)
		6,7		2,74 (0,77-9,8)		
MICB*005:02	22,0		18,0	0,82	0,51	1,09 (0,52-2,29)
		67,8		1,23 (0,66-2,28)		
MICB*005:03	4,0		1,0	0,39	0,48	0,31 (0,03-2,88)
		12,2		0,35 (0,04-2,72)		
MICB*005:06	1,0		1,0	1,00	0,46	1,31 (0,08-21,37)
		2,2		1,98 (0,18-21,29)		
MICB*005:08	1,0		0,0	1,00	1	
		4,4				
MICB*008	2,0		4,0	0,40	0,27	2,72 (0,48-15,39)
		8,9		2,04 (0,6-6,86)		
MICB*010	0,0		1,0	0,43	0,19	
		0,0				
MICB*013	4,0		1,0	0,39	1	0,31 (0,03-2,88)
		6,7		0,65 (0,08-5,43)		
MICB*018	0,0		6,0	0,0058	0,09	1,27 (0,49-3,3)
		21,0				
MICB*019	0,0		8,0	0,001	0,539	1,3 (0,56-3,02)
		27,7				
MICB*020	0,0		2,0	0,19	0,646	1,59 (0,31-8,21)
		5,6				
MICB*028	0,0		2,0	0,19	0,09	7,79 (0,77-78,52)
		1,2				

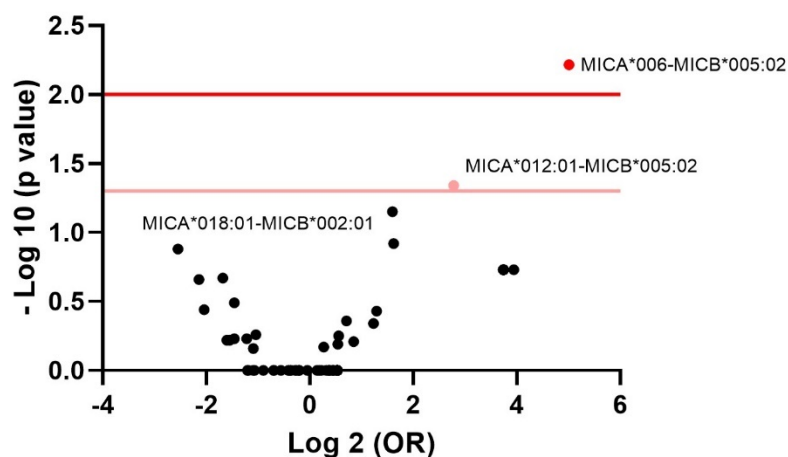
Брой, колко пъти се преброява/среща съответния алел в изследваната група; Odds ratio (OR), съотношение на шансовете; CI, доверителен интервал (95%). Приложена е корекция за множественост на Бонферони. Коригирани P стойности (Pc) ≤ 0.05 се считат за статистически значими. Представен е извършения анализ 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 някои негативни асоциации с дълголетие. 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 здрави индивиди от българската популация в по-голям възрастов диапазон, 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 (Liu Chung-Ji, Lee Yann-Jinn, Liu Hsin-Fu, Dang Ching-Wen, Chang Che-Shoa, Leu Yi-Shing 2002), а в японската е описан като предразполагащ фактор за развитие на хепатоцелуларен карцином (Kumar et al. 2011). 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 (фигура 17).

II. Сравнителен анализ на MICA-MICB хаплотипните честоти при пациенти със спиноцелуларен карцином и двете изследвани групи здрави индивиди от българската популация

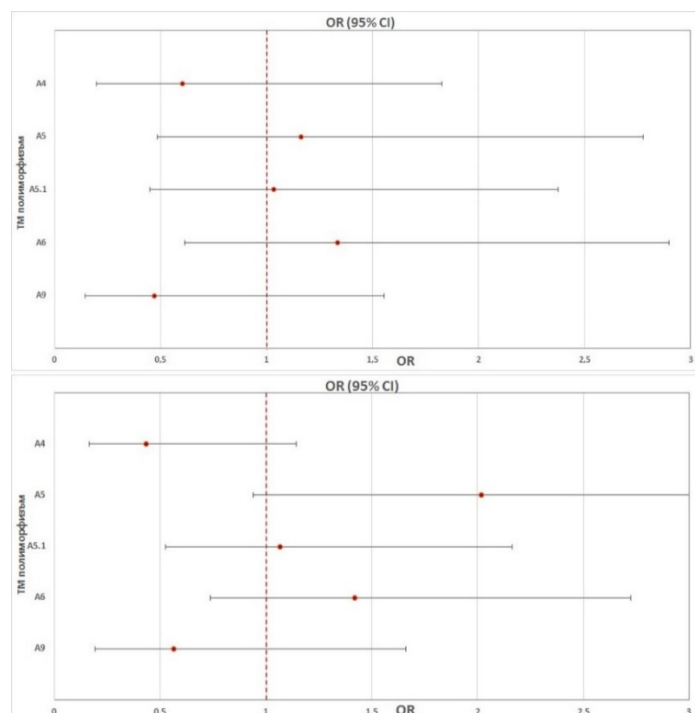
Силна позитивна асоциация с оралния спиноцелуларен карцином ($p < 0.01$) се установява за MICA*006-MICB*005:02 хаплотипа, който не се наблюдава в групата от здрави индивиди от българската популация. С повишена честота при пациенти и гранични стойности на статистическа значимост се установява и MICA*012:01-MICB*005:02 хаплотипа.



Фигура 17. 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 $p > 0.05$.

III. Сравнителен анализ на MICA трансмембрания полиморфизъм при пациенти с OSCC и две изследвани групи здрави индивиди от българската популация

Изследване на трансмембрания полиморфизъм характерен за MICA молекулата при пациенти и здрави индивиди, не разкри наличието на статистическа значима разлика между изследваните групи. Наблюдава се тенденция към повишена честота на A4 и A9 алелите при здрави индивиди от българската популация (фигура 18). 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 TM полиморфизма и риска за развитие на злокачествени заболявания. A4 алела е описан като протективен при рак на маточната шийка в шведската популация (Access et al. 2014) и рак на гърдата в иранската (Vallian et al. 2012). Мащабно мета-проучване посочва A9 алела като важен протективен фактор за развитието на злокачествени заболявания в кавказоидната раса (Mengyao Ji et al. 2015). В датската популация MICA-A9 е асоцииран с намален риск от развитие на орален спиноцелуларен карцином (Reinders et al. 2006).



Фигура 18. Графика тип „гора“ (forest plot) изразяваща съотношението на шансовете (OR) и 95% доверителен интервал (95% CI) за MICA TM 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)

IV. 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. Извършения анализ на ковариацията, установи липса на статистическа значимост в нивата на разтворими sMICA [F (1, 73) = 0.198, p=0.658] и sMICB [F (1, 35) = 0.541, p=0.467] молекули между изследваните групи (пациенти и здрави индивиди), като се вземат предвид възрастта и пола като ковариабилни фактори.

Таблица 12. Резултати от анализ на ковариацията между пациенти с OSCC и здрави индивиди от българската популация с ковариабилни фактори пол и възраст

	df		F		p	
	sMICB	sMICA	sMICB	sMICA	sMICB	sMICA
Възраст	1	1	0,0053	2,1170	0,942	0,150
Пол	1	1	2,9050	0,6890	0,097	0,409
Изследвани групи	1	1	0,5406	0,1980	0,467	0,658
Грешка	35	73				
Общо	39	77				

Df, степени на свобода (degree of freedom); F, Функция на разпределение; P стойностите са определени чрез Ансова тест. За статистически значими се приемат стойности на $p \leq 0.05$.

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 дълголетие 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 дълголетие 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 дълголетие 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 A6 полиморфизъм с орален спиноцелуларен карцином. Друга установена тенденция е към повишена честота на A4 и A9 TM алелите при здрави индивиди от българската популация.

ИЗВОДИ

1. Въведеният нов хибридизационен NGS подход се характеризира с лесно изпълнение на метода, по-кратко технологично време, преодоляване на някои 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 аутоимунни 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.

ПРИНОСИ

1. За пръв път е въведен и оптимизиран нов хибридизационен NGS подход, който може успешно да бъде приложен в клиничната практика за едновременен анализ на класически и неklasически HLA гени.
2. Проучено е алелното и хаплотипно разпределение на класическите HLA клас I и клас II гени при здрави млади и възрастни индивиди българската популация, дефинирани чрез използване на типизиране с висока разграничителна способност.
3. За пръв път е изследван алелния и хаплотипен полиморфизъм на неklasическите HLA клас Ib (HLA-E, -F, -G, -H) и клас I свързаните MICA и MICB гени при здрави индивиди от българската популация.
4. За пръв път е изследвана асоциацията на неklasическите HLA гени на алелно и хаплотипно ниво с процесите на успешно стареене в българската популация.
5. За пръв път са определени разгърнати хаплотипи включващи класически и неklasически HLA гени при здрави, възрастни индивиди от българската популация, които могат да се използват за предиктивни биомаркери за „успешно стареене“.
6. Проучен е MICA и MICB алелния полиморфизъм при пациенти от българската популация, диагностицирани с агресивната неоплазия орален спиноцелуларен карцином (OSCC), която се характеризира с по-голяма честота на проява с напредване на възрастта.
7. Проучена е ролята на серумните нива на секреторни MICA и MICB молекули като предиктивни маркери при пациенти с орален спиноцелуларен карцином.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ

1. Ал Хадра Б, Иванова-Шиварова М, Деливерска Е, Стоянов Х, Стефанов Л, Шиваров В. МІСА–характеристика и роля при спиноцелуларния карцином в устната кухина. сп. „Здраве и наука”, юни 2017, стр 2-6
2. **Al Hadra B**, Deliverska E, Stoianov H, Nediakova A, Lukanov T, Shivarov V, et al. Investigation of HLA Genes, HLA Molecules and Other Factors in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Journal of IMAB. 2018;24(3):2133–41.
3. Ivanova M, Creary LE, **Al Hadra B**, Lukanov T, Mazzocco M, Sacchi N, et al. 17th IHIW component “Immunogenetics of Ageing” – New NGS data. Human Immunology. 2019;80(9).
4. **Al Hadra B**. SOME OF THE IMMUNOGENETICS ASPECTS OF AGING. Journal of Biomedical and Clinical Research. 2021; 14:16–30.
5. Ivanova M, **Al Hadra B**, Yordanov S, Lesichkova S, Stoyanov H, Shivarov V, et al. Associations of high-resolution-typing-defined MICA and MICB polymorphisms, and the levels of soluble MICA and MICB with Oral Squamous Cell Carcinoma in Bulgarian patients. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2021;50(8):758–65.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Bushra N. Al Hadra**, Deliverska E, Stoianov H, Nediakova, A, Lukanov T, Shivarov V, Naumova E, Ivanova M. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 31st EFI; 25th DGI Joint Meeting, 30.05-03.06.2017, Хайделберг, Германия. **Постер**
2. 4^{то} Черноморско международно училище по имунология. 4th Black Sea International Immunology School. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 20 – 22 Октомври 2017, Старосел, Хисаря, България. **Устна презентация**
3. Първи младежки семинар по генетика. **Ал Хадра Б**, Деливерска Е, Стоянов Х, Недялкова А, Луканов Ц, Шиваров В, Наумова Е, Иванова М. MICA асоциация с орален спиноцелуларен карцином. 24 Ноември 2017, София. **Постер**
4. **Al Hadra Bushra**, ALI Shahrukh, Deliverska Elitsa, Stoyanov Hristo, Yovchev Dimitar, Nediakova Antoaneta, Lukanov Tsvetelin, Shivarov Velizar, Naumova Elissaveta, Ivanova Milena. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. ICMS International Congress, 10-13 Май 2018, София, България. **Постер**

5. 5ти национален конгрес по имунология. Fifth national congress of immunology. Immunogenetics of aging. Milena Ivanova, **Bushra Al Hadra**, Tsvetelin Lukanov, Reem Ameen, Michela Mazzoco, Nicoletta Sacchi, Peana Constantinescu, Lisa Creary, Tamara Vayntrub, Velizar Shivarov, Elissaveta Naumova, 25 – 28 Октомври 2018, Пловдив, България. **Устна презентация**
6. 5ти национален конгрес по имунология. Fifth national congress of immunology. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. **Bushra N. Al Hadra**, Tsvetelin Lukanov, Elitza Deliverska, Hristo Stoianov, Antoaneta Nedialkova, Velizar Shivarov, Elissaveta Naumova, Milena Ivanova, 25 – 28 Октомври 2018, Пловдив, България. **Устна презентация**
7. 11th EFIS-EJI South East European Immunology school (SEEIS2019). IMMUNOGENETICS OF AGEING. **Bushra Al Hadra**¹, Lisa Creary⁵, Tsvetelin Lukanov¹, Reem Ameen², Michela Mazzoco³, Nicoletta Sacchi³, Peana Constantinescu⁴, Velizar Shivarov⁶, Elissaveta Naumova¹, Tamara Vayntrub⁵, Milena Ivanova¹. 27-20 Септември 2019, Прищина, Косово. **Устна презентация и постер**
8. 14th East-West Immunogenetics Conference (EWIC2020). NON-CLASSICAL HLA GENES POLYMORPHISM IN BULGARIAN POPULATION - A PILOT STUDY UTILIZING NEW NGS TECHNOLOGY. **Bushra Al Hadra**, Tsvetelin I. Lukanov, Lidya D. Tsitselkova, Ilina M. Todorova, Antoaneta R. Nedialkova, Elissaveta Naumova, Milena I. Ivanova. Март 5-7, 2020, Будапеща, Унгария. **Постер**
9. 14th East-West Immunogenetics Conference (EWIC2020). Hybrid Capture – A Novel NGS Approach for High Resolution HLA Typing and Beyond. **Bushra Al Hadra**, Milena Ivanova. Март 5-7, 2020, Будапеща, Унгария. **Устна презентация**
10. Юбилейна конференция по имунология "15 години българска асоциация по клинична имунология" Изследване на полиморфизма на неklasическите HLA клас Іb гени (HLA-E, -F, -G, -H, MICA И MICB) при здрави индивиди от българската популация. 06 - 07 Ноември 2020г, София, България. **Устна презентация**