

# Raznolikost alela i haplotipova HLA u Hrvatskoj i utjecaj na odabir davatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

---

Maskalan, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:345817>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Marija Maskalan

**RAZNOLIKOST ALELA I HAPLOTIPOVA  
HLA U HRVATSKOJ I UTJECAJ NA  
ODABIR DAVATELJA U  
TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH  
MATIČNIH STANICA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
prof. dr. sc. Zorana Grubić

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Marija Maskalan

# **HLA ALLELE AND HAPLOTYPE DIVERSITY IN CROATIA AND ITS IMPACT ON DONOR SELECTION IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
prof. dr. sc. Zorana Grubić

Zagreb, 2020.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Odjelu za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb, pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Zorane Grubić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ŽIVOTOPIS MENTORICE

Zorana Grubić rođena je 10. svibnja 1963. godine u Splitu, diplomirala je 1986. na Biološkom odsjeku PMF u Zagrebu, 1991. je magistrirala, a 1997. doktorirala također na PMF-u. Od 1987. djelatnica je Odjela za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju u KBC Zagreb. U znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u znanstvenom području biomedicina i zdravstvo, polje kliničke medicinske znanosti, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet izabrana je 2005., a 2017. u znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u znanstvenom području prirodnih znanosti, polje biologija, Sveučilište u Zagrebu, PMF. U naslovno znanstveno-nastavno zvanje redovni profesor iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje temeljne medicinske znanosti na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku izabrana je 2017. Glavno područje znanstvenog djelovanja su joj istraživanja glavnog sustava tkivne podudarnosti (HLA) kod čovjeka i njegova uloga u transplantaciji tkiva i organa, polimorfizam gena HLA te povezanosti sustava HLA s bolestima. Objavila je kao autorica ili koautorica 75 znanstvenih radova indeksiranih u CC časopisima, te je koautorica 5 sveučilišnih udžbenika. Aktivno je sudjelovala na 80 znanstvenih skupova (55 međunarodnih i 25 domaćih) te na njima održala preko 25 pozvanih predavanja. Sudjeluje od 2003. u provedbi dodiplomske nastave na Biološkom odsjeku PMF-u kao nositeljica izbornog kolegija "Transplantacijska imunologija". Na dodiplomskoj nastavi Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku kao nositeljica izbornog predmet: "Imunokompetentnost i transplantacija" sudjeluje od 2004. Sudjeluje i u poslijediplomskoj nastavi na Molekularnim bioznanostima Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku gdje je nositeljica izbornog predmeta: "Imunogenetika transplantacije". Navedene predmete uvela je na spomenute fakultete te je do sada ostvarila preko 1000 norma sati. Istovremeno je bila mentorica pri izradi 27 diplomskih radova, 3 magistarska rada kao i 5 doktorskih disertacija. Aktivno je sudjelovala na 13 znanstvenih projekata (5 međunarodnih i 8 domaćih) od toga je na jednom bila voditeljica, na 9 projekata bila je istraživačica, na 2 kao konzultantica, dok je na COST projektu (HLA-NET) bila istraživačica i predstavnica Republike Hrvatske. Članica je 9 stručnih međunarodnih i domaćih društava.

## ZAHVALE

Ovu stranicu iskoristit ću da zahvalim svima koji su svojom stručnošću, prijateljstvom, nesebičnošću i ljubavlju pomogli u izradi ovoga doktorskog rada...

Na prvome mjestu, zahvalnost za izradu ove disertacije dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić pod čijim je vodstvom ova disertacija izrađena. Hvala na iskazanom povjerenju, strpljenju i trudu koji je uložila u razvoj ove disertacije. Hvala na stručnim savjetima, uputama, ispravcima... Hvala na neograničenoj dostupnosti i razumijevanju za nepredviđene situacije.

Iskrenu zahvalnost dugujem i doc. dr. sc. Renati Žunec na nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade ovog rada, na uloženom trudu i vremenu, pažljivom čitanju teksta i svim korisnim savjetima.

Hvala vam objema što ste mi otvorile vrata i omogućile ulazak u čudesan svijet imunogenetike.

Veliko hvala dugujem svim svojim kolegicama i kolegama iz Odjela za tipizaciju tkiva pri KBC-u Zagreb, ponajprije za njihovo prijateljstvo i moralnu podršku. Hvala na svim podijeljenim iskustvima, razumijevanju i pruženoj pomoći uvijek kada je to bilo potrebno.

Naposljetku, hvala mojoj obitelji i prijateljima bez kojih bi ovaj rad bilo teško napisati i koji su zaslužni za sva moja postignuća. Mojim dragim roditeljima, sestri i braći hvala na bezuvjetnoj ljubavi, ponosu i uvijek neupitno pruženoj potpori te suprugu Kreši na golemoj ljubavi, podršci i strpljenju.

RAZNOLIKOST ALELA I HAPLOTIPOVA HLA U HRVATSKOJ I UTJECAJ NA  
ODABIR DAVATELJA U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Marija Maskalan

Istraživanja raspodjele alela i haplotipova glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. Human Leukocyte Antigen, HLA) provode se u svrhu populacijskih istraživanja kao i u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS) od HLA podudarnog nesrodnog davatelja. Ovim radom obuhvaćena je skupina od 10 000 zdravih nesrodnih dobrovoljnih davatelja iz Hrvatskog registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (HRDDKMS) te skupina od 261 nesrodnog bolesnika u programu nesrodne TKMS. Svim ispitanicima analizirani su geni HLA-A, -B, -C i -DRB1 jednom od molekularnih metoda. Obradom podataka o učestalosti alela i haplotipova HLA dobivene su vrijedne informacije o raznolikosti alela HLA te čestim, rijetkim i vrlo rijetkim alelima i haplotipovima HLA u Hrvatskoj. Rezultati rada ističu važnost održavanja manjih i srednjih registara dobrovoljnih davatelja KMS čime se doprinosi prepoznavanju raznolikosti alela i haplotipova HLA. Također, ističu ulogu HLA kao ograničavajućeg čimbenika u pronalaženju fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja te služe unaprijeđenju postupka pronalaska najboljeg mogućeg davatelja za pojedinog bolesnika.

(189 stranica, 83 slike, 33 tablice, 142 literaturna navoda, 6 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: HLA, aleli i haplotipovi HLA, transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Mentor: prof. dr. sc. Zorana Grubić

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Ana Galov  
doc. dr. sc. Renata Žunec  
prof. dr. sc. Rajko Kušec

HLA ALLELE AND HAPLOTYPE DIVERSITY IN CROATIA AND ITS IMPACT ON  
DONOR SELECTION IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Marija Maskalan

Investigation of allele and haplotype distribution of genes pertaining to Human Leukocyte Antigen complex (HLA) is relevant for population studies but also in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from HLA matched unrelated donor. This study encompassed 10 000 healthy unrelated volunteer donors from Croatian Bone Marrow Donor Registry (CBMDR) and 261 patients who underwent unrelated HSCT. All subjects were analyzed for HLA-A, -B, -C and -DRB1 genes by one of DNA analysis based methods. HLA allele and haplotype frequency analysis provided valuable information about HLA allelic polymorphism as well as data about common, rare and very rare HLA alleles and haplotypes in Croatia. Obtained results emphasize importance of maintaining small and medium size registries of HSC donors due to their contribution to HLA allele and haplotype diversity identification. Results also highlight the role of HLA as a limitation factor in identification of HLA phenotypically matched unrelated donor. Finally, data provided by this study will serve to improve the procedure of finding the best donor for a given patient.

(189 pages, 83 figures, 33 tables, 142 references, 6 supplement, original in Croatian)

Ključne riječi: HLA, HLA alleles and haplotypes, hematopoietic stem cell transplantation

Supervisor: Zorana Grubić, PhD, Professor

Reviewers: Ana Galov, PhD, Associate Professor  
Renata Žunec, PhD, Assistant Professor  
Rajko Kušec, PhD, Research Professor



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	5
2.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI .....	5
2.1.1. Organizacija regije HLA .....	6
2.1.2. Građa gena HLA .....	8
2.1.3. Obilježja sustava HLA .....	10
2.1.4. Nazivlje molekula HLA .....	13
2.1.5. Građa i funkcija molekula HLA.....	13
2.1.5.1. Molekule HLA razreda I .....	14
2.1.5.2. Molekule HLA razreda II .....	15
2.2. POPULACIJSKA ISTRAŽIVANJA SUSTAVA HLA.....	16
2.2.1. Populacijska istraživanja sustava HLA u Republici Hrvatskoj .....	20
2.3. ALOGENIČNA TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA. 22	
2.3.1. Imunološki procesi u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica .....	23
2.3.2. Izvori krvotvornih matičnih stanica u TKMS .....	29
2.3.3. Vrste davatelja krvotvornih matičnih stanica.....	31
2.3.4. Postupak transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	31
2.3.5. Postupak pronalaska podudarnog davatelja u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	33
2.4. REGISTRI DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA.....	36
3. MATERIJALI I METODE .....	39
3.1. ISPITANICI .....	39
3.1.1. Nesrodni dobrovoljni davatelji iz Hrvatskog registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica .....	39
3.1.2. Parovi primatelj-nesrodni davatelj u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	39
3.2. METODE .....	40
3.2.1. Izolacija DNA .....	40
3.2.1.1. Izolacija DNA korištenjem kolumni sa silikatnom membranom.....	40
3.2.1.2. Izolacija DNA korištenjem uređaja za automatsku izolaciju .....	41
3.2.2. Određivanje genskih skupina i alela HLA .....	42
3.2.2.1. Metoda lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima sa sekvencama specifičnim za genske skupine HLA .....	42
3.2.2.2. Metoda lančane reakcije polimerazom i početnicama sa sekvencama specifičnim za alele HLA.....	46
3.2.2.3. Metoda sekvenciranja po Sangeru.....	48

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	50
4. REZULTATI.....	52
4.1. RAZNOVRSNOST I RASPODJELA GENSKIH SKUPINA, ALELA I HAPLOTIPOVA HLA U HRVATSKOJ POPULACIJI .....	52
4.1.1. Raspodjela genskih skupina HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	52
4.1.2. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji .....	54
4.1.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji.....	60
4.1.4. Raspodjela haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji .....	62
4.1.4.1. Raspodjela haplotipova HLA-B*35~C u hrvatskoj populaciji .....	64
4.1.4.2. Raspodjela haplotipova HLA-B*51~C u hrvatskoj populaciji .....	69
4.1.4.3. Raspodjela haplotipova HLA-B*44~C u hrvatskoj populaciji .....	70
4.1.4.4. Raspodjela haplotipova HLA-B*18~C u hrvatskoj populaciji .....	74
4.1.4.5. Raspodjela haplotipova HLA-B*08~C u hrvatskoj populaciji .....	75
4.1.4.6. Raspodjela haplotipova HLA-B*07~C u hrvatskoj populaciji .....	76
4.1.4.7. Raspodjela haplotipova HLA-B*27~C u hrvatskoj populaciji .....	78
4.1.4.8. Raspodjela haplotipova HLA-B*15~C u hrvatskoj populaciji .....	80
4.1.4.9. Raspodjela haplotipova HLA-B*38~C u hrvatskoj populaciji .....	84
4.1.4.10. Raspodjela haplotipova HLA-B*40~C u hrvatskoj populaciji .....	84
4.1.4.11. Raspodjela haplotipova HLA-B*13~C u hrvatskoj populaciji .....	86
4.1.4.12. Raspodjela haplotipova HLA-B*39~C u hrvatskoj populaciji .....	87
4.1.5. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji .....	90
4.1.5.1. Raspodjela haplotipova HLA-B*35~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	92
4.1.5.2. Raspodjela haplotipova HLA-B*44~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	95
4.1.5.3. Raspodjela haplotipova HLA-B*27~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	98
4.1.5.4. Raspodjela haplotipova HLA-B*15~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	100
4.1.5.5. Raspodjela haplotipova HLA-B*40~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	102
4.1.5.6. Raspodjela haplotipova HLA-B*39~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	104
4.1.6. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji .....	105
4.1.7. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji .....	105
4.1.8. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji.....	108
4.2. RAZNOVRSNOST I UČESTALOST ALELA I HAPLOTIPOVA HLA U PROGRAMU TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA S NESRODNIM DAVATELJEM.....	113
4.2.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	114
4.2.2. Učestalost haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u skupini bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	116
4.2.3. Analiza podudarnosti alela HLA bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica .....	119

4.2.4. Analiza haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 kod bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	122
5. RASPRAVA.....	124
6. ZAKLJUČAK .....	147
7. POPIS LITERATURE .....	149
8. ŽIVOTOPIS .....	163
9. PRILOZI.....	166

## **1. UVOD**

Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) jedan je od standardnih terapijskih postupaka u liječenju leukemija, limfoma i ostalih bolesti krvotvornog sustava, a u posljednje vrijeme i u liječenju autoimunih bolesti, nasljednih metaboličkih deficijencija i drugih oboljenja [1]. Ishod TKMS ovisi o nizu različitih genetičkih i kliničkih čimbenika. Najvažniji genetički čimbenik je stupanj podudarnosti HLA primatelja i davatelja. Poznato je da već razlika u samo jednom alelu HLA i to na razini jedne aminokiseline može pokrenuti aloreaktivnu reakciju limfocita T i odbacivanje transplantata [2]. Stoga je izraziti polimorfizam gena HLA, s više od 20 000 alela HLA razreda I (HLA-A, -B, -C) i razreda II (HLA-DRB1 i -DQB1), (prosinac, 2019.) glavna prepreka uspješnom pronalasku fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja KMS [3].

Pronalaženje odgovarajućeg davatelja olakšano je uključivanjem sve većeg broja nacionalnih registara u svjetski registar dobrovoljnih davatelja KMS (engl. World Marrow Donors Association, WMDA) koji u svojoj bazi ima preko 33 milijuna HLA tipiziranih davatelja iz 78 registara, iz 53 zemlje (prosinac, 2019.godina) [4]. Dio WMDA-a je i Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja KMS (RDDKMS) s preko 50 000 HLA tipiziranih nesrodnih dobrovoljnih davatelja što značajno povećava vjerojatnost bolesnicima za pronalazak odgovarajućeg davatelja. Ovako velik broj HLA tipiziranih davatelja, uz istovremenu spoznaju o važnosti podudarnosti HLA za uspjeh TKMS, potaknuo je brojna populacijska istraživanja određivanja raznolikosti HLA kako bi se stvorila što preciznija baza podataka o raznovrsnosti alela i haplotipova HLA unutar pojedine populacije, utvrdile razlike, odnosno sličnosti među populacijama. Istovremeno, pokazano je i da vjerojatnost pronalaska nesrodnog davatelja ne ovisi samo o broju potencijalnih davatelja u nacionalnom, odnosno svjetskom registru, već i o alelima HLA samog bolesnika [5].

Današnje metode molekularne biologije omogućavaju kako rutinsko određivanje polimorfizama na razini genskih skupina (tipizacija niskog razlučivanja, HLA-A\*02) tako i na razini alela pojedinih gena (tipizacija visokog razlučivanja, HLA-A\*02:01, A\*02:02). Analize dobivenih rezultata uključuju određivanje učestalosti pojedinih genskih skupina/alela HLA u ispitanika, ali i učestalosti haplotipova HLA i fenotipova HLA uzimajući u obzir različite kombinacije alela na istraživanim lokusima (npr. haplotipovi HLA-A~B, HLA-B~C, HLA-A~B~DRB1, itd.). Rezultati populacijskih istraživanja pokazuju različitosti u raspodjeli alela HLA u svijetu, tako da su neki od njih prisutni u većini populacija s velikom učestalošću (npr. alel HLA-A\*02:01), nekima se učestalost razlikuje ovisno o ispitivanoj populaciji (npr. alel DRB1\*09:01 je rijedak u europskim populacijama, a čest u populacijama azijskog porijekla), a neki su aleli HLA zastupljeni s vrlo malom učestalošću u malom broju populacija (npr. alel

HLA-B\*48:01). Nadalje, pokazane su i različitosti u raspodjeli alela HLA pojedine genske skupine HLA. Tako je za gensku skupinu HLA-A\*02 raspodjela dva najčešća alela izrazito različita; HLA-A\*02:01 prisutan je s učestalošću od  $\approx 30\%$ , a HLA-A\*02:05 s učestalošću od  $\approx 3\%$  [6]. Populacijska istraživanja raznolikosti haplotipova HLA, koja mogu obuhvaćati analizu alela samo dva lokusa, ali i višelokusne analize, također su pokazala veliku raznolikost kako među ispitanicima iste populacije tako i između različitih populacija. Tako je npr. haplotip HLA-A\*01~B\*08~DRB1\*03 jedan od triju najčešćih haplotipova svih istraživanih europskih populacija, ali ne i u populacijama Afrike i Azije [7]. Za većinu populacija karakterističan je izrazito velik broj haplotipova HLA, izuzetak mogu biti izolirane ili zatvorene populacije kod kojih broj različitih alela HLA prisutnih unutar populacije može biti manji, a time je i raznovrsnost haplotipova HLA manja. Također, brojnost haplotipova raste što se u analize uključuje veći broj lokusa HLA.

Jedan od najvećih izazova populacijskih istraživanja predstavlja neprestano otkrivanje novih alela HLA (~2000 godišnje) što dovodi do potrebe za nadopunjavanjem i proširivanjem već obrađenih populacija. Populacijska istraživanja omogućila su stvaranje baza podataka koje daju informaciju o vrlo čestim, čestim, rijetkim i vrlo rijetkim alelima te dva-, tri- i više-lokusnim haplotipovima HLA u pojedinim populacijama. Međutim, treba istaknuti da za brojne populacije u svijetu nema populacijskih podataka, a za neke su dostupni podatci manjkavi [7]. Prva istraživanja u Hrvatskoj o polimorfizmu gena HLA molekularnim metodama počela su 1995. g. na skupini od 141 nesrodnih ispitanika tipiziranih za alele lokusa HLA razreda II (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 i -DPB1) [8]. Nekoliko godina kasnije, u obiteljskom istraživanju (N=105) su po prvi put iznijete učestalosti genskih skupina i haplotipova HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 i -DQB1 [9]. Kasnija istraživanja analizirala su učestalosti genskih skupina i alela HLA-A, -B i -DRB1, a provedena su i istraživanja raspodjele alela genskih skupina B\*27, DRB1\*04 i B\*35 [10-12]. Međutim, navedena istraživanja nisu uključivala alele lokusa HLA -C, kao ni određivanje vrlo čestih, čestih, odnosno rijetkih i vrlo rijetkih haplotipova HLA za našu populaciju.

Osim u antropološkim istraživanjima, baze podataka o polimorfizmu alela i haplotipova HLA u svijetu, od neprocjenjivog su značaja u praćenju međusobnog miješanja susjednih populacija kao i njihovih migracija, ali i u strategiji odabira nesrodnog davatelja KMS. Naime, mnogi transplantacijski centri postupak pretraživanja temelje na učestalosti alela i haplotipova HLA kako bi se brže odlučilo o odabiru davatelja s određenom nepodudarnošću HLA ili o transplantaciji s drugim izvorom KMS (npr. umbilikalna krv ili HLA haploidentični davatelj) ili pak o odustajanju od liječenja TKMS. Uspjeh TKMS najbolji je ako se odabire nesrodni

davatelj podudaran za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 na razini alela HLA (tzv. podudarnost 10/10), a takav odabir zlatni je standard u velikom broju transplantacijskih centara u svijetu, kao i u KBC Zagreb koji jedini u našoj zemlji provodi TKMS s nesrodnog davatelja [13]. U nekim slučajevima traženje fenotipski podudarnog HLA davatelja 10/10 ili 12/12 (ako se uključe i aleli lokusa HLA-DPB1) dovodi do značajnog produljenja vremena traženja idealnog davatelja, osobito za one bolesnike koji imaju rijetke, odnosno vrlo rijetke alele i haplotipove HLA [14]. Nasuprot tome, bolesnici koji imaju jedan ili oba česta haplotipa HLA imaju najveću vjerojatnost pronalaska HLA potpuno podudarnog nesrodnog davatelja [15]. Treba istaknuti da se podudarnosti za alele HLA-C dugo vremena nije pripisivao velik značaj. Međutim, otkrićem važnosti molekula HLA-C u suradnji s prirodno-ubilačkim stanicama (engl. Natural Killer, NK) i podudarnost HLA-C postala je obavezan dio algoritma odabira nesrodnog davatelja [16].

Veliku ulogu u pronalasku i broju potencijalnih HLA podudarnih nesrodnih davatelja ima i neravnoteža udruživanja (*engl.* Linkage Disequilibrium, LD) između pojedinih alela lokusa HLA kao jedno od najvažnijih obilježja sustava HLA. Pojam LD podrazumijeva da se aleli pojedinih lokusa HLA nasljeđuju zajedno u haplotipu HLA češće od očekivanog s obzirom na njihove pojedinačne učestalosti. Vrijednost LD-a je veća što su lokusi HLA bliže smješteni na kromosomu 6 gdje se cijela regija HLA i nalazi [17, 18]. Snažan LD postoji između alela lokusa HLA-B i -C te alela lokusa HLA-DRB1 i -DQB1. Stoga, prisutnost jedne ili više neuobičajenih kombinacija alela HLA ovih lokusa smanjuje vjerojatnost pronalaska HLA podudarnog davatelja te je odabir davatelja s nepodudarnošću na lokusu HLA-C ili -DQB1 često jedina opcija za takve bolesnike [19, 20].

S obzirom da je i vrijeme važan ograničavajući čimbenik u traženju HLA podudarnog nesrodnog davatelja, neophodno je uspostaviti što točniji proračun vjerojatnosti pronalaženja takvog davatelja za pojedinog bolesnika kako bi se vrijeme pretraživanja svelo na minimum [21]. Upravo populacijska istraživanja, uz doprinos znanju o genskoj raznolikosti alela HLA i haplotipova HLA, pružaju osnovu koja omogućava brži i uspješniji postupak odabira najboljeg mogućeg davatelja za svakog pojedinog bolesnika.

## **HIPOTEZA**

Prisutnost čestih alela i haplotipova HLA, kao i konzerviranih haplotipova HLA, utječe na vjerojatnost i brzinu pronalaska HLA 10/10 podudarnog nesrodnog davatelja KMS stoga je nužno poznavati raspodjelu alela/haplotipova HLA u populaciji.

## **CILJEVI**

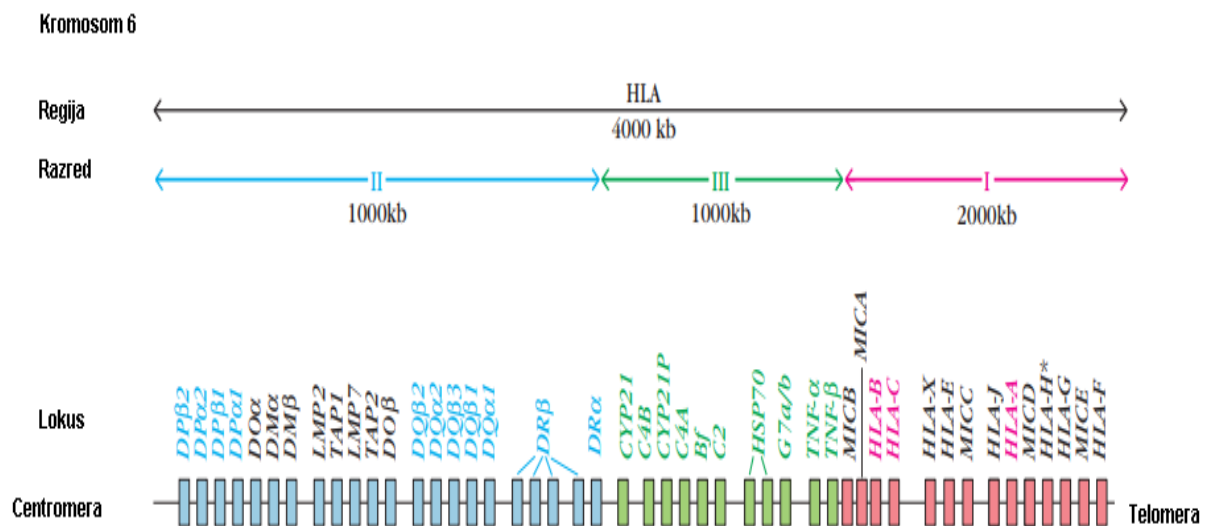
1. Ispitati učestalost alela i haplotipova HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini od 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a.
2. Utvrditi vrlo česte, česte, rijetke i vrlo rijetke alele i haplotipove HLA razreda I i II te otkriti nove alele HLA.
3. U skupini od 261 bolesnika odrediti čimbenike HLA koji su bili razlog nepronalaženja fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja.
4. Stvoriti bazu alela i haplotipova HLA u Hrvatskoj koja će služiti kao osnova procjene vjerojatnosti pronalaženja nesrodnog davatelja u programu TKMS.



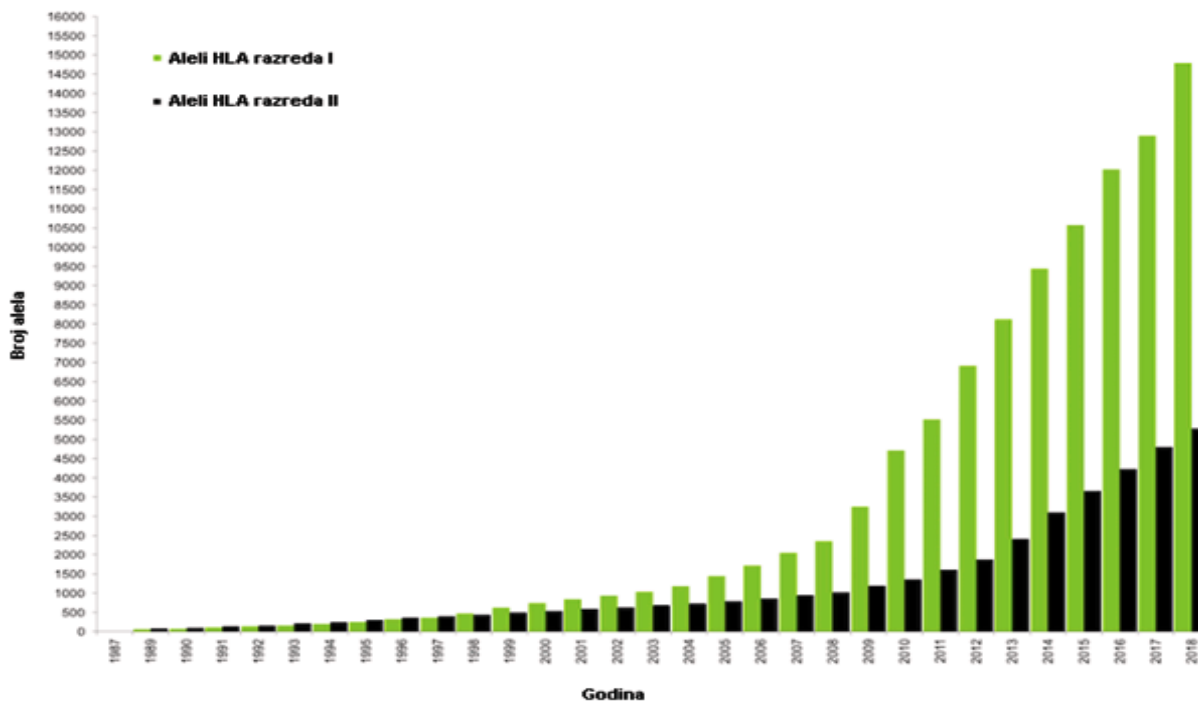
## **2. LITERATURNI PREGLED**

## 2.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex - MHC) kod ljudi nalaze se na kratkom kraku kromosoma 6 u regiji 6p21.3 (slika 1) [22]. Više od 20 000 dosad otkrivenih alela tog sustava (slika 2) obuhvaća kromosomsku regiju od približno 4000 kilobaza [3]. Ta je regija najistraživaniji dio ljudskog genoma zbog činjenice da se unutar nje nalaze geni za ljudske leukocitne antigene, HLA (engl. Human Leukocyte Antigens) koji imaju važnu ulogu u transplantaciji tkiva i organa, a također su povezani i s nastankom mnogih bolesti autoimune prirode. Ključna funkcija gena HLA očituje se, kako u imunološkoj reakciji tako i u transplantaciji, kroz funkciju njihovih najvažnijih produkata – molekula HLA. One su glavni dio antigen-predočnog sustava na površini stanica, predočuju vlastite i strane peptidne dijelove pomagačkim CD4<sup>+</sup> i citotoksičnim CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Upravo razlikovanje vlastitih od stranih peptida, koji se predočuju u sklopu molekula HLA, ključan je čimbenik u ishodu transplantacije tkiva i organa [2].



Slika 1. Mapa sustava HLA na kratkom kraku kromosoma 6. Klasični geni HLA razreda I – crvena boja; klasični geni HLA razreda II – plava boja; geni HLA razreda III – zelena boja; neklasični geni HLA razreda I i razreda II – crna boja

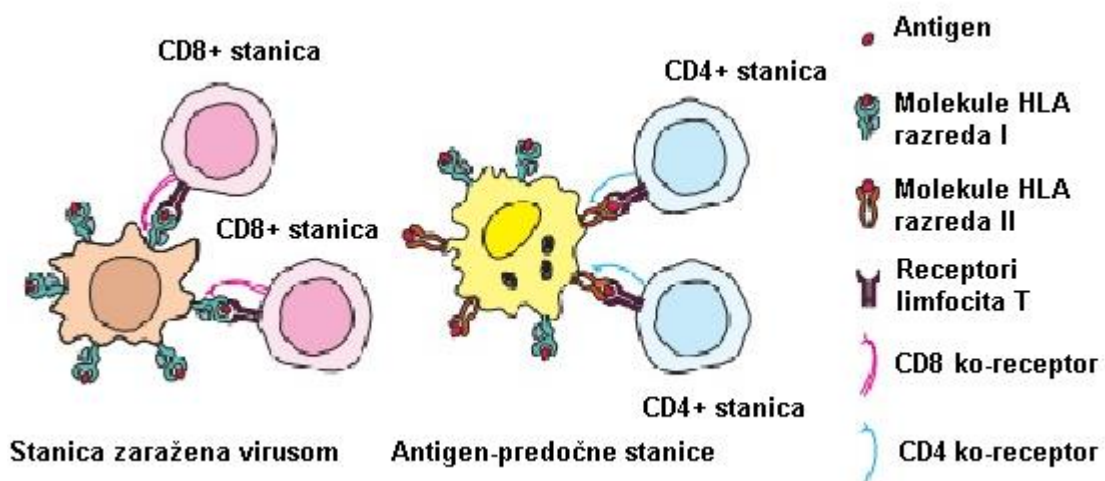


Slika 2. Broj poznatih alela HLA razreda I i razreda II od 1987. do 2018. godine [3]

### 2.1.1. Organizacija regije HLA

Regija HLA dijeli se u 3 genske regije (regija HLA razreda I, regija HLA razreda II i regija HLA razreda III). Regija HLA razreda I smještena je telomerno i sastoji se od dvije skupine gena – klasičnih i neklasičnih. Skupinu klasičnih gena HLA razreda I čine geni HLA -A, -B i -C, čiji su produkti - molekule HLA razreda I, izraženi na gotovo svim stanicama s jezgrom u tijelu, s rijetkim iznimkama. Geni HLA-E, -F i -G dio su skupine neklasičnih gena HLA razreda I koji se od klasičnih razlikuju zbog znatno manjeg polimorfizma, ograničene tkivne rasprostranjenosti njihovih molekula kao i specifične funkcije [23]. Geni HLA-E imaju najmanji polimorfizam unutar neklasičnih gena HLA razreda I, samo 27 do sada poznatih alela i rasprostranjenost molekula na površini gotovo svih tkiva. Za razliku od njih geni HLA-F imaju nešto veći broj do sada otkrivenih alela (N=38), ali je ekspresija njihovih molekula usko ograničena na tkiva kao što su koža, jetra, slezena i mjehur. Geni HLA-G pokazuju najveći polimorfizam među neklasičnim genima HLA razreda I (N=61) te najspecifičniju tkivnu ekspresiju molekula koja je ograničena većinom na stanice trofoblasta [3, 24]. U regiji HLA razreda I nalazi se i porodica gena MIC (engl. *MHC class I-related chain*) te neki pseudogeni koje dio autora izdvaja kao zasebnu podskupinu gena HLA razreda I [2]. Regija HLA razreda II smještena je bliže centromeri i podijeljena je u 6 genskih podregija: HLA-DM, -DN, -DO,

-DP, -DQ i -DR. Klasični geni HLA razreda II su HLA-DP, -DQ i -DR koji kodiraju molekule HLA razreda II prisutne na membrani specijaliziranih antigen-predočnih stanica (makrofagi, dendritičke stanice, limfociti B), ali i na pojedinim stanicama koje imaju takvu funkciju povremeno, poput nekih endotelnih stanica. Preostale tri podregije čine skupinu neklasičnih gena HLA razreda II (HLA-DM, -DN i -DO) koji kodiraju molekule koje su prisutne uglavnom u citoplazmi stanica, ali ne i na njihovoj površini i posredno su uključene u proces funkcionalnog vezanja peptidnih ulomaka s drugim molekulama HLA razreda II. Ovakva izraženost molekula HLA povezana je s ulogama stanica T koje su povezane s molekulama HLA razreda I ili razreda II. Tako će citotoksični CD8+ limfociti T povezani s molekulama HLA razreda I uništavati stanice zaražene unutarstaničnim mikroorganizmima, ali i tumorske stanice koje izražavaju tumorske antigene dok će pomagački CD4+ limfociti T, povezani s molekulama HLA razreda II prepoznavati antigene na ograničenom broju stanica i predočavati peptide koji su nastali od izvanstaničnih mikroorganizama (slika 3) [2].



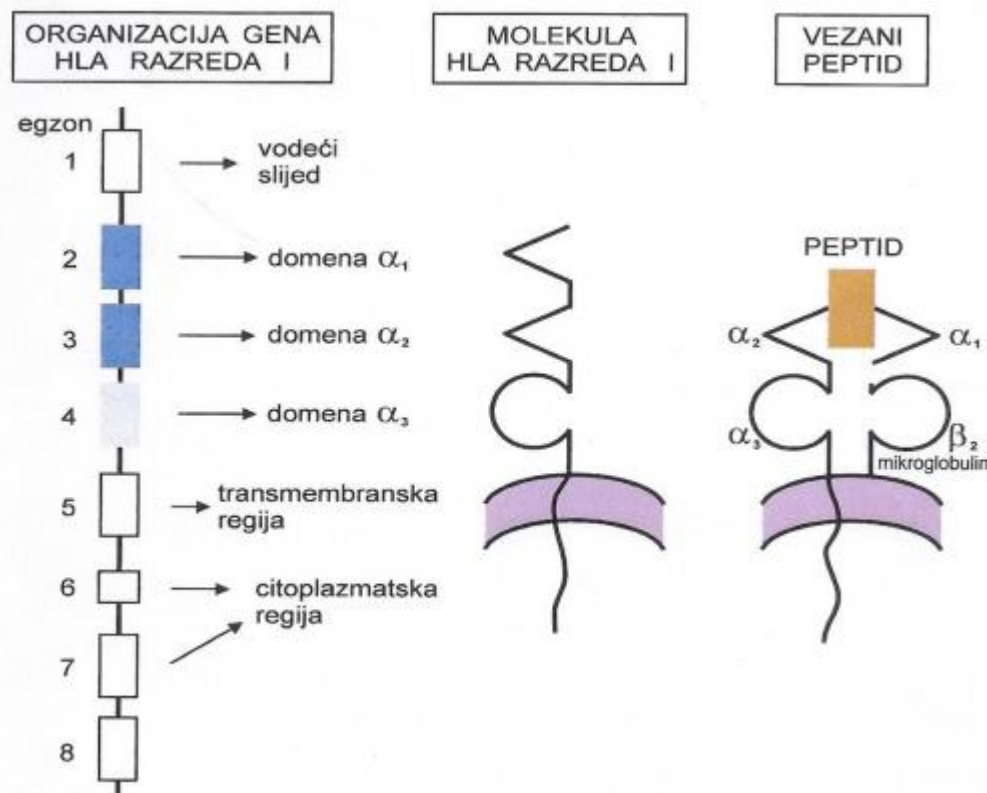
Slika 3. Shematski prikaz uloge molekula HLA u prepoznavanju antigena pomoću limfocita T

Unutar regije HLA razreda II nalaze se i geni koji su ključni za konačni ustroj molekula HLA razreda I poput TAP1 i TAP2 (engl. Transporters Associated with antigen Processing) proteinskih pumpi za prijenos antigenskih dijelova iz citosola u endoplazmatski retikulum, kao i skupina gena za enzimske dijelove proteasoma koji cijepa velike proteinske antigene na manje peptidne dijelove [25]. Unutar regije HLA razreda III (tzv. centralna regija), koja je smještena između regije HLA razreda I i II, nalaze se geni čiji produkti nisu direktno uključeni u procese imunološkog prepoznavanja i aktivacije stanica specifične imunosti, ali su važni jer posredno sudjeluju u imunološkoj reakciji. Geni unutar regije HLA razreda III kodiraju neke od komponenti komplementa (C2, C4A, C4B), proteine toplinskog šoka (engl. Heat Shock

Proteins - HSP), enzim 21-hidroksilazu te neke važne citokine poput TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  (engl. Tumor Necrosis Factors) [25]. Treba istaknuti da unutar ove regije nema niti jednog gena HLA.

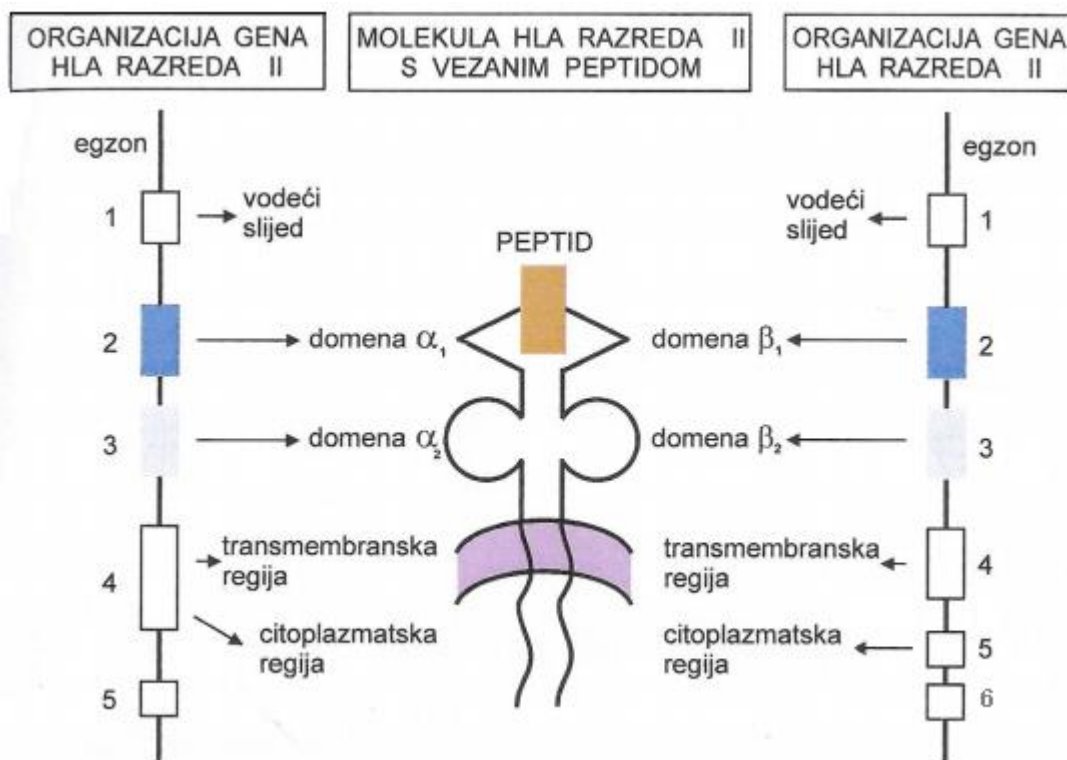
### 2.1.2. Građa gena HLA

Geni HLA razreda I sastoje se od 8 egzona koji kodiraju teški lanac molekula HLA razreda I (slika 4). Egzon 1 kodira vodeći peptid, egzon 2 kodira domenu  $\alpha_1$ , egzon 3 kodira domenu  $\alpha_2$ , a egzon 4 kodira domenu  $\alpha_3$  koja se nalazi u izvanstaničnom prostoru. Egzon 5 kodira transmembransku regiju, a egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku regiju. Završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj kodira egzon 8. Najpolimorfniji dio molekule HLA razreda I kodiraju egzoni 2 i 3. Egzoni gena HLA razreda I sastoje se od 1089-1101 nukleotida, a teški lanci sastavljeni su od 362-366 aminokiselina.



Slika 4. Shematski prikaz organizacije egzona gena HLA razreda I i molekule HLA razreda I

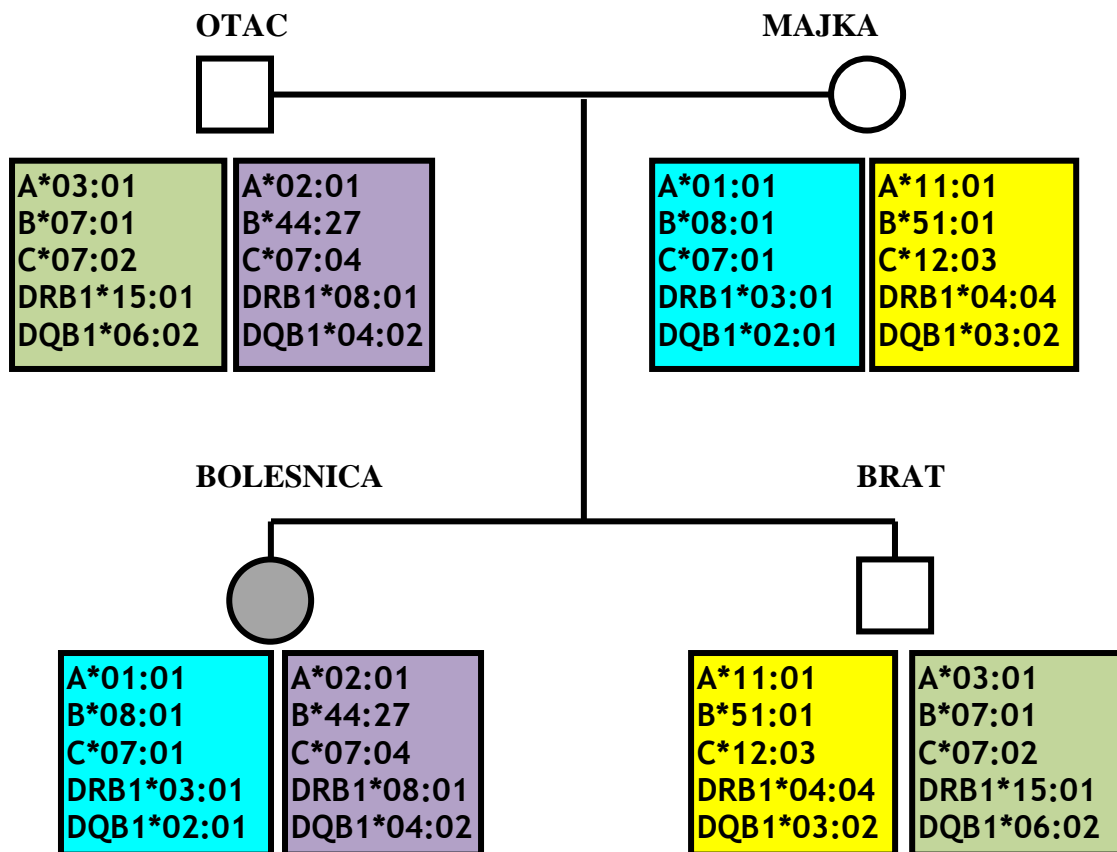
Geni HLA razreda II građeni su od 5 egzona odgovornih za kodiranje lanca  $\alpha$  i 6 egzona za kodiranje lanca  $\beta$  (slika 5). U lancu  $\alpha$ , egzon 1 kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 odgovoran je za domenu  $\alpha_1$ , egzon 3 za domenu  $\alpha_2$ , egzon 4 za transmembranski i citoplazmatski dio, a egzon 5 kodira 3' netranslatirajuće regije lanca  $\alpha$ . U lancu  $\beta$ , egzon 1 kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 kodira domenu  $\beta_1$ , egzon 3 domenu  $\beta_2$ , egzon 4 transmembranski dio, egzon 5 citoplazmatski dio, dok je egzon 6 odgovoran za kodiranje 3' netranslatirajuće regije lanca  $\beta$  [2].



Slika 5. Shematski prikaz organizacije egzona gena HLA razreda II i molekule HLA razreda II

### 2.1.3. Obilježja sustava HLA

Nekoliko je osnovnih obilježja koja sustav HLA čine specifičnim i razlikuju ga od bilo kojeg drugog genskog sustava u čovjeka. Prvo obilježje vezano je uz nasljeđivanje gena HLA koje prati Mendelove zakone nasljeđivanja, odnosno segregacije (slika 6). Nasljeđivanje kombinacije alela HLA na jednom kromosomu čini haplotip. Po jedan haplotip HLA nasljeđuje se od svakog roditelja pri čemu se oba izražavaju kodominantno na staničnoj membrani, što je posljedica kodominacije na razini gena [26].



Slika 6. Primjer nasljeđivanja alela/haplotipova HLA unutar obitelji

Sljedeća osobitost sustava HLA odnosi se na mogućnost rekombinacije gena HLA i stvaranja novih haplotipova HLA. Riječ je o procesu križnog spajanja (engl. crossing over, c.o.). Genetička zakonitost koja određuje učestalost rekombinacija temelji se na međusobnoj udaljenosti pojedinih gena. Naime, vjerojatnost c.o.-a je veća što su geni međusobno udaljeniji i obrnuto. Ista zakonitost uočena je i unutar regije HLA gdje vjerojatnost c.o.-a ovisi o međusobnoj udaljenosti gena HLA. Primjerice, rekombinacija je vrlo mala između gena HLA

-DQB1 i -DQA1, a povećava se između udaljenijih gena, npr. HLA-B i -DRB1 te gena HLA -DPB1 u odnosu na ostale gene HLA razreda II [27]. U načelu, stopa rekombinacije između gena HLA iznosi oko 1%, dakle vrlo je mala i ne pridonosi (barem ne u značajnijoj mjeri) genskoj varijabilnosti ovog sustava [28].

Možda najznačajnije obilježje sustava HLA, koje se snažno odražava na ulogu molekula HLA u imunološkoj reakciji, a izuzetno je važno u postupku transplantacije tkiva i organa, svakako je velika genska raznolikost (tablica 1). Naime, sustav HLA najpolimorfiji je genski sustav kod čovjeka što je posljedica nekoliko genetskih mehanizama koji uključuju gensku konverziju, točkaste mutacije i već spomenutu rekombinaciju [2].

Tablica 1. Broj poznatih alela najpolimorfnijih gena HLA (baza IPD-IMGT/HLA, verzija 3.34; listopad, 2019. godine) [3]

<b>LOKUS</b>	<b>BROJ ALELA</b>
HLA-A	5907
HLA-B	7126
HLA-C	5709
HLA-DRB1	3331
HLA-DQA1	229
HLA-DQB1	1795
HLA-DPA1	168
HLA-DPB1	1537
<b>Ukupno</b>	<b>25802</b>

Značajno veću raznolikost pokazuju geni HLA razreda I u usporedbi s genima HLA razreda II, s najpolimorfijim genom HLA-B (tablica 1). Razlike među alelima HLA razreda I većinom su smještene u egzonima koji kodiraju  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  podjedinice  $\alpha$ -lanca molekule HLA razreda I (egzoni 2 i 3) i u egzonu koji kodira  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  podjedinice molekule HLA razreda II (egzon 2). Spomenute podjedinice formiraju pukotine molekula HLA unutar kojih se vežu prerađeni peptidni dijelovi [25]. Potrebno je naglasiti da se svakim danom otkrivaju novi aleli HLA te da je njihov broj daleko od konačnog. Kao što se može vidjeti u bazi podataka IPD-IMGT/HLA u posljednje dvije godine, broj novootkrivenih alela HLA povećao se za više od 4500, čemu dodatno pridonosi razvoj novih metoda određivanja alela HLA (slika 2) [3].

Osim polimorfizma, poligenija je još jedno obilježje koje dovodi do razlike među jedinkama. To se svojstvo odnosi na činjenicu da se unutar jednog haplotipa HLA nalazi više gena HLA slične strukture i funkcije što osigurava (uz velik polimorfizam) veći broj različitih kombinacija molekula HLA unutar jedinke, a time i veću mogućnost predočavanja deset



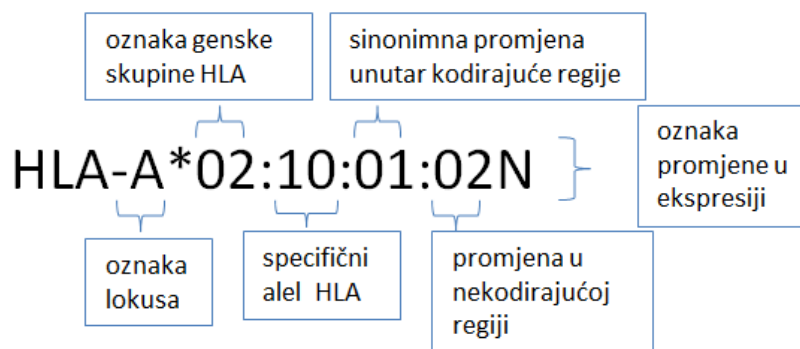
različitih antigena izvršnim stanicama imunološkog sustava. Rezultat je to prirodne selekcije, čemu u prilog govori činjenica o niskom postotku homozigotnih osoba (<10%) za alele HLA što ukazuje da postoji selektivna prednost heterozigotnih osoba. Ovo se obilježje, kao i velik polimorfizam, smatra evolucijskom prilagodbom koja osigurava uspješniju borbu protiv mikroorganizama s velikim brojem različitih antigena [29].

S obzirom na velik broj do sada poznatih alela HLA u svijetu i veći broj gena HLA koji čine jedan fenotip, potencijalan broj mogućih fenotipova HLA, ako se uzmu u obzir aleli na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1, veći je od  $10^{13}$ . Međutim, stvaran broj fenotipova HLA, kako u svijetu tako i unutar pojedine populacije, znatno je manji, prvenstveno zbog neravnoteže udruživanja (engl. linkage disequilibrium, LD) [17]. Riječ je o fenomenu učestalijeg povezivanja pojedinih alela HLA u specifične kombinacije, odnosno češće pojave pojedinih alela HLA u zajedničkom haplotipu HLA, nego što je to za očekivati na temelju pojedinačnih učestalosti tih alela. Nekoliko je mogućih objašnjenja ovog fenomena poput djelovanja selekcijskih sila ili genetički uvjetovanih mehanizama koji potiču specifična udruživanja alela HLA u zajednički haplotip HLA, a koji su rezultat male udaljenosti među pojedinim genima HLA. Međutim, niti jedno od objašnjenja do sada nije dalo potpuni odgovor [30]. Najsnažnija neravnoteža udruživanja uočena je između bliskih lokusa HLA (npr. HLA-B~C, HLA-DRB1~DQB1 ili HLA-DQA1~DQB1).

Međutim, postoje i cijeli haplotipovi koji pokazuju jaku neravnotežu udruživanja. Jedan od najboljih primjera za LD je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~DRB1\*03:01 odnosno, haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01, s vrlo visokom učestalošću u brojnim populacijama europskog porijekla i sa snažnim LD-om [6].

#### 2.1.4. Nazivlje molekula HLA

Suvremeno označavanje alela HLA temelji se na oznaci samog sustava HLA iza čega slijedi oznaka lokusa te znak „\*“ koji označava molekularnu tipizaciju HLA. Prva dva broja iza znaka „\*“ čine prvo polje i određuju gensku skupinu HLA, a treća i četvrta brojka čine drugo polje i označavaju alel HLA. Peta i šesta brojka čine treće polje i označavaju sinonimne mutacije unutar kodirajuće regije gena, dok se u sedmoj i osmoj brojci (četvrto polje) razlikuju mutacije izvan kodirajuće regije. Polja se međusobno razdvajaju korištenjem interpunkcijskog znaka dvotočka ( : ). Slova **L** – niska/slaba ekspresija (engl. low), **N** – bez ekspresije (engl. null), **Q** – upitna ekspresija (engl. questionable), **S** – topivi protein (engl. soluble) i **C** – prisutan u citoplazmi (engl. cytoplasm) predstavljaju oznake za određivanje razine ekspresije ili drugih ne-genomskih podataka koji su poznati o nekom alelu. Dakle, potpuni opis alela može biti dug i do 9 znakova, ne uključujući HLA-prefiks i oznaku lokusa (slika 7).



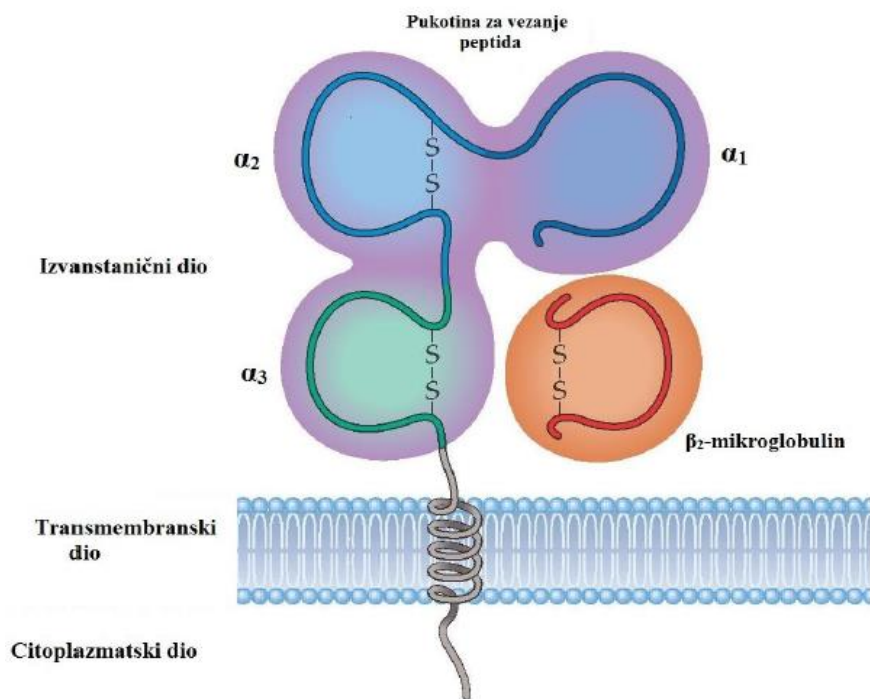
Slika 7. Primjer označavanja alela HLA

#### 2.1.5. Građa i funkcija molekula HLA

Osnovne razlike između molekula HLA razreda I i razreda II sadržane su u tipu antigena kojeg predočuju, tipu stanica kojima predočuju antigen i njihovoj tkivnoj zastupljenosti [31].

### 2.1.5.1. Molekule HLA razreda I

Molekule HLA razreda I građene su od dva polipeptidna lanca od kojih je teži  $\alpha$ -lanac kodiran genima HLA razreda I (HLA-A, -B, -C), a drugi lakši lanac, tzv.  $\beta_2$ -mikroglobulin kodiran je genom na kromosomu 15.



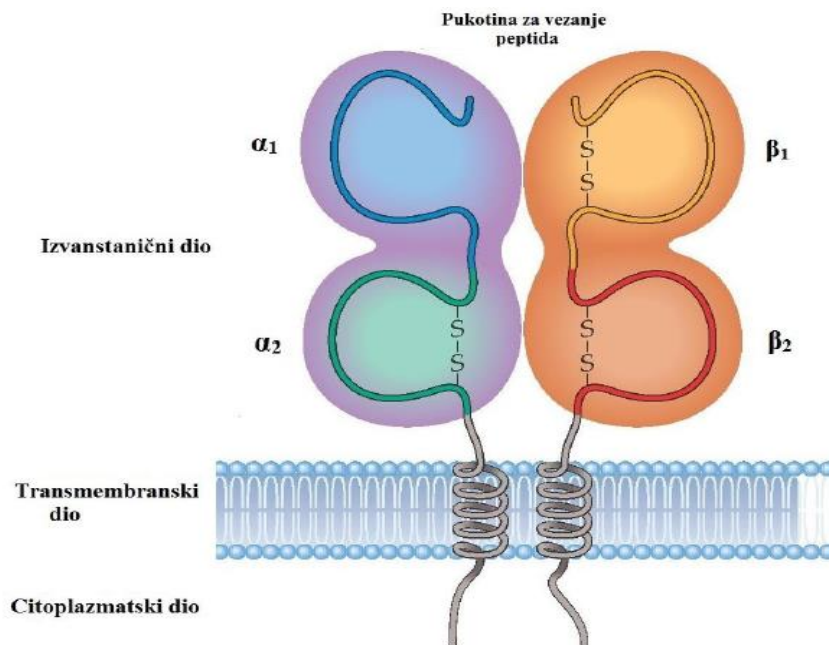
Slika 8. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I

Molekula HLA razreda I građena je od četiriju osnovnih dijelova: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu te transmembranski i citoplazmatski dio (slika 8). Stabilnu strukturu na membrani stanice molekula HLA razreda I ima u obliku heterotrimer sastavljenog od dva spomenuta lanca i vezanog peptidnog ulomka. Molekule HLA razreda I u pukotinu mogu vezati peptide veličine 8-11 aminokiselina. Pukotina je najvažniji dio molekule izgrađena od 180 aminokiselina stereokemijski podijeljenih u dva dijela:  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ . Upravo je polimorfizam gena HLA, odnosno brojni aleli, odgovoran za različitost stereokemijske površine vezne pukotine, čime se osigurava vezanje velikog broja peptida. Dio oko pukotine, zajedno sa stranim antigenom, prepoznaje receptor T-limfocita. Treći dio  $\alpha$ -lanca visoko je očuvan i služi kao vezno mjesto za molekulu CD8+ citotoksičnih limfocita T. Iz navedenog je jasno da molekule HLA razreda I predočuju antigene CD8+ citotoksičnim limfocitima T i to mehanizmom tzv. spregnutog prepoznavanja gdje se receptori limfocita T moraju određenim afinitetom vezati kako za peptid, tako i za dijelove molekule HLA. Klasične molekule HLA

razreda I nalaze se na gotovo svim stanicama s jezgrom i predočuju prerađene citosolne ili endogene antigene poput virusnih peptida, peptidnih dijelova drugih unutarstaničnih patogena, razgradnih dijelova mutiranih tumorskih proteina i sl. [2].

### 2.1.5.2. Molekule HLA razreda II

Molekule HLA razreda II građene su od dva polipeptidna lanca  $\alpha$  i  $\beta$  od kojih su oba kodirana genima HLA. Teži  $\alpha$ -lanac kodiraju geni A HLA razreda II (npr.  $\alpha$ -lanac molekule HLA-DP kodira gen DPA1), dok lakši  $\beta$ -lanac kodiraju geni B (npr.  $\beta$ -lanac molekule HLA-DP kodira gen HLA-DPB1). Polimorfizmu molekula HLA razreda II znatno više pridonose geni koji kodiraju  $\beta$ -lanac zbog većeg broja alela. Molekule ovog razreda također se sastoje od četiriju osnovnih dijelova: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu te transmembranski i citoplazmatski dio (slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda II

Kao i u slučaju molekula HLA razreda I, molekule HLA razreda II stabilnu strukturu na membrani stanice imaju u obliku heterotrimeru sastavljenog od dva spomenuta lanca i vezanog peptidnog ulomka. Veznu pukotinu čine dijelovi lanaca  $\alpha_1$  i  $\beta_1$ , s naglaskom da su u slučaju ovih molekula krajevi pukotine otvoreni (za razliku od molekula HLA razreda I) pa se vezani peptidi mogu nalaziti i dijelom izvan pukotine, što u konačnici omogućuje vezanje dužih peptida građenih od 10-30 aminokiselina. Dio  $\beta$ -lanca, točnije  $\beta_2$  domenu molekule HLA

razreda II prepoznaje molekula CD4+ pomagačkih limfocita T. Dakle, u slučaju molekula HLA razreda II antigeni se predočuju CD4+ pomagačkim limfocitima T jednakim mehanizmom spregnutog prepoznavanja. Klasične molekule HLA razreda II predočuju vezikularne ili egzogene antigene mnogih izvanstaničnih patogena i to nakon procesa fagocitoze [2].

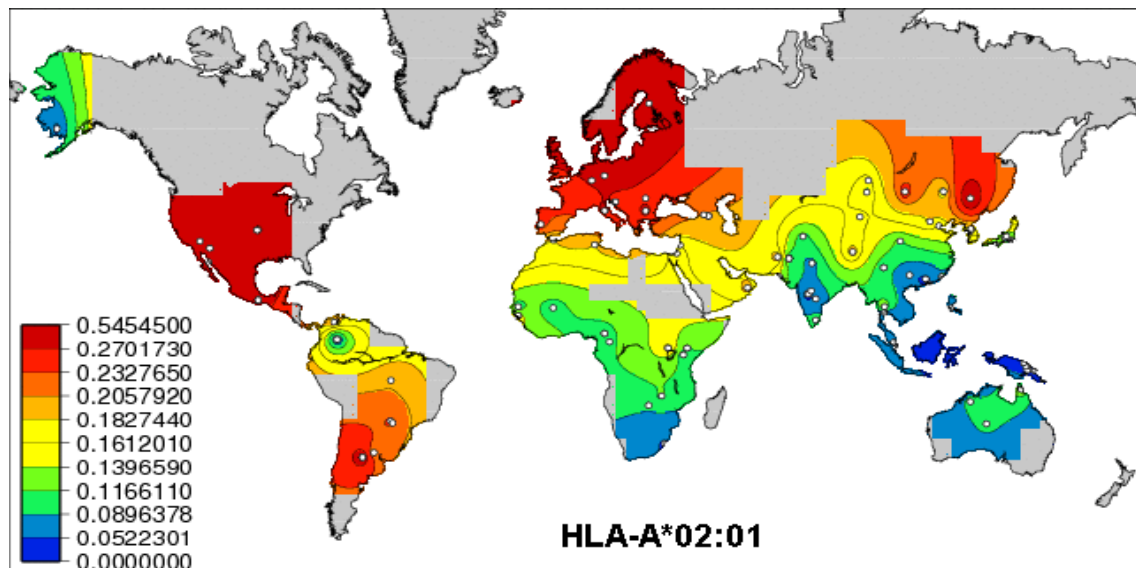
## **2.2. POPULACIJSKA ISTRAŽIVANJA SUSTAVA HLA**

Neposredno nakon otkrića prvih antigena HLA, 1958. godine, započinju i prva populacijska istraživanja. Rane spoznaje o njihovoj važnosti dovele su do osnivanja prvih stručnih radnih skupina, IHW (engl. International Histocompatibility Workshop) kojima je cilj bio zajednički razvoj spoznaja o genima/antigenima HLA te razmjena i razvoj podataka i metoda [32]. Prvo takvo okupljanje održano je 1964. godine pod nazivom „First Histocompatibility Workshop“. Organizirao ga je Bernard Amos u svom laboratoriju na Sveučilištu Duke u Sjevernoj Karolini. Workshop je okupio 23 stručnjaka iz cijelog svijeta čiji je cilj bio usporedba različitih metoda koje su koristili u otkrivanju tada svega triju različitih poznatih leukocitnih antigena. U sklopu ovog sastanka Paul Terasaki predstavio je test mikrocitotoksičnosti i pokazao vezu između pozitivne križne reakcije i hiperakutnog odbacivanja bubrega nakon transplantacije [33]. Shvaćanjem važnosti ovakvih sastanaka, sljedeći je održan već godinu dana kasnije, 1965. u Leidenu, u Nizozemskoj u laboratoriju Johannes Josepha „Jon“ van Rooda. Uz nove serume i antigene, te uključivanje računala u prve analize podataka vezanih uz sustav HLA, spominju se i prve populacijske usporedbe poznatih antigena HLA [34]. Na sljedećem sastanku, 1967. godine u Torinu, u Italiji, Ruggero Ceppellini je sa sudionicima sastanka odlučio nazvati do tada poznate antigene HL-A što je označavalo glavni sustav leukocitnih antigena [35]. Naredni sastanci održavani su svake dvije ili tri godine, a u sklopu njih potvrđivana su sva važnija otkrića na području imunogenetike i sustava HLA, od otkrića lokusa HLA-C i HLA-DR, do novog jedinstvenog nazivlja sustava HLA i populacijskih studija unutar obitelji [36, 37].

Na osmom međunarodnom sastanku 1980. godine, prvi puta su proučavane veze između antigena HLA i pojedinih bolesti kao što su dijabetes, reumatoidni artritis i multipla skleroza [38]. Nakon toga, uslijedila je potvrda lokusa HLA-DQ i HLA-DP. Na desetom međunarodnom sastanku, 1987. godine uvode se molekularne metode tipizacije HLA. Na ovim, kao i na svakom

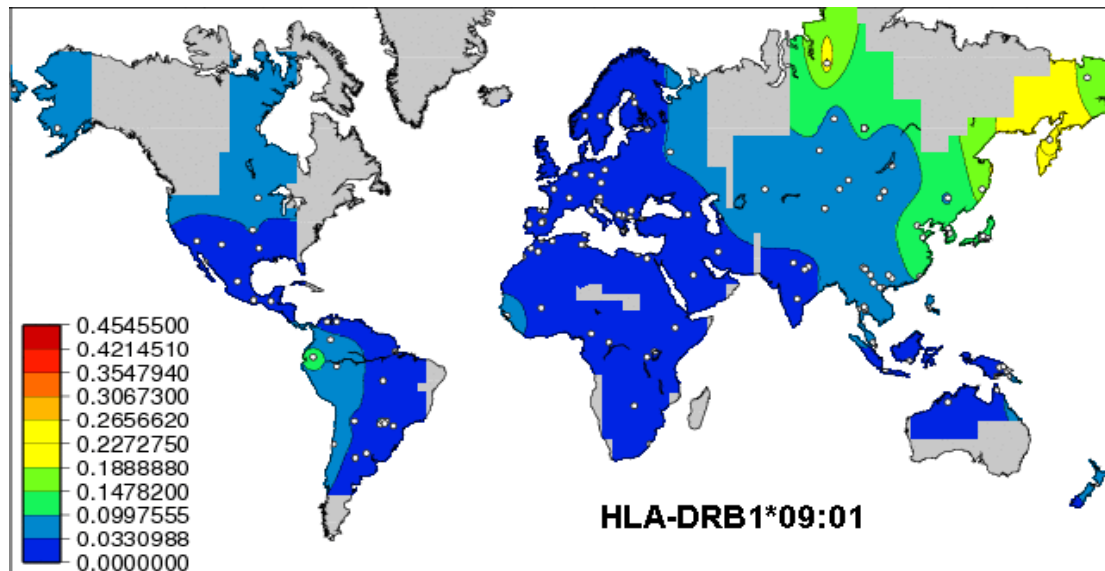
sljedećem sastanku, analizirani su podatci za brojne populacije te se ističe važnost populacijskih istraživanja [39-42].

Današnje metode molekularne biologije omogućavaju kako rutinsko određivanje polimorfizama na razini genskih skupina (tipizacija niskog razlučivanja-dvije znamenke, npr. HLA-A\*02) tako i na razini alela pojedinih gena (tipizacija visokog razlučivanja-četiri znamenke, npr. HLA-A\*02:01, -A\*02:02). Analize dobivenih rezultata uključuju određivanje učestalosti pojedinih genskih skupina/alela HLA u populacijama, ali i učestalosti haplotipova HLA i fenotipova HLA, uključujući različite kombinacije alela na istraživanim lokusima (npr. haplotipovi HLA-A~B, HLA-B~DRB1, HLA-A~B~DRB1 itd.). Rezultati populacijskih istraživanja pokazuju različitosti u raspodjeli alela u svijetu, neki aleli HLA prisutni su u većini populacija s velikom učestalošću (npr. HLA-A\*02:01) (slika 10), nekim alelima HLA se učestalost razlikuje ovisno o ispitivanoj populaciji (npr. DRB1\*09:01 koji je rijedak u populacijama europskog porijekla, a čest u populacijama azijskog porijekla) (slika 11). Također, brojni aleli HLA zastupljeni su s vrlo malom učestalošću u malom broju populacija (npr. HLA-B\*48:01) (slika 12).

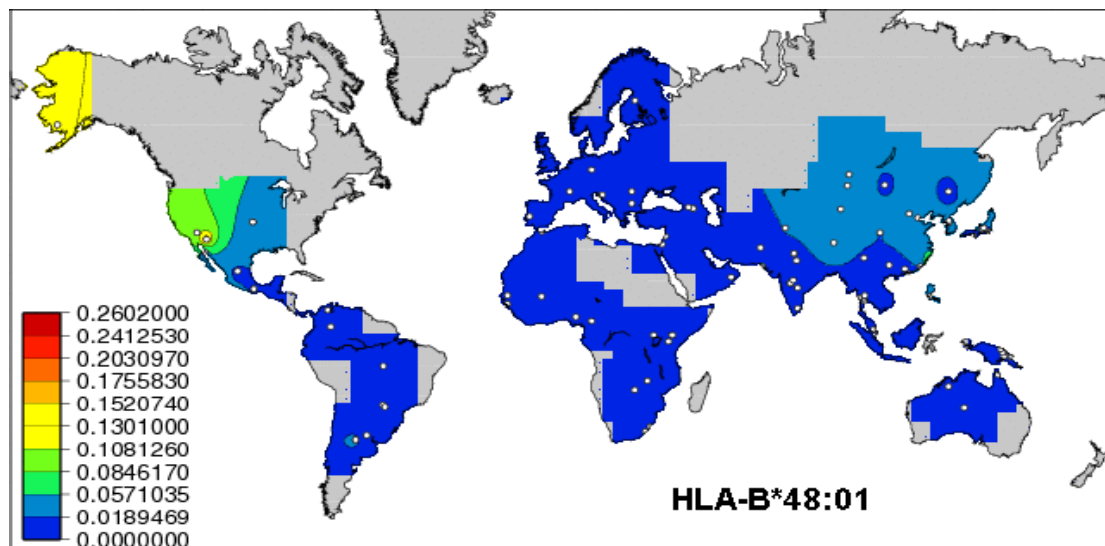


Slika 10. Raspodjela alela HLA-A\*02:01 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA

Nadalje, otkrivene su i razlike u raspodjeli alela HLA pojedinih genskih skupina HLA. Tako je npr. za gensku skupinu HLA-A\*02 raspodjela dva najčešća alela izrazito različita: alel HLA-A\*02:01 prisutan je s učestalošću od  $\approx 30\%$ , a alel HLA-A\*02:05 s učestalošću od  $\approx 3\%$ .



Slika 11. Raspodjela alela HLA-DRB1\*09:01 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA

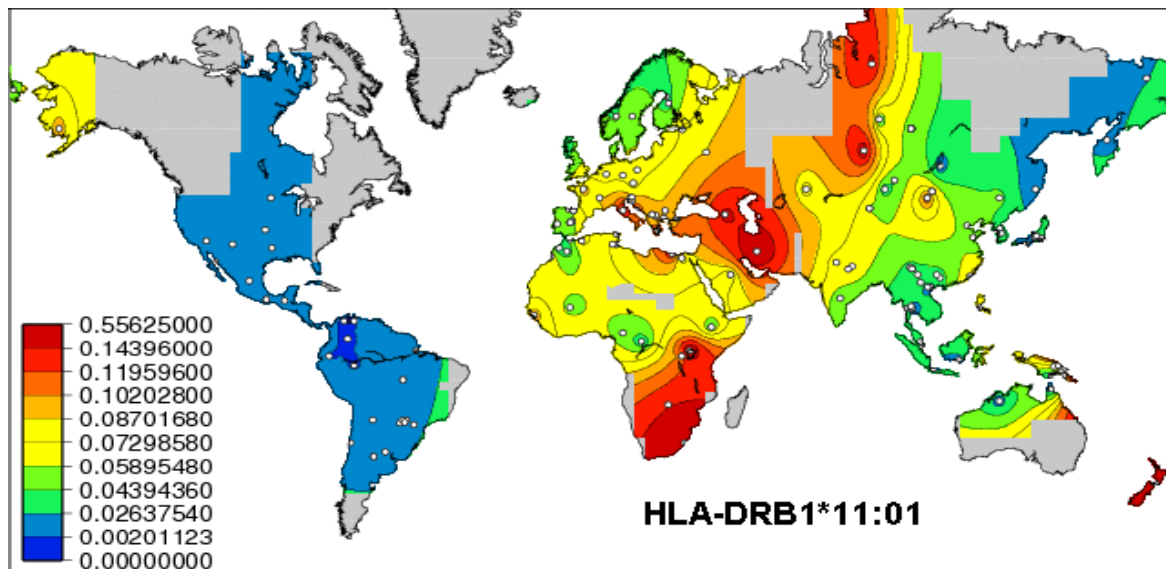


Slika 12. Raspodjela alela HLA-B\*48:01 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA

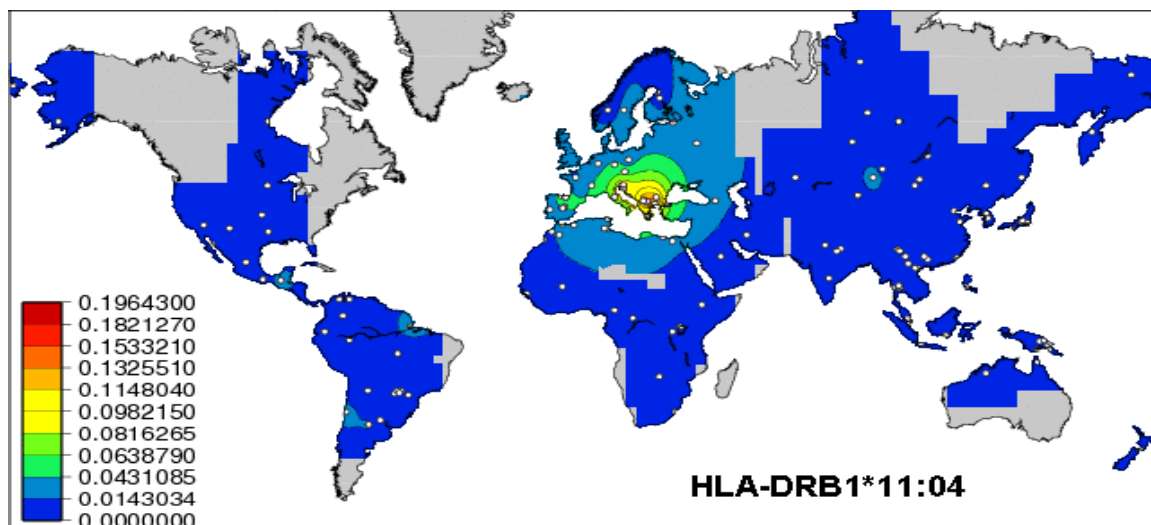
Osim alela HLA-A\*02:01, ostali aleli HLA-A vrlo česti među populacijama europskog porijekla su: HLA-A\*01:01, -A\*03:01 i -A\*24:02. Raspodjela alela HLA-A\*01:01 i -A\*03:01 pokazuje zemljopisne razlike budući da su češći na sjeveru Europe negoli na području jugoistočne Europe. Obrnuti je slučaj s alelom HLA-A\*24:02 koji je češći na području jugoistočne Europe u odnosu na ostale europske regije [25]. Prema istom istraživanju europskih populacija najčešće skupine alela na lokusu HLA-B bile su -B\*35 (najčešći alel B\*35:01) i -B\*51 (najčešći alel -B\*51:01), inače relativno česti i u većini populacija u svijetu. Raspodjela

alela HLA-B\*35:01 i -B\*51:01 također pokazuje geografske razlike. Naime, uočena je veća učestalost tih alela na području jugoistočne Europe u usporedbi s populacijama zapadne i sjeverne Europe. Alel HLA-C\*07:01 najčešći je alel lokusa HLA-C u Europi, ali i u mnogim populacijama u svijetu, s manjom učestalošću u jugoistočnoj Europi u usporedbi s drugim europskim regijama. Na lokusu HLA-DRB1 u Europi je najčešća genska skupina HLA-DRB1\*11, odnosno aleli DRB1\*11:01 i DRB1\*11:04 koji također pokazuju razlike u zastupljenosti od sjevera do juga Europe, odnosno pad učestalosti od istoka prema zapadu Europe (slika 13a, b).

a)



b)



Slika 13. Raspodjela alela HLA-DRB1\*11:01 i -DRB1\*11:04 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA



HLA-DQB1\*03 je najčešća genska skupina lokusa HLA-DQB1 koja je u većini populacija u svijetu prisutna s vrlo visokom učestalošću i za razliku od nekih navedenih primjera ne pokazuje izraženije geografske razlike u zastupljenosti u Europi [7].

Populacijska istraživanja raznolikosti haplotipova HLA, koja mogu obuhvaćati analizu samo dva lokusa, ali i višelokusne analize, također su pokazala veliku raznolikost kako među ispitanicima iste populacije tako i između različitih populacija. Tako je npr. haplotip HLA-A\*01~B\*08~DRB1\*03 jedan od triju najčešćih haplotipova među populacijama europskog porijekla, ali ne i u populacijama afričkog ili azijskog porijekla [7]. Za većinu populacija karakterističan je izrazito velik broj haplotipova, tim veći što je u analizu uključen veći broj lokusa. Najveći izazov populacijskim istraživanjima predstavlja neprestano otkrivanje novih alela HLA što dovodi do potrebe za nadopunjavanjem i proširivanjem već obrađenih populacija.

### **2.2.1. Populacijska istraživanja sustava HLA u Republici Hrvatskoj**

Populacijska istraživanja, čiji je cilj utvrditi i analizirati učestalost odnosno raspodjelu alela HLA provode se kontinuirano i u Republici Hrvatskoj još od početka sedamdesetih godina prošlog stoljeća. Neposredno nakon četvrtog međunarodnog IHW-a 1974. godine, Kaštelan i suradnici objavljuju prvi rad o učestalosti antigena HLA na uzorku od 178 nesrodnih ispitanika [44]. Istraživanje je otkrilo deset poznatih antigena na „prvom“ lokusu i petnaest antigena na „drugom“ lokusu HLA, odnosno na lokusima HLA-A i -B. Pokazane su njihove frekvencije kao i frekvencije fenotipova za istraživane lokuse. Sljedećih godina, objavljeni su još neki radovi o učestalosti antigena HLA i njihovoj povezanosti s bolestima kao što su ankilozantni spondilitis i psorijatični artritis [45, 46]. Usporedno s napretkom molekularnih metoda u svijetu, prva testiranja gena HLA na molekularnoj razini objavljena su već 1995. godine [8]. U navedenom istraživanju, na uzorku od 141 osobe određeni su geni HLA razreda II i pokazan je velik polimorfizam; otkriveno je prisustvo 31 alela HLA-DRB1, osam alela HLA-DQA1, trinaest alela HLA-DQB1 i šesnaest alela HLA-DPB1. Uslijedila su daljnja istraživanja koja su obuhvaćala hrvatske otoke Krk i Hvar [47, 48]. U njima je pokazano da postoje razlike u raspodjeli alela HLA između izoliranih populacija, kao što su ove otočke i cjelokupne hrvatske populacije. Najveće razlike tada su uočene za alele lokusa HLA-DRB1, a pokazani su i neki haplotipovi HLA-DRB1~DQA1~DQB1 koji do tada nisu bili opisani u hrvatskoj populaciji. Prva istraživanja haplotipova HLA razreda II, objavljena su 1999. godine u kojima su unutar nesrodnih obitelji određivani haplotipovi HLA-DRB1~DQA1~DQB1. Haplotipovi HLA-

DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01, DRB1\*11~DQA1\*05:01~DQB1\*03:01 i DRB1\*12:01~DQA1\*05:01~DQB1\*03:01 bili su najčešći i najkonzerviraniji haplotipovi u populaciji, dok su haplotipovi s alelom HLA-DRB1\*13 pokazivali najveću raznolikost [49].

Istraživanje koje je obuhvatilo analizu alela HLA razreda I i razreda II objavljeno je 2000. godine [9] i predstavljalo je osnovu istraživanja alela i haplotipova HLA u razdoblju nakon toga. U tom istraživanju, provedenom unutar 105 obitelji s najmanje dvoje djece, pronađeno je četrnaest različitih alela HLA-A, osamnaest alela HLA-B, 28 alela HLA-DRB1, 9 alela HLA-DQA1 i 11 alela HLA-DQB1. Tri najčešća haplotipa HLA bila su:

HLA-A1~B8~DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01;

HLA-A3~B7~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02 i

HLA-A24~B44~DRB1\*07:01~DQA1\*02:01~DQB1\*02:02.

Istraživanje raznolikosti alela i haplotipova HLA na većem broju ispitanika objavljeno je 2014. godine kada je analizirana zastupljenost alela i haplotipova HLA-A, -B i -DRB1 na 4000 nesrodnih, dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica iz Registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (RDDKMS) [50]. Uz same učestalosti alela i haplotipova HLA, doprinos ovog istraživanja bila je i usporedba tih učestalosti s ostalim europskim populacijama s dostupnim podacima. Tako je pokazana razlika za alele HLA -B\*40:02 i -DRB1\*11:04 koji su u našoj populaciji češći od alela HLA-B\*40:01 i -DRB1\*11:01 što nije slučaj u populacijama sjeverne i zapadne Europe. Također, pokazana je velika raznolikost haplotipova HLA, a istraživanje je predstavljalo velik doprinos u postupku pretraživanja podudarnog davatelja u našem i svjetskim registrima.

Usporedno su tekla istraživanja nasljeđivanja haplotipova HLA-A~B~DRB1 određenih nasljeđivanjem u obiteljima kako bi se vidjelo postoje li razlike u raspodjeli „pravih“ i „pretpostavljenih“ haplotipova HLA. U tom istraživanju nisu pronađene značajne razlike, a otkriveno je i 9 haplotipova koji do tada nisu bili prijavljeni u hrvatskoj populaciji [51]. Provedena su i brojna istraživanja raspodjele alela pojedinih gena kao što su HLA-B\*35, -B\*44, -DRB3 i -DRB4 u hrvatskoj populaciji, te istraživanja o rijetkim i vrlo rijetkim alelima HLA u hrvatskoj populaciji [12, 52-54].

Ipak, brojna do danas provedena istraživanja u Hrvatskoj, nisu uključivala alele lokusa HLA-C tako da podatci o učestalosti alela lokusa HLA-C kao i haplotipovi koji uključuju HLA -C nisu istraživani u hrvatskoj populaciji.

### 2.3. ALOGENIČNA TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica, TKMS, (*engl.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT), u prošlosti nazivana i transplantacijom koštane srži, svoje začetke vuče još iz tridesetih godina prošlog stoljeća kad su provedeni prvi pokusi s infuzijom koštane srži u bolesnika s aplastičnom anemijom [55]. Istraživanja provedena za vrijeme II. svjetskog rata, na životinjskim modelima dokazala su da se zračenjem može potpuno ukinuti funkcija koštane srži. Nastavak istraživanja pokazao je da je tako ozračene životinje moguće spasiti transfuzijom koštane srži druge životinje, što je bio temelj za uvođenje ove metode u liječenju različitih hematoloških bolesti.

Tijekom 1959. godine E.D. Thomas je uspio provesti prvu uspješnu transplantaciju i to u dva bolesnika s akutnom limfatičkom leukemijom kojima su davatelji bili njihovi identični blizanci [56]. Od tog trenutka nadalje, rezultati TKMS postaju sve bolji. Za to je uvelike zaslužno otkriće sustava HLA i njegove važnosti u izboru davatelja, ali i poboljšavanje postupaka i metoda koje se koriste pri samoj transplantaciji radi sprječavanja reakcije transplantata protiv primatelja (*engl.* Graft-versus-Host Disease, GvHD), bolje potpore bolesnika lijekovima nakon transplantacije kao i provođenje transplantacije za vrijeme remisije bolesti. Iako je sam postupak još uvijek povezan s brojnim rizicima i komplikacijama, danas se TKMS više nikako ne smatra eksperimentalnom metodom, već je, s oko 20 000 godišnje izvedenih transplantacija u svijetu, prihvaćena kao metoda izbora u liječenju čitavog niza različitih bolesti [57].

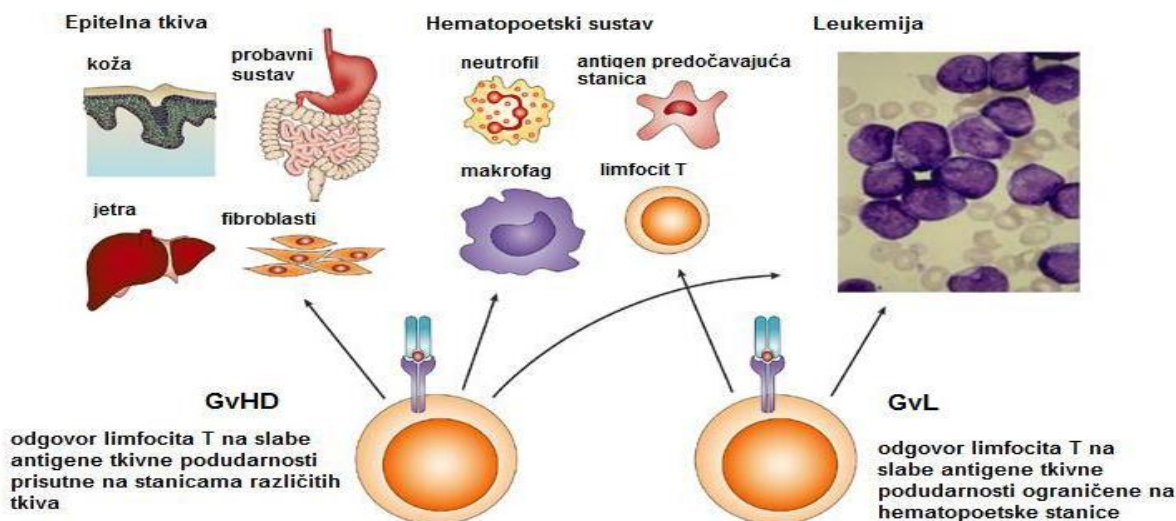
Alogenična TKMS jedan je od standardnih terapijskih postupaka u liječenju leukemija, limfoma i ostalih bolesti krvotvornog sustava, a u posljednje vrijeme i u liječenju autoimunih bolesti, nasljednih metaboličkih deficijencija i drugih oboljenja (tablica 2). Ishod TKMS ovisi o nizu različitih genetičkih i kliničkih čimbenika. Najvažniji genetički čimbenik je stupanj podudarnosti HLA primatelja i davatelja, a već razlika u samo jednom alelu HLA i to na razini jedne aminokiseline može pokrenuti aloreaktivnu reakciju limfocita T i odbacivanje transplantata [58].

Tablica 2. Bolesti koje se liječe transplantacijom krvotvornih matičnih stanica

<i>Maligne bolesti</i>	<i>Nemaligne bolesti</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akutna mijeloična leukemija (AML)</li> <li>• Akutna limfatička leukemija (ALL)</li> <li>• Kronična mijeloična leukemija (CML) i mijeloproliferativni poremećaji</li> <li>• Kronična limfatička leukemija (CLL)</li> <li>• Non-Hodgkinov limfom (NHL)</li> <li>• Hodgkinova bolest (HL)</li> <li>• Mijelodisplastični sindromi (MDS)</li> <li>• Multipli mijelom i amiloidoza</li> <li>• Solidni tumori: dojka, testis, jajnik i mikrocelularni karcinom pluća</li> <li>• Pedijatrijski solidni tumori: neuroblastom, Ewingov sarkom, meduloblastom, karcinom bubrežnih stanica, melanom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplastična anemija (AA) i srodna zatajenja koštane srži</li> <li>• Hemoglobinopatije: talasemija, anemija srpastih stanica</li> <li>• Kongenitalni poremećaji hematopoeze: Fanconijeva anemija i srodni sindromi</li> <li>• Kongenitalne imunodeficijencije: teška kombinirana imunodeficiencija, Wiskott-Aldrichev sindrom, kronična granulomatozna bolest i srodni sindromi</li> <li>• Urođene greške metabolizma</li> <li>• Autoimuni poremećaji</li> </ul>

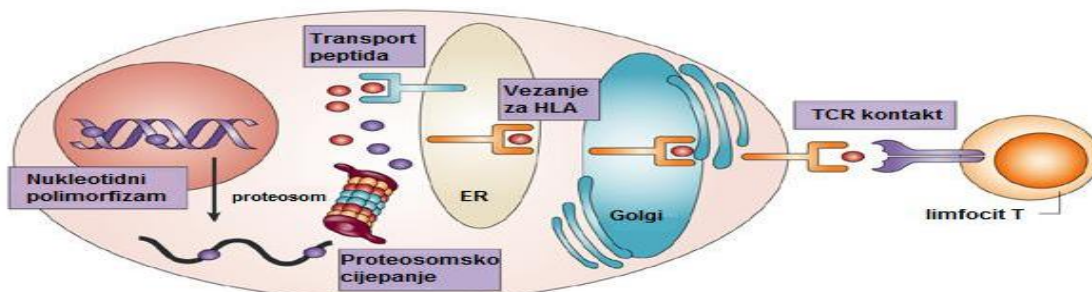
### 2.3.1. Imunološki procesi u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Postupak TKMS razvijen je kako bi omogućio primjenu inače smrtonosnih doza zračenja i/ili kemoterapije kojima se uklanjaju tumorske stanice. Naime, budući niti zračenje niti citostatici koji se koriste u tim postupcima nisu specifični za tumor, takvo intenzivno kondicioniranje dovodi do uništenja krvotvornog i imunološkog sustava bolesnika te je nužna TKMS kako bi se osigurao njihov oporavak. Nažalost, niti jedan od dosad istraživanih postupaka kondicioniranja ne osigurava potpuno uklanjanje tumora. Za uklanjanje preostalih tumorskih stanica ključan je učinak zrelih stanica transplantata protiv leukemije (*engl.* Graft-versus-Leukemia, GvL) i to prije svega limfocita T. Iste stanice su odgovorne i za razvoj GvHD-a te ta dva procesa zapravo predstavljaju dva naličja iste medalje (slika 14) [59]. Jedan od najvećih izazova znanstvenicima iz područja transplantacijske imunologije predstavlja upravo pitanje da li je ta dva procesa moguće razdvojiti, odnosno da li je moguće razviti postupak kojim bi se spriječio GvHD, a da se pritom ne umanjuje učinak efekta GvL [60].



Slika 14. Uloga limfocita T u nastanku GvHD i učinka GvL nakon TKMS. GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja; GvL - učinak transplantata protiv leukemije

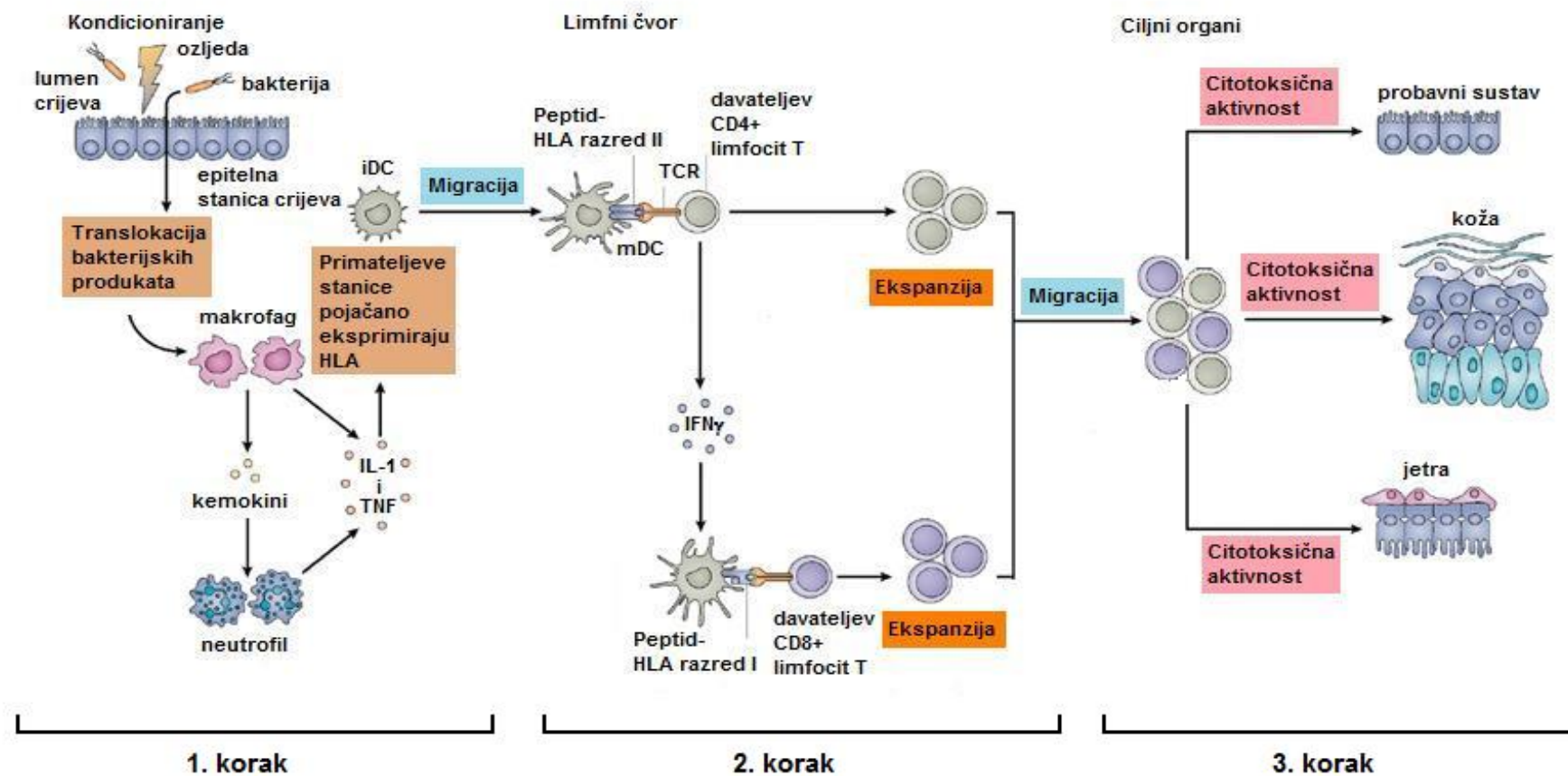
U oba efekta (GvL i GvHD) nezaobilazna je uloga molekula HLA razreda I i II koje prezentiraju antigene citotoksičnim i pomoćničkim limfocitima T. Nepodudarnost za alele HLA primatelja i davatelja predstavlja najveći rizik za razvoj GvHD-a ili odbacivanje transplantata. Premda je učestalost GvHD-a puno manja ukoliko su primatelj i davatelj podudarni za alele HLA, on se ipak pojavljuje i to kao posljedica odgovora limfocita T na slabe antigene tkivne podudarnosti (*engl.* Minor Histocompatibility Antigens, mHAg). Slabi antigen tkivne podudarnosti može biti bilo koji protein u organizmu koji unutar slijeda nukleotida svog gena posjeduje varijabilnost, odnosno ako za taj protein postoje razlike bilo u slijedu aminokiselina bilo u razini ekspresije između jedinki unutar populacije (slika 15).



Slika 15. Mehanizam nastanka slabih antigena tkivne podudarnosti. TCR - T stanični receptor

Razlika između efekata GvL i GvHD-a leži upravo u vrsti slabih tkivnih antigena koji potiču odgovor limfocita T. Ukoliko se radi o više mHAg koji su specifični za tumorsku stanicu, razvija se učinak GvL, a u slučaju kada se mHAg nalaze na različitim zdravim tkivima, dolazi do razvoja GvHD-a [61].

Upravo je GvHD jedna od najtežih komplikacija nakon TKMS, a javlja se u dva oblika: akutni i kronični GvHD. Akutni GvHD izaziva oštećenje kože, jetre i probavnog sustava i javlja se u roku od 100 dana nakon TKMS dok kronični oblik ima puno raznovrsnije manifestacije i može nalikovati autoimunim sindromima. Granica od 100 dana postavljena je radi lakših analiza, a za pravu potvrdu potrebna je patohistološka klasifikacija. Sam proces nastanka akutnog GvHD-a se može podijeliti u tri koraka (slika 16).

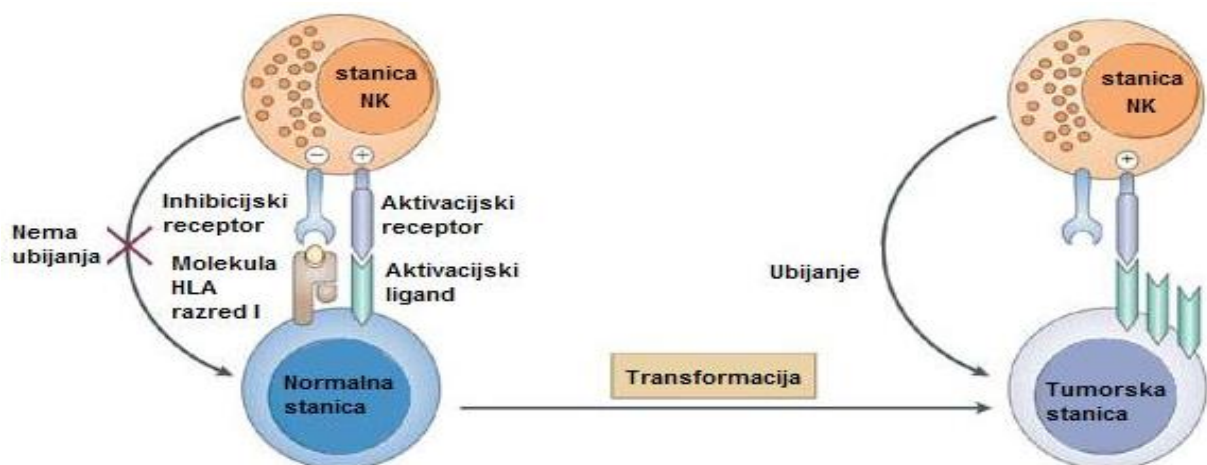


Slika 16. Mehanizam nastanka akutnog GvHD-a. iDC - nezrela dendritička stanica; mDC - zrela dendritička stanica; IL-1 - interleukin 1; TNF - čimbenik nekroze tumora; TCR - T stanični receptor

Početna, tzv. inicijacijska faza GvHD-a se odvija prije transplantacije, odnosno za vrijeme kondicioniranja bolesnika. U tom razdoblju uslijed citotoksičnog djelovanja kemoterapije i zračenja dolazi do oštećenja tkiva bolesnika, posebice crijevne mukoze. Oštećenje tkiva omogućava prijenos bakterijskih produkata kao što je npr. lipopolisaharidi iz lumena crijeva u krvotok uslijed čega dolazi do izlučivanja protuupalnih citokina (tzv. „citokinska oluja“) što dovodi do pojačane ekspresije molekula HLA kao i adhezijskih molekula na stanicama bolesnika. Na taj način se povećava sposobnost tih stanica da prezentiraju antigen.

U drugom koraku dolazi do aktivacije limfocita T davatelja unutar limfnih čvorova što rezultira stvaranjem interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji dodatno pojačava ekspresiju molekula HLA, adhezijskih molekula i kemokina na antigen prezentirajućim stanicama (*engl.* Antigen Presenting Cells, APC), prvenstveno dendritičkim stanicama (DC). Na taj način, IFN- $\gamma$  još više potiče prezentaciju antigena, ali i aktivaciju limfocita CD8+ i CD4+ specifičnih za primatelja. U završnom, trećem koraku te efektorske stanice putuju u ciljne organe gdje uzrokuju oštećenje tkiva koje može dovesti do multiorganskog zatajenja [62].

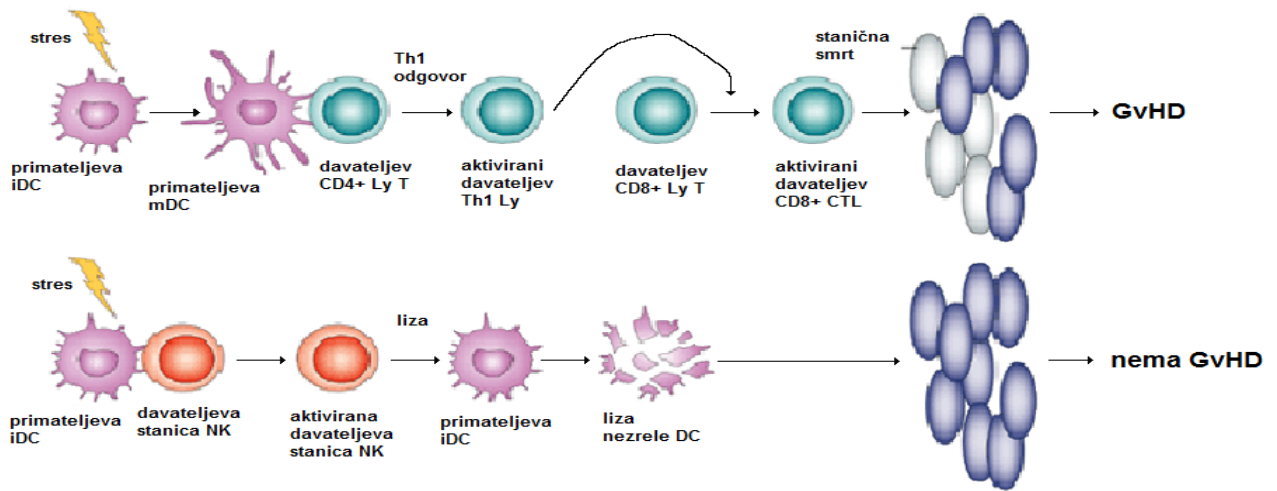
Premda su limfociti T od ključne važnosti za odvijanje imunoloških reakcija koje su potaknute kao posljedica TKMS, posljednjih godina se pozornost znanstvenika sve više usmjerava na tzv. stanice NK i njihovu ulogu, kako u stvaranju učinka GvL, tako i u nastajanju GvHD-a. Naime, za aktivaciju stanice NK, uz vezanje liganda za aktivacijske receptore, istovremeno ne smije doći do interakcije inhibicijskog receptora i njegovog liganda. Na taj način su stanice NK odgovorne za održavanje imunološke tolerancije i sprječavanje autoimunosti. Otkriće tog mehanizma, kao i otkriće da su ligandi inhibicijskih receptora stanica NK molekule HLA, omogućilo je razvijanje pristupa koji poboljšavaju učinak GvL, a temelje se na citotoksičnim sposobnostima stanica NK (slika 17).



Slika 17. Shema mehanizma aktivacije stanica NK



Gubitak ekspresije molekula HLA je jedan od uobičajenih mehanizama bijega tumorske stanice. Međutim, takva tumorska stanica, premda više ne može biti prepoznata i uklonjena posredstvom citotoksičnih limfocita T, više ne šalje inhibicijski signal koji je potreban da ne postane meta stanice NK. S druge strane, stanice NK neće dovesti do razvoja GvHD-a, upravo suprotno, prema istraživanjima na mišjim modelima, stanice NK zapravo sprječavaju razvoj GvHD-a i to ubijajući dendritičke stanice primatelja (slika 18) [63].



Slika 18. Shema pretpostavljenog mehanizma djelovanja stanica NK u sprječavanju GvHD-a. iDC - nezrela dendritička stanica; mDC - zrela dendritička stanica; Ly T - limfocit T; CTL - citotoksični limfocit T; GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja

Postoje brojni pristupi kojima se u današnje vrijeme pokušava spriječiti razvoj GvHD-a uz istovremeno zadržavanje učinka transplantata na tumorske stanice. U nekim centrima se smanjuje štetni učinak kondicioniranja primjenom nemijeloablativnih protokola. Drugi pristup je kombinacija mijeloablativnog kondicioniranja uz depleciju limfocita T iz transplantata te kasnije primjene infuzija davateljevih limfocita (*engl.* Donor Lymphocyte Infusion, DLI). Konačno, u svjetlu otkrića prednosti stanica NK u usporedbi s limfocitima T, danas se sve više koriste protokoli tzv. haploidentične transplantacije u kojoj se bira davatelj transplantata s ciljanom nepodudarnošću HLA, odnosno onom koja će osigurati postojanje aloreaktivnih stanica NK u transplantatu. Poznavanje tipa inhibicijskih receptora (*engl.* Killer Inhibitory Receptor, KIR) koji se nalaze na stanicama NK davatelja neophodno je u planiranju haploidentične transplantacije. Naime, budući se radi o receptorima koji nisu specifični za pojedinačne molekule HLA razreda I, već za grupe molekula HLA, nepodudarnost za gene HLA ne znači nužno i nepodudarnost za ligande receptora KIR na stanicama NK [64].

### **2.3.2. Izvori krvotvornih matičnih stanica u TKMS**

Danas su za potrebe transplantacije na raspolaganju tri izvora KMS, a to su koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Odluka o odabiru izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti davatelja KMS. U autolognoj transplantaciji danas se prednost daje KMS periferne krvi. U alogeničnoj transplantaciji na odluku utječe dob davatelja te iskustva transplantacijskog centra [65]. Iako je potvrđena obnova funkcije koštane srži nakon transplantacije KMS iz svih triju izvora, poznato je da postoje brojne kako kvantitativne tako i kvalitativne razlike između transplantata sakupljenih iz različitih izvora KMS [66, 67]. Glavne razlike između izvora KMS prikazane su u tablici 3.

Izvješće grupe European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) o transplantaciji KMS u 2017. godini pokazalo je da je u Europi, u sklopu 683 centra koja provode TKMS izvedena 45 418 TKMS, od čega 60% autolognih, a 40% alogeničnih. Za više od 18 000 izvedenih TKMS, u  $\approx 20\%$  slučajeva izvor KMS je bila koštana srž, u više od 77% TKMS izvor KMS je bila periferna krv, dok je svega u nešto više od 2% izvedenih TKMS izvor KMS bila krv iz pupkovine [68].

Tablica 3. Izvori krvotvornih matičnih stanica: prednosti i nedostaci

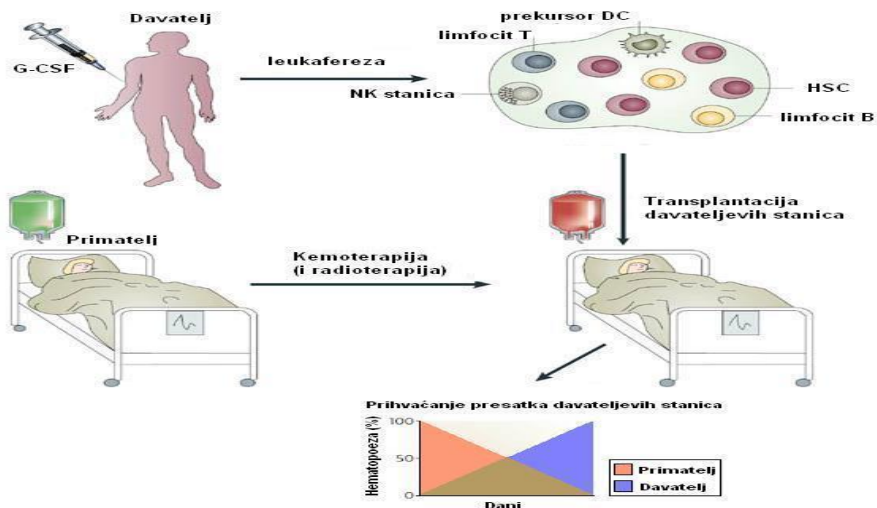
<p><b>Periferna krv</b></p>	<p>+najbrži oporavak funkcija koštane srži          +jednostavno sakupljanje staničnim separatorom          +vrlo mali broj nuspojava: tromboza ili infekcija katetera, trombocitopenija, hipokalcemija, hipotenzija          +brži hematološki oporavak, manja kontaminacija tumorskim stanicama          +veći broj limfocita T – manja vjerojatnost relapsa bolesti          +mogućnost DLI-a          -neophodna mobilizacija KMS: kemoterapijom i/ili krvotvornim čimbenicima rasta          -komplikacije primjene krvotvornih čimbenika rasta</p>
<p><b>Koštana srž</b></p>	<p>+„tradicionalni“ izvor KMS          +manji broj T limfocita – manja vjerojatnost GvHD-a          +mogućnost DLI-a          -sakupljanje u operacijskoj sali u općoj anesteziji          -nuspojave sakupljanja: bol, infekcija, ozljeda živca na mjestu vađenja; komplikacije anestezije</p>
<p><b>Krv iz pupkovine</b></p>	<p>+jednostavno sakupljanje bez rizika za darivatelja          +lakša dostupnost transplantata u kraćem vremenskom roku          +moguća transplantacija i u slučaju djelomične HLA podudarnosti          -varijabilan volumen krvi (50-150 mL) i stoga ograničen broj stanica          -odgođeno prihvaćanje transplantata          -nema mogućnosti DLI-a</p>

### **2.3.3. Vrste davatelja krvotvornih matičnih stanica**

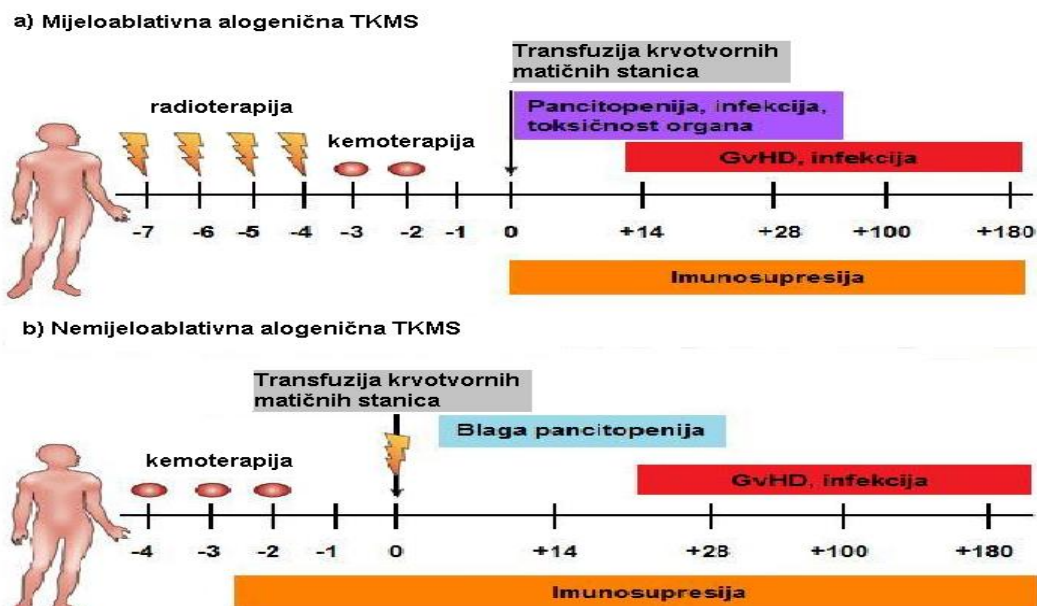
U liječenju TKMS rutinski se primjenjuju alogenična i autologna transplantacija. Kod autologne TKMS bolesniku se u medicinski najpovoljnijem trenutku uzimaju KMS koje se kasnije koriste za TKMS. Kod alogene transplantacije, ukoliko bolesnik ima potpuno podudarnog davatelja unutar obitelji (brata ili sestru) radi se o genotipski HLA podudarnom srodnom davatelju. Bolesnik i davatelj se u ovom slučaju osim za alele HLA podudaraju i za sve druge gene naslijeđene unutar istog haplotipa, a prednost je i brza dostupnost davatelja. Ako bolesnik nema davatelja unutar obitelji, ali ima nesrodnog davatelja s kojim je podudaran za alele HLA radi se o fenotipski podudarnom HLA davatelju. Ovisno o učestalosti alela i haplotipova, fenotipski podudarnog nesrodnog davatelja pronađe između 40-70% bolesnika [69]. Uz nove, sve djelotvornije imunosupresivne lijekove moguće je provesti TKMS i kada se transplantirane stanice davatelja razlikuju od primatelja u alelima na više lokusa, primjerice, mogu se koristiti stanice haploidentičnog davatelja (najčešće majka, otac, brat ili sestra). Transplantacija od nepodudarnog davatelja nosi povećani rizik odbacivanja te povećanu učestalost i težinu GvHD-a.

### **2.3.4. Postupak transplantacije krvotvornih matičnih stanica**

Dva su ključna postupka u samoj transplantaciji (slika 19). Prvi je priprema bolesnika prije transplantacije koja najčešće uključuje kombinaciju kemoterapije i zračenja sa svrhom postizanja nekoliko ciljeva. Prvi cilj je supresija imunološkog sustava bolesnika čime se smanjuje mogućnost odbacivanja transplantata. Drugi cilj je, ukoliko se radi o nekoj malignoj bolesti kao što je npr. leukemija, smanjivanje broja tumorskih stanica. Konačno, ovim postupkom se smanjuje i broj bolesnikovih krvotvornih stanica. Osim ovih mijeloablativnih postupaka, koristi se i tzv. kondicioniranje smanjenog intenziteta, poznato i kao nemijeloablativno kondicioniranje. Taj postupak se ne oslanja na citotoksični utjecaj kondicioniranja u svrhu uklanjanja tumorskih stanica, već na utjecaj limfocita T davatelja iz transplantata, te tako omogućava transplantaciju i kod onih bolesnika koji ne bi mogli podnijeti standardni, mijeloablativni postupak pripreme (slika 20).



Slika 19. Shema postupka transplantacije krvotvornih matičnih stanica. G-CSF - čimbenik rasta kolonija granulocita; DC - dendritička stanica; KMS - krvotvorna matična stanica



Slika 20. Shema mijeloablativnog i nemijeloablativnog kondicioniranja prije transplantacije krvotvornih matičnih stanica. TKMS - transplantacija krvotvornih matičnih stanica; GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja

Drugi dio postupka odnosi se na samu transplantaciju stanica davatelja. Unutar transplantata nalaze se KMS koje će obnoviti krvotvorni i imunološki sustav primatelja, ali i zrele stanice davateljevog imunološkog sustava, koje su ključne za postizanje učinka transplantata protiv tumora. Radi se prvenstveno o citotoksičnim limfocitima T [70].

Nastavak liječenja bolesnika nakon TKMS uključuje čitav niz postupaka nužnih za povoljan ishod. Bolesnici koji su bili podvrgnuti mijeloablativnom protokolu, nalaze se u stanju pancitopenije i osjetljivi su na različite infekcije te stoga moraju boraviti u sterilnom okruženju. Potpora transfuzijama eritrocita i trombocita je nužna, kao i profilaktičko liječenje protiv bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija. Provođenje imunosupresije bolesnika nakon transplantacije potrebno je i radi sprječavanja razvoja GvHD-a. Konačno, jedan je od postupaka koji se primjenjuje nakon transplantacije i predstavlja možda i najveći napredak u posljednjih nekoliko godina u ovom području, stanična terapija, tj. DLI, koja se koristi za poboljšanje učinka GvL, odnosno u slučaju pojave relapsa bolesti [71].

### **2.3.5. Postupak pronalaska podudarnog davatelja u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica**

Osim u antropološkim istraživanjima, praćenju miješanja populacija i njihovih migracija, podatci o polimorfizmu gena HLA u svijetu od neprocjenjivog su značaja u strategiji odabira nesrodnog davatelja KMS. Naime, mnogi transplantacijski centri postupak pretraživanja temelje na učestalosti alela i haplotipova HLA kako bi se brže odlučilo o odabiru davatelja s određenom nepodudarnošću HLA ili o transplantaciji s drugim izvorom KMS (npr. umbilikalna krv ili haploidentični davatelj) ili pak o odustajanju od liječenja TKMS. Uspjeh TKMS najbolji je ako se odabire nesrodni davatelj podudaran za gene HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 na razini alela HLA (tzv. podudarnost 10/10) [72]. Takav odabir zlatni je standard u velikom broju transplantacijskih centara u svijetu, kao i u KBC Zagreb koji jedini u našoj zemlji provodi TKMS od nesrodnog davatelja. U nekim slučajevima traženje idealno podudarnog HLA davatelja dovodi do značajnog produljenja vremena traženja, osobito za one bolesnike koji imaju rijetke ili vrlo rijetke alele i/ili haplotipove HLA [73]. Nasuprot tome, bolesnici s prisutnošću jednog ili oba česta haplotipa HLA imaju veliku vjerojatnost pronalaska HLA podudarnog nesrodnog davatelja. Podudarnost za alele HLA-C dugo vremena smatrana je nevažnom te je zanemarivana u odabiru nesrodnog davatelja. Međutim, otkrićem važnosti molekula HLA-C u suradnji s prirodno-ubilačkim stanicama (engl. Natural Killer, NK) i podudarnost na lokusu HLA-C postala je obavezan dio algoritma odabira nesrodnog davatelja [74, 75]. Veliku ulogu u odabiru davatelja ima i neravnoteža udruživanja. Snažan LD postoji između alela lokusa HLA-B i -C te lokusa HLA-DRB1 i -DQB1. Stoga, prisutnost jedne ili više neuobičajenih kombinacija alela HLA na ovim lokusima smanjuje vjerojatnost pronalaska HLA podudarnog davatelja te je odabir davatelja s nepodudarnošću na lokusu HLA-C ili -DQB1

često jedina opcija za takve bolesnike. S obzirom da je i vrijeme važan ograničavajući čimbenik u traženju nesrodnog davatelja, neophodno je uspostaviti što točniji proračun vjerojatnosti pronalaženja HLA podudarnog davatelja za pojedinog bolesnika kako bi se vrijeme pretraživanja svelo na minimum. Upravo populacijska istraživanja, uz doprinos znanju o genskoj raznolikosti alela HLA i haplotipova HLA, pružaju osnovu koja omogućava brži i uspješniji postupak odabira najboljeg mogućeg davatelja za svakog pojedinog bolesnika.

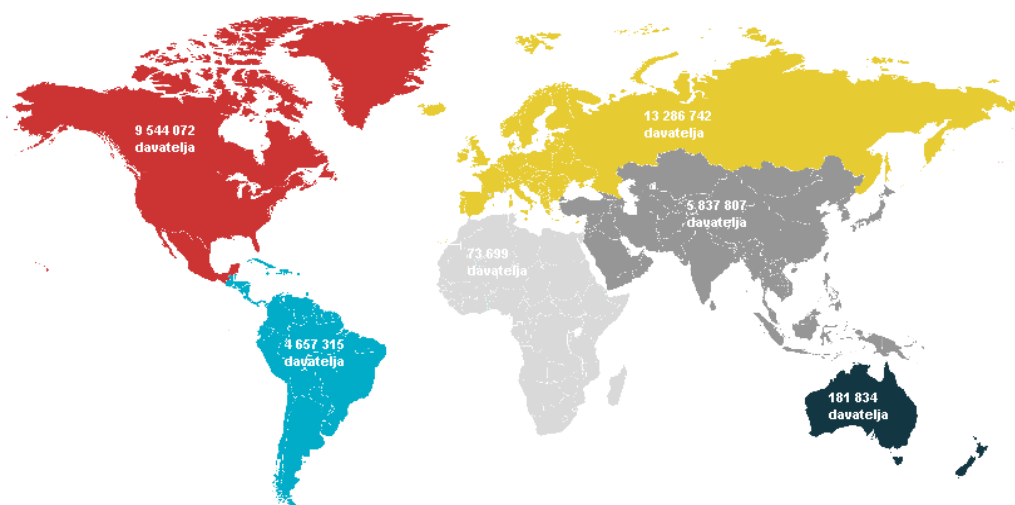
Postupak pronalaska podudarnog davatelja započinje s određivanjem alela HLA bolesnika i članova njegove uže obitelji (roditelji, braća i sestre) (slika 21). Budući se aleli HLA nasljeđuju prema mendelskim zakonima, vjerojatnost pronalaska davatelja među braćom i sestrama iznosi 25%. Ukoliko roditelji nose česte alele gena HLA, postoji mogućnost i da jedan od roditelja bude davatelj. Pretraživanje je opravdano proširiti i na članove šire obitelji ako roditelji potječu iz uske, zatvorene sredine ili su u daljnjem srodstvu. U slučajevima kada se unutar obitelji ne može pronaći odgovarajući davatelj, započinje se s postupkom pretraživanja registara dobrovoljnih nesrodnih davatelja. Ukoliko je davatelj brat ili sestra bolesnika, primatelj i davatelj se smatraju podudarnima ako su identični za gene HLA-A, -B i -DRB1. To nije slučaj ako je davatelj nesrodna osoba te se tada provode proširena testiranja za druge lokuse, HLA-C, -DQB1 ili -DPB1 [76].





## 2.4. REGISTRI DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Svjetski registar dobrovoljnih davatelja KMS (engl. Bone Marrow Donors Worldwide, BMDW) osnovao je 1988. godine Johannes J. van Rood sa suradnicima, u nizozemskom gradu Leidenu. Registar je osnovan s ciljem ujedinjavanja svih podataka o potencijalnim dobrovoljnim davateljima KMS u jedan katalog dostupan svima. U početku je uključivao osam nacionalnih registara s oko 155 000 dobrovoljnih davatelja. Broj nacionalnih registara i banaka krvi iz pupkovine uključenih u BMDW rastao je iz godine u godinu. Od 2017. godine sve djelatnosti BMDW-a spajaju se sa svjetskom asocijacijom davatelja krvotvornih matičnih stanica, WMDA (engl. The World Marrow Donor Association, WMDA). Danas WMDA broji preko 33 milijuna dobrovoljnih davatelja uključenih u rad 78 registara iz 53 zemlje te 56 banaka krvi iz pupkovine iz 33 zemlje (tablica 4). Najveći udio u broju dobrovoljnih davatelja u WMDA-u imaju europske zemlje i SAD (slika 22). S druge strane, udio dobrovoljnih davatelja iz azijskih zemalja, unatoč velikom broju stanovnika, iznosi samo 18%. Treba spomenuti da se Njemačka ističe kao zemlja s najvećim ukupnim brojem dobrovoljnih davatelja u Europi, odnosno kao jedina europska zemlja koja ima više od osam milijuna dobrovoljnih davatelja. Gledano prema broju davatelja na 10 000 stanovnika, na prvom mjestu nalazi se Izrael, na drugom Cipar, dok je njemački registar na trećem mjestu [4].



Slika 22. Broj nesrodnih dobrovoljnih davatelja prijavljenih po kontinentima (podatci iz reference 4)

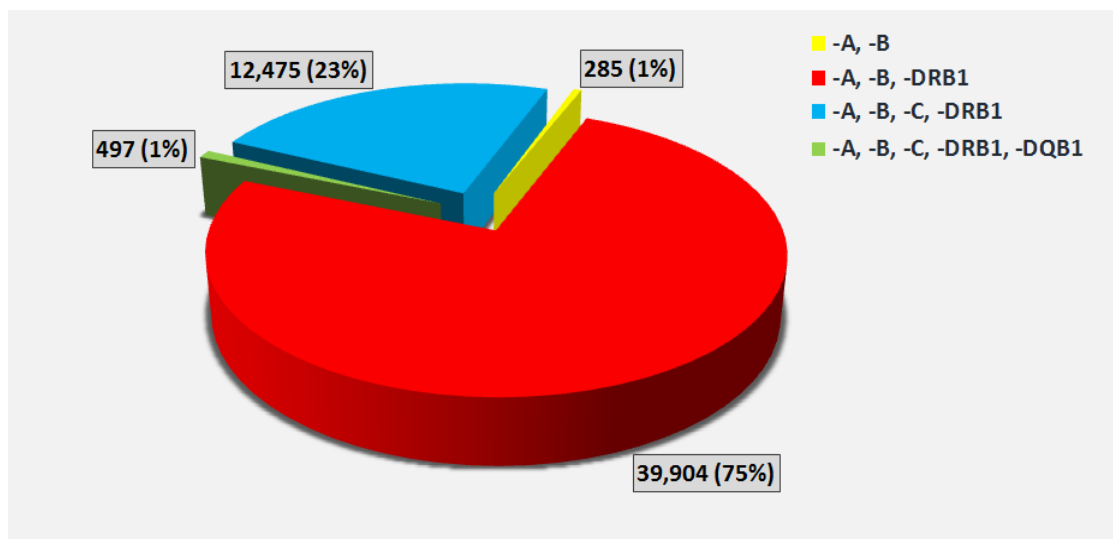
Tablica 4. Porast broja nesrodnih dobrovoljnih davatelja prijavljenih u Svjetski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica od 1989. do 2018. godine [4]

<b>GODINA</b>	<b>BROJ NESRODNIH DAVATELJA U WMDA-U (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>GODINA</b>	<b>BROJ NESRODNIH DAVATELJA U WMDA-U (x10<sup>6</sup>)</b>
1989.	0,2	2004.	9,3
1990.	0,4	2005.	9,9
1991.	0,7	2006.	10,7
1992.	1,2	2007.	11,5
1993.	1,7	2008.	12,4
1994.	2,3	2009.	13,6
1995.	2,9	2010.	14,9
1996.	3,7	2011.	18,6
1997.	4,3	2012.	19,8
1998.	5,4	2013.	24,2
1999.	6,2	2014.	27,6
2000.	6,8	2015.	28,9
2001.	7,4	2016.	30,6
2002.	8,1	2017.	32,6
2003.	8,7	2018.	33,9

Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica osnovan je 1994. godine. Od 1996. godine dio je WMDA i okuplja dobrovoljne davatelje krvotvornih matičnih stanica na području Republike Hrvatske. Njegova je osnovna zadaća organizacija i provođenje procesa pretraživanja i pronalaženja HLA podudarnog nesrodnog davatelja kako u našem registru tako i u međunarodnim registrima dobrovoljnih davatelja KMS [77]. Hrvatski registar danas broji više od 50 000 upisanih davatelja (tablica 5).

Tablica 5. Porast broja nesrodnih davatelja krvotvornih matičnih stanica u Registru dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica od 2010.-2019. godine [4]

GODINA	BROJ NESRODNIH DAVATELJA U RDDKMS-U
2010.	19313
2011.	25791
2012.	31758
2013.	36812
2014.	40722
2015.	43703
2016.	47103
2017.	49836
2018.	53161
2019.	57295



Slika 23. Broj davatelja tipiziranih za gene HLA u Hrvatskom registru dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica [4]

Davatelji u RDDKMS-u, u najvećem postotku su tipizirani za gene HLA-A, -B i -DRB1, dok je 23% davatelja tipizirano za gene lokusa HLA-C, a samo  $\approx 1\%$  davatelja tipizirano je i za lokus HLA-DQB1 (slika 23).

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. ISPITANICI**

Plan istraživanja odobren je od strane Etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **3.1.1. Nesrodni dobrovoljni davatelji iz Hrvatskog registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica**

Za provođenje populacijskog dijela istraživanja polimorfizma alela i haplotipova HLA u hrvatskoj populaciji, analizirani su uzorci 10 000 zdravih, nesrodnih dobrovoljnih davatelja iz RDDKMS-a koji su tipizirani za alele lokusa HLA-A, -B, -C i -DRB1 u razdoblju od 2013.-2015. godine. Izabrani davatelji predstavljaju reprezentativan uzorak hrvatske populacije, odabrani su nasumce, iz svih županija/regija Hrvatske. Iz istog grada uključeni su davatelji s različitim prezimenima, te s različitim adresama. Broj ispitanika iz pojedine regije bio je proporcionalan broju stanovnika te županije/regije. Ispitanicima iz RDDKMS-a, u trenutku pristupanja, uzet je uzorak krvi s antikoagulansom EDTA.

Veličina uzorka dodatno je testirana upotrebom statističkog kalkulatora: „Statistics calculators (verzija 4.0) - A priori sample size calculator for Student t-test“ [78]. Tom analizom utvrđeno je da je minimalna veličina uzorka od 2554 ispitanika potrebna za snagu testa 0,999, veličinu učinka 0,20 (Cohenov d) i razinu statističke značajnosti  $p \leq 0,05$ .

#### **3.1.2. Parovi primatelj-nesrodni davatelj u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica**

Za određivanje podudarnosti HLA između primatelja i nesrodnog davatelja, korištena je skupina od 261 para primatelj-nesrodni davatelj, koji su bili liječeni u programu TKMS u Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti i Klinici za pedijatriju KBC Zagreb u periodu od 2012.-2016. godine. U 66 slučajeva (25,29%) davatelj je bio dobrovoljni nesrodni davatelj iz RDDKMS-a dok je za preostalih 195 (74,71%) bolesnika davatelj bio iz WMDA-a. Bolesnici su primili transplantat KMS iz koštane srži ili iz periferne krvi davatelja, mobiliziranih granulocitnim faktorom rasta stimulacije kolonija (engl. Granulocyte-colony stimulating factor, G-CFS). Svim parovima primatelj-nesrodni davatelj određeni su aleli lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 prema standardima Europske federacije za imunogenetiku (engl. European Federation for Immunogenetics, EFI) [79].

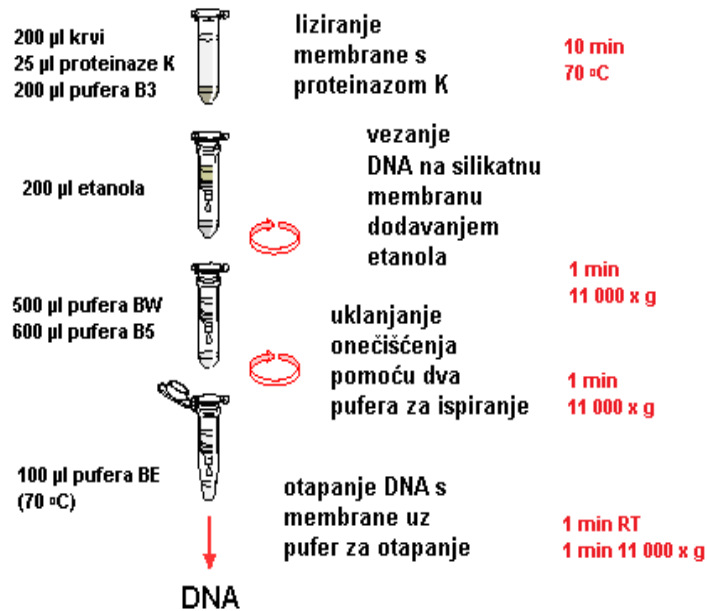
## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Izolacija DNA**

Za potrebe ovog rada korištene su dvije metode izolacije DNA, za nesrodne dobrovoljne davatelje iz RDDKMS-a DNA je izolirana pomoću uređaja za automatsku izolaciju, dok je DNA parova primatelj-nesrodni davatelj izolirana ručnom metodom koja koristi silikatnu membranu (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njemačka).

#### **3.2.1.1. Izolacija DNA korištenjem kolumni sa silikatnom membranom**

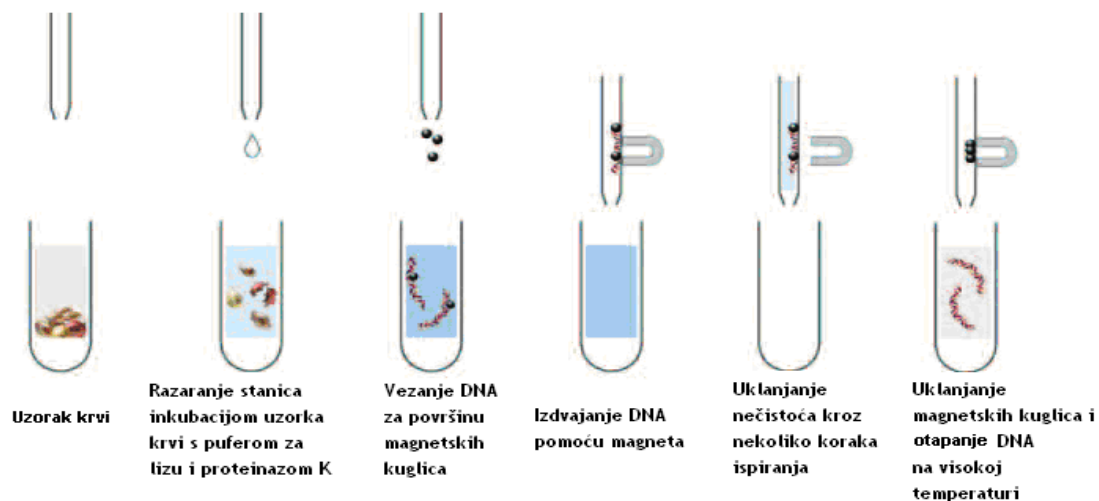
Iz 2 ml uzorka periferne krvi ispitanika DNA je izolirana pomoću komercijalnog seta za izolaciju (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njemačka). Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom koje specifično vežu molekule DNA (slika 24). Stanice se liziraju inkubacijom uzorka krvi s puferom za razgradnju stanica i proteinazom K. Dodavanjem etanola lizatu, DNA se veže za silikatnu membranu u odgovarajućoj NucleoSpin® Blood kolumni. Vežanje DNA je reverzibilno i specifično za nukleinske kiseline. Naredna dva ispiranja DNA s puferima za ispiranje uklanjaju proteine, a u zadnjem koraku DNA se otapa u odgovarajućem volumenu pufera za otapanje.



Slika 24. Shematski prikaz postupka izolacije DNA korištenjem kolumni sa silikatnom membranom

### 3.2.1.2. Izolacija DNA korištenjem uređaja za automatsku izolaciju

Iz 200 µl uzorka periferne krvi ispitanika izolirana je DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche, Rotkreuz, Švicarska) na uređaju MagNA Pure Compact. Metoda se temelji na uporabi magnetskih kuglica koja specifično veže molekule DNA (slika 25). Stanice se liziraju inkubacijom uzorka krvi s puferom za razgradnju stanica i proteinazom K. Tijekom postupka, DNA se veže na površinu magnetskih kuglica i potom izdvaja pomoću magneta. Preostale nečistoće uklanjaju se kroz nekoliko koraka ispiranja, a DNA se otopi na visokoj temperaturi tijekom postupka uklanjanja magnetskih čestica. Uređaj usporedno izolira između 8 i 32 uzorka.



Slika 25. Shematski prikaz automatskog postupka izolacije DNA

### 3.2.2. Određivanje genskih skupina i alela HLA

U istraživanju su korištene tri metode određivanja polimorfizama HLA. Nesrodni dobrovoljni davatelji iz RDDKMS tipizirani su metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima sa sekvencama specifičnim za genske skupine HLA (engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence-Specific Oligonucleotides, PCR-SSO). Parovi primatelj-nesrodni davatelj tipizirani su metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama sa sekvencama specifičnim za alele HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers, PCR-SSP). Uzorci koji nisu imali jednoznačne rezultate testiranja ili su se u našoj populaciji pojavili prvi put testirani su metodom sekvenciranja po Sangeru. Tipizacija na razini genskih skupina je tipizacija HLA niskog razlučivanja (NR), dok je tipizacija na razini alela tipizacija HLA visokog razlučivanja (VR)

#### 3.2.2.1. Metoda lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima sa sekvencama specifičnim za genske skupine HLA

Metoda PCR-SSO temelji se na umnažanju egzona 2 i 3 za određivanje alela HLA razreda I, odnosno egzona 2 za određivanje alela HLA razreda II. Preporučena koncentracija DNA za navedeni test je 50-100 ng/ $\mu$ l. Umnažanje DNA se izvodi prema protokolu proizvođača testova Lifecodes (Immucor, Stamford, USA), a produkt umnažanja su molekule DNA koje nakon denaturacije sudjeluju u hibridizacijskoj reakciji. Ukupni volumen jedne reakcije PCR

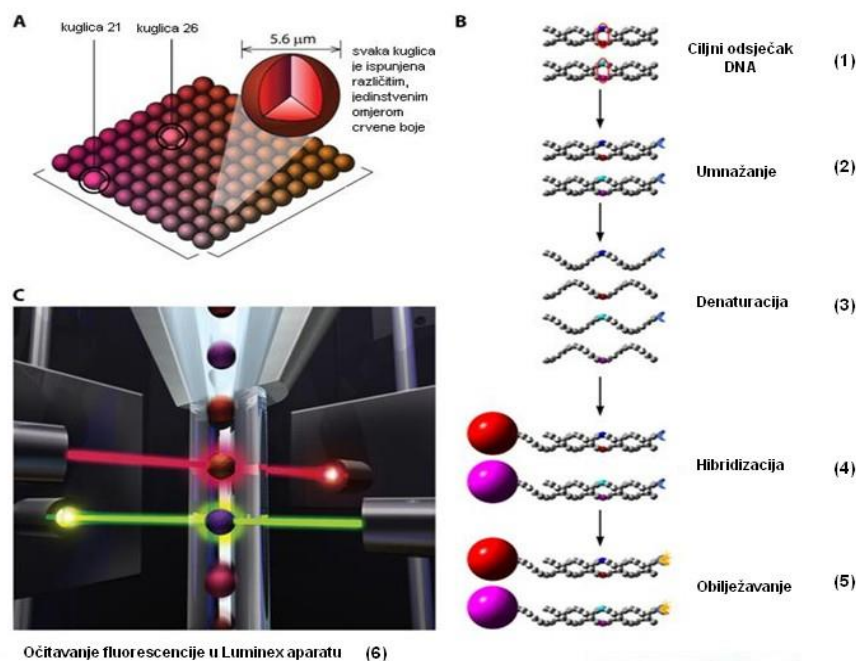


iznosi 20,2  $\mu$ l (6  $\mu$ l Lifecodes Master Mix, 9  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 0,2  $\mu$ l polimeraze Taq i 5  $\mu$ l uzorka DNA. Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti umnažanja gena HLA metodom PCR-SSO

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	95 °C	3 min	1
2	95 °C	15 sec	12
	60 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	
3	95 °C	10 sec	28
	63 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	
4	72 °C	2 min	1
5	4 °C	$\infty$	1

Nakon umnažanja slijedi hibridizacija produkata PCR-a sa specifičnim oligonukleotidnim sondama označenim biotinom, a koje su vezane na površini mikrosfera (polistirenske kuglice veličine 5,6 mikrona) ispunjenih crvenim i infracrvenim fluorokromom (slika 26).



Slika 26. Shematski prikaz metode PCR-SSO korištenjem uređaja Luminex. A) prikaz mikrosfera (kuglica); B) prikaz postupaka metode PCR-SSO po koracima; C) prikaz očitavanja u uređaju Luminex

Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosi 20 μl (5 μl produkta PCR-a i 15 μl otopine mikrosfera). Hibridizacija se odvija 20 minuta, a odmah po završetku, hibridizacijskoj reakciji dodaje se 170 μl pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje (170 μl pufera za razrjeđenje i 0,85 μl streptavidina, SA-PE (R-fikoeritrin konjugirani streptavidin) po uzorku). Streptavidin se veže na biotinizirane dijelove DNA koji su nakon hibridizacije specifično vezani s probama na određenim mikrosferama. Uređaj Luminex očitava fluorescenciju pomoću dva lasera i razlikuje kombinaciju proba s pozitivnim signalom na osnovu njihove vezanosti s mikrosferama te izračunava relativnu količinu amplikona koji je hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom. Testovi se izvode u pločicama s 96 bazenčića [80].

Analiza pozitivnih i negativnih rezultata hibridizacije i samo određivanje genskih skupina HLA provodi se analitičkim programom MatchIT (Immucor, Stamford, USA) (slika 28). Izračunavanjem vrijednosti očitane fluorescencije za svaku mikrosferu, prisutnost genske skupine/alela HLA očitava se kao pozitivna mikrosfera, odnosno negativna mikrosfera ako genska skupina/alel HLA nije prisutan.

Iako se temeljno smatra metodom tipizacije NR, metoda PCR-SSO, u određenim slučajevima omogućava i interpretaciju rezultata na razini srednjeg razlučivanja te u rijetkim slučajevima i tipizaciju VR.

Tipizacijom NR smatra se svaka analiza koja kao mogući rezultat daje dva ili više čestih alela (slika 27a), tipizacijom srednjeg razlučivanja svaka analiza koja kao mogući rezultat daje jedan česti alel i dva ili više rijetkih alela (slika 27b), dok se tipizacijom visokog razlučivanja smatra svaka analiza koja je kao mogući rezultat dala jednoznačan rezultat (slika 27c).

a)

Locus	Batch Name	Lot No	Expiration Date	IMGT
<b>HLA-DRB1 AG1</b>	08052020 DRB3007228 /240420012	3007557 3007228-DRB1	10.15.20	3.35
DRB1*11:01:01:01/11:01:01:02/11:01:01:03/11:01:01:04/11:01:02/11:01:04/11:01:05/11:01:06/11:01:08/11:01:12/11:01:13/11:01:14/11:01:15/11:01:16/11:01:17/11:01:19/11:01:20/11:01:21/11:01:22/11:01:23/11:01:24/11:01:26/11:01:28/11:01:29/11:01:30/11:01:31/11:01:32/11:01:33/11:03:01/11:03:02/11:03:03/11:03:04/11:04:01/11:04:02/11:04:03/11:04:04/11:04:05/11:04:06/11:04:08/11:04:09/11:04:10/11:04:11/11:04:12/11:04:15/11:04:16/11:04:17/11:04:18/11:11:01/11:11:03/11:24:01/11:24:02/11:27:02/11:27:03/11:29:01/11:30/11:39/11:43/11:44/11:49:01/11:49:02/11:55/11:60/11:61/11:63:01/11:66:01/11:66:02/11:75/11:76/11:77/11:78/11:81/11:84:02/11:84:03/11:85/11:90/11:94/11:95/11:97/11:99/11:100/11:102:01/11:102:02/11:104/11:106/11:108/11:109/11:111/11:112/11:114/11:117:01/11:117:02/11:121/11:126/11:133/11:137/11:139/11:140/11:141/11:144/11:146/11:147:01/11:147:02/11:151/11:152/11:154/11:155/11:157/11:158/11:160/11:161/11:162/11:163/11:165:01/11:166/11:168/11:169N/11:172/11:175/11:176/11:177/11:178/11:180/11:181/11:187/11:188/11:195/11:196/11:197/11:198/11:201/11:204/11:205/11:206/11:207/11:208/11:210/11:211/11:212/11:214/11:215/11:217N/11:219/11:220/11:221/11:222/11:223/11:224/11:225/11:227/11:228/11:230/11:231/11:232/11:234/11:235/11:236/11:237/11:238/11:239/11:240/11:243/11:244/11:246N/11:247/11:250N/11:252/11:253/11:254				

b)

Locus	Batch Name	Lot No	Expiration Date	IMGT
<b>HLA-DRB1 AG2</b>	08052020 DRB3007228 /290420768	3007557 3007228-DRB1	10.15.20	3.35
DRB1*16:01:01/16:01:06/16:01:08/16:01:09/16:01:10/16:01:13/16:01:15/16:09:01/16:13N/16:28/16:44/16:49/16:51				

c)

Locus	Batch Name	Lot No	Expiration Date	IMGT
<b>HLA-DRB1 AG2</b>	08052020 DRB3007228 /060520574	3007557 3007228-DRB1	10.15.20	3.35
DRB1*13:05:01				

Slika 27. Prikaz rezultata tipizacije HLA u programu „MATCH IT! DNA“. a) primjer tipizacije niskog razlučivanja – NR; b) primjer tipizacije srednjeg razlučivanja - SR; c) primjer tipizacije visokog razlučivanja – VR; žuto označeni česti aleli prema bazi IPD-IMGT/HLA

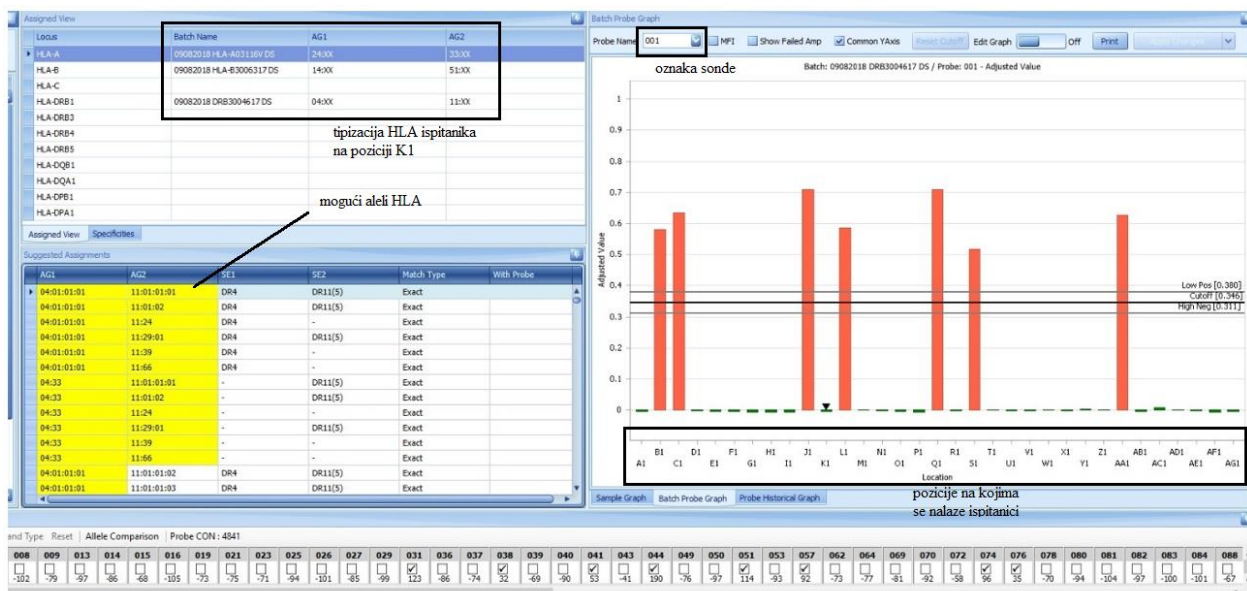
Unutar svake genske skupine nasumično su odabrane skupine ispitanika koji su dodatno testirani na visokoj rezoluciji, a ovisno o njoj učestalosti u populaciji. Tako je npr. tipizacija VR provedena za četiri puta veći broj ispitanika s tipizacijom NR HLA-A\*02 u odnosu na broj ispitanika s tipizacijom NR HLA-A\*30 odražavajući razliku u učestalosti navedenih dviju skupina u populaciji.

Interpretacija tako provedenih dodatnih testiranja temeljila se na sljedećoj pretpostavci: ukoliko je rezultat tipizacije VR identičan za sve ispitivane osobe, tada i svi ostali netestirani ispitanici s identičnim rezultatom tipizacije NR, imaju tipizaciju VR kao i testirani ispitanici.

Iznimka su bile kombinacije alela HLA-B\*44:02/27 te HLA-DRB1\*14:01/54 koji se u našoj populaciji nalaze s podjednakom učestalošću, a za koje nije bilo moguće odrediti alel na

visokoj rezoluciji bez dodatnih testiranja pa su te osobe prijavljene kao HLA-B\*44:02:01G ili HLA-DRB1\*14:01:01G.

Svi ispitanici s alelom HLA koji se pojavio najviše tri puta (npr. HLA-A\*31:08, -DRB1\*14:02) ponovno su testirani na visokoj rezoluciji, kao i svi oni koji su u testiranju metodom PCR-SSO pokazali jednoznačan rezultat (npr. HLA-A\*66:02, -DRB1\*04:07). Svim retestiranim uzorcima rezultat tipizacije dobiven metodom PCR-SSO potvrđen je nekom od metoda visoke rezolucije. Za analizu rezultata korištene su baze alela IPD-IMGT/HLA 3.25 - 3.31 [3].



Slika 28. Prikaz analize rezultata gena HLA u programu „MATCH IT! DNA“. Sonda 001 na uzorku K1 je negativna tj. nije došlo do hibridizacije, dok je na uzorku L1 pozitivna. Na lijevoj strani je rezultat tipizacije za osobu K1. Žuto označeni česti aleli prema bazi IPD-IMGT/HLA

### 3.2.2.2. Metoda lančane reakcije polimerazom i početnicama sa sekvencama specifičnim za alele HLA

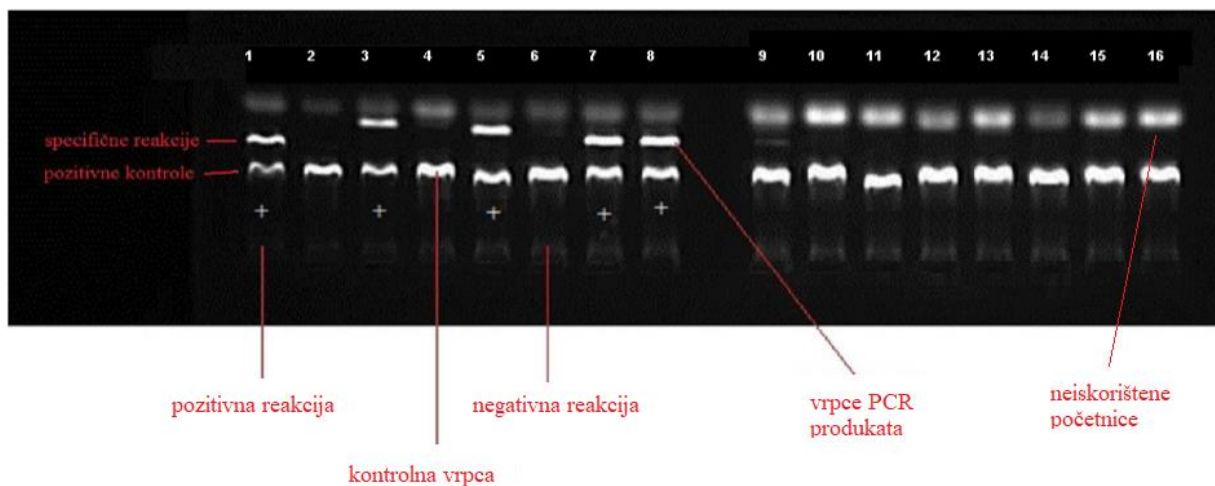
Temelj metode PCR-SSP su specifične početnice (engl. Primers) koje imaju sekvence komplementarnog slijeda onom koji odgovara sekvenci određenog alela HLA. Tipizacijski set PCR-SSP sastoji se od određenog broja reakcija za svaki pojedini lokus HLA. Tipizacijom HLA metodom PCR-SSP moguće je također dobiti rezultat na NR, SR ili VR. U ovom radu korišteni su komercijalni testovi OlerupSSP™ (West Chester, PA, SAD). Svaka reakcija zasebno testira prisustvo jednog alela ili gensku skupinu HLA, a u svakoj reakciji prisutna su dva seta početnica: prvi set (5' i 3') umnaža kontrolni gen koji nam služi za potvrdu da smo u reakciju

stavili sve potrebne sastojke, a drugi set početnica (5' i 3') umnaža gensku skupinu/alel HLA za koji su te početnice specifične. Jednu reakciju čini 5 µl vode bez nukleaza, 3 µl komercijalnog pufera koji sadrži smjesu deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) i termostabilnu polimerazu Taq te 2 µl genomske DNA koncentracije 20-100 µg/ml. Uvjeti umnažanja u automatskom uređaju za umnažanje prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti umnažanja alela HLA metodom PCR-SSP

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	94 °C	2 min	1
2	94 °C	10 sec	10
	65 °C	60 sec	
3	94 °C	10 sec	20
	61 °C	50 sec	
	72 °C	30 sec	
4	4 °C	∞	1

Provjera i očitavanje umnoženih produkata PCR-a izvodi se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenom bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) koristeći pufer 1xTBE. Nakon elektroforeze gel se fotografira pomoću kamere s tamnom komorom UV G:BOX (Syngene, Cambridge, UK). Prema veličini specifičnih produkata PCR, reakcija na gelu se označava kao pozitivna gdje je produkt PCR prisutan ili negativna gdje je produkt odsutan. Pozitivna reakcija na gelu mora sadržavati internu kontrolnu vrpcu i vrpcu specifičnog produkta PCR (slika 29). Dobiveni rezultati se potom analiziraju uz pomoć programa: Helmborg Score™, verzija 5.00.80 T [81].



Slika 29. Slika agaroznog gela s rezultatima reakcija umnažanja gena HLA. U jažicama broj 1, 3, 5, 7 i 8 prisutne su pozitivne/specifične reakcije

### 3.2.2.3. Metoda sekvenciranja po Sangeru

Metoda sekvenciranja po Sangeru (engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Based Typing, PCR-SBT) koristi početnice specifične za umnažanje ciljne regije alela HLA. U ovom istraživanju korišteni su komercijalni testovi Olerup SBT (Conexio Genomics, Australija). Svaka reakcija PCR zasebno umnaža pojedini lokus HLA, a u svakoj reakciji sadržano je 17  $\mu$ l komercijalnog pufera s početnicama (5' i 3') i smjesom deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1  $\mu$ l termostabilne polimeraze Taq i 2  $\mu$ l genomska DNA koncentracije 20-100  $\mu$ g/ml. Uvjeti umnažanja u automatskom uređaju za umnažanje prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Uvjeti umnažanja gena HLA metodom PCR-SBT

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	95°C	10 min	1
2	96°C	20 sec	33
	60°C	30 sec	
3	72°C	3 min	1
	15°C	$\infty$	

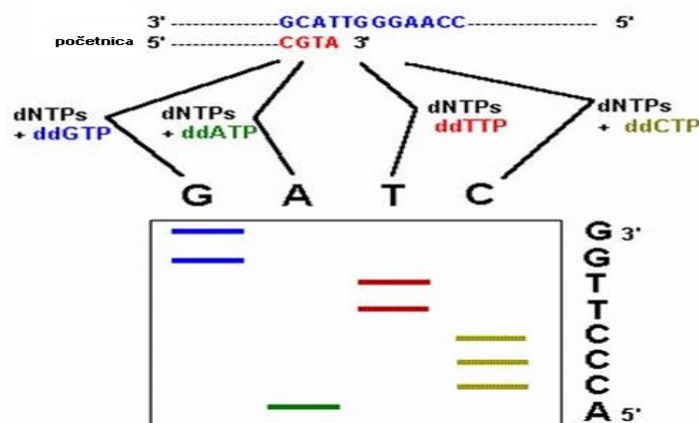
Nakon umnažanja elektroforezom na 1% agaroznom gelu provjerava se uspješnost umnažanja, zatim slijedi pročišćavanje umnoženog produkta s mješavinom od 4  $\mu$ l enzima

ExoSAP-IT i 8µl magnezijeva klorida (MgCl<sub>2</sub>) koji uklanjaju suvišne početnice zaostale u reakcijama umnažanja.

U reakcijama sekvenciranja koriste se specifično umnoženi sljedovi DNA, dNTP-i, fluorescentno obilježeni 2,3 dideoksinukleotid trifosfati (ddNTP) i polimeraza Taq. S obzirom da polimeraza Taq ne razlikuje ddNTP-ove od dNTP-ova, ddNTP-ovi se ugrađuju u rastući lanac molekule DNA i s obzirom da im nedostaje 3' hidroksilna skupina onemogućeno je stvaranje sljedeće fosfodiestrске veze (slika 30). Uvjeti reakcija sekvenciranja u automatskom uređaju za umnažanje prikazani su u tablici 9.

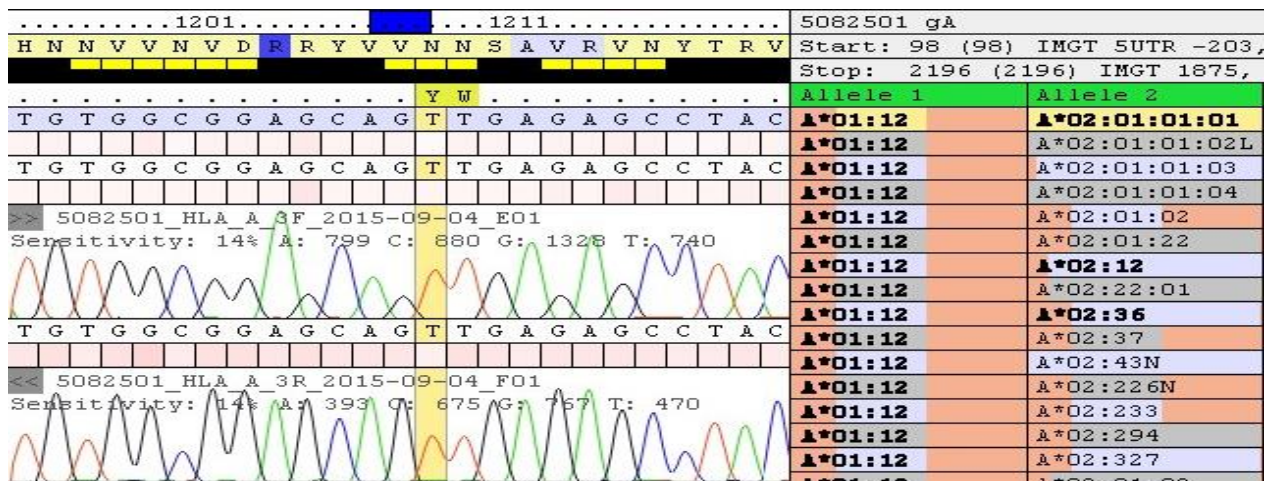
Tablica 9. Uvjeti reakcija sekvenciranja gena HLA metodom PCR-SBT

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	96°C	10 sec	25
	50°C	5 sec	
	60°C	2 min	
2	4 °C	∞	1



Slika 30. Shematski prikaz metode PCR-SBT po Sangeru

Očitavanje rezultata odvija se elektroforezom na uređaju za kapilarnu elektroforezu 3130xl Genetic Analyzer, (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) sa šesnaest kapilara unutar kojih se nalazi polimer POP7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) za razdvajanje sekvence DNA.



Slika 31. Analiza rezultata sekvenciranja u programu Assign™, verzija 3.6 (Conexio Genomics, Australija)

Dobiveni rezultati analiziraju se pomoću programa Assign™, verzija 3.6 (Conexio Genomics, Fremantle, Australija) koristeći baze IPD-IMGT/HLA 3.29, 3.31. i 3.33 (slika 31) [2].

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Učestalost alela HLA određivana je zasebno unutar svake skupine (nesrodni dobrovoljni davatelji iz RDDKMS-a te bolesnici u programu TKMS i njihovi davatelji). Broj pojedinog alela bio je podijeljen s ukupnim brojem alela HLA unutar analizirane skupine (ukupni broj alela u skupini dvostruko je veći od broja ispitanika – dva alela po ispitaniku) kako bi se dobila učestalost pojedinog alela HLA. Ukoliko je ispitanik bio homozigot za određeni alel HLA, računalo se kao da se alel pojavio dvaput. Učestalosti alela HLA unutar skupine bolesnika i nesrodnih dobrovoljnih davatelja uspoređene su 2x2 kontingencijskom tablicom primjenom Fisherovog egzaktnog testa (GraphPad software, QuickCalcs, www.graphpad.com). Prihvaćena razina statističke značajnosti je  $p \leq 0,05$ . Očekivana učestalost ( $GF_i$ ) gena HLA u populaciji određena je prema Bernstein formuli koja se temelji na Hardy-Weinberg ravnoteži [82]:

$$GF_i = 1 - \sqrt{1 - CF_i}$$

$GF_i$  = očekivana učestalost gena

$CF_i$  = opažena učestalost gena



Uočena i očekivana heterozigotnost za pojedini lokus HLA izračunata je pomoću statističkog programa MolKin v3.0 [83] te je procjenjivano odstupanje uočene i očekivane heterozigotnosti za svaki lokus. Učestalost haplotipova HLA unutar skupine nesrodni dobrovoljni davatelji iz RDDKMS-a dobivena je pomoću statističkog programa za analizu Python for Population Genomics (PyPop) [84] kao i vrijednosti neravnoteže udruživanja gena HLA u haplotipovima s dva lokusa. Za višelokusne haplotipove vrijednosti LD-a računane su prema formuli Imanishia [85]:

$$LD = HF (A_i B_j C_k \dots) - a_i b_j c_k$$

HF – uočena frekvencija haplotipa

$a_i b_j$  – uočena frekvencija svakog pojedinog alela u haplotipu

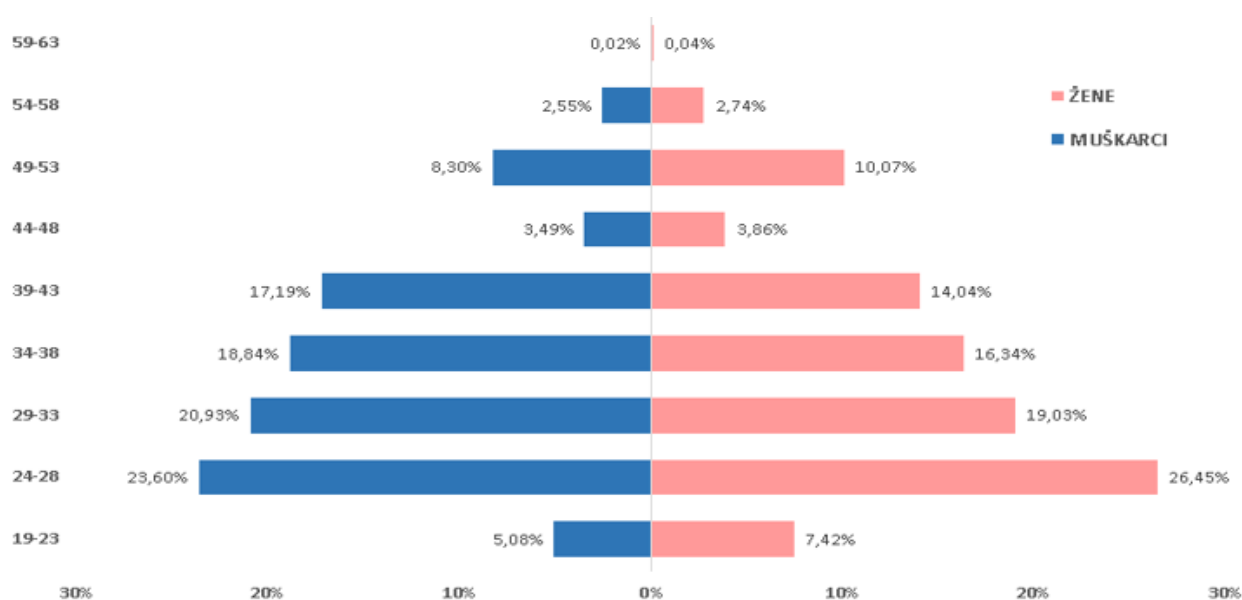
U skupini bolesnika koji su transplantirani s nesrodnim davateljem, haplotipovi su određeni nasljeđivanjem, odnosno dedukcijom jer su im testirani i članovi obitelji (roditelji, sestre, braća). Broj haplotipova utvrđen je izravnim brojanjem. Broj nepodudarnosti HLA između bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja također je određena direktnim brojanjem. Podatci o učestalosti haplotipova uspoređivani su s populacijama europskog porijekla pomoću programa HaploStats [86].

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. RAZNOVRSNOST I RASPODJELA GENSKIH SKUPINA, ALELA I HAPLOTIPOVA HLA U HRVATSKOJ POPULACIJI

Analiza učestalosti alela i haplotipova HLA provedena je na reprezentativnom uzorku hrvatske populacije koji je činilo 10 000 zdravih, nesrodnih dobrovoljnih davatelja iz RDDKMS-a tipiziranih za alele lokusa HLA-A, -B, -C i -DRB1. U uzorku je bilo 5648 žena i 4352 muškarca u dobi od 19 do 63 godine, a najveći broj davatelja bio je između 24. i 43. godine života (tablica 10).

Tablica 10. Raspodjela davatelja u RDDKMS-u prema spolu i dobi (N=10 000)



##### 4.1.1. Raspodjela genskih skupina HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji

Ovo populacijsko istraživanje započeto je analizom genskih skupina istraživanih lokusa HLA u uzorku od 10 000 ispitanika. Na lokusu HLA-A ukupno je uočeno 19 različitih genskih skupina, 29 na lokusu HLA-B, 14 na lokusu HLA-C, dok je lokus HLA-DRB1 pokazao najmanji polimorfizam s 13 različitih genskih skupina (tablica 11). HLA-A\*02 s učestalošću većom od 30%, bila je najčešća genska skupina lokusa HLA-A, na lokusu HLA-B najčešće je bila prisutna genska skupina HLA-B\*35 (13,4%), a na lokusu HLA-C najveću učestalost imala je genska skupina HLA -C\*07 (25,7%). Genska skupina HLA-DRB1\*11 bila je najzastupljenija skupina ovog lokusa s učestalošću 17,4%.

Tablica 11. Raspodjela genskih skupina HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
01	13,18	07	7,31	01	4,83	01	10,92
02	30,26	08	8,06	02	9,19	03	10,61
03	11,48	13	3,38	03	7,52	04	9,34
11	7,21	14	2,71	04	14,87	07	8,96
23	2,30	15	4,88	05	4,11	08	3,37
24	11,79	18	8,67	06	8,59	09	0,24
25	2,87	27	6,30	07	25,65	10	0,96
26	4,98	35	13,42	08	2,83	11	17,42
29	0,75	37	0,91	12	13,54	12	1,56
30	1,69	38	4,66	14	2,41	13	11,84
31	2,16	39	2,96	15	3,86	14	3,89
32	4,29	40	3,85	16	1,71	15	10,19
33	2,06	41	1,02	17	0,88	16	10,74
34	0,02	44	9,73	18	0,05		
66	0,40	45	0,18				
68	4,46	46	0,01				
69	0,07	47	0,14				
74	0,01	48	0,16				
80	0,07	49	1,74				
		50	1,26				
		51	10,63				
		52	1,45				
		53	0,40				
		54	0,03				
		55	1,35				
		56	1,11				
		57	2,54				
		58	1,16				
		73	0,05				

*f* – učestalost genskih skupina HLA

#### 4.1.2. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji

Na lokusu HLA-A uočeno je ukupno 49 različita alela, na lokusu HLA-B 92 alela, na lokusu HLA-C 36 različitih alela, dok je na lokusu HLA-DRB1 otkriveno 56 alela.

Za potrebe ovog istraživanja, aleli HLA podijeljeni su, s obzirom na učestalosti, u četiri skupine:

- vrlo česti aleli HLA - aleli uočeni  $\geq 200$  puta (učestalost:  $\geq 1\%$ )
- česti aleli HLA - aleli uočeni 5 do 200 puta (učestalost: 0,02-1%)
- rijetki aleli HLA - aleli uočeni dva do pet puta (učestalost: 0,01-0,02%)
- vrlo rijetki aleli HLA - aleli koji su u ispitivanom uzorku uočeni samo jednom (učestalost:  $\leq 0,01\%$ ).

Usporedba uočenog i očekivanog broja homozigota, odnosno heterozigota, na analiziranim lokusima HLA nije pokazala statistički značajne razlike (tablica 12).

Tablica 12. Uočena i očekivana homozigotnost i heterozigotnost na lokusima HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-A	n	n*	p
Homozigoti	1416	1406,93	0,7402
Heterozigoti	8584	8593,07	0,8926
HLA-B	n	n*	p
Homozigoti	484	506,76	0,7258
Heterozigoti	9516	9493,24	0,6804
HLA-C	n	n*	p
Homozigoti	872	930,24	0,5404
Heterozigoti	9128	9069,76	0,8436
HLA-DRB1	n	n*	p
Homozigoti	739	697,32	0,8069
Heterozigoti	9261	9302,68	0,9469

*n* - broj uočenih ispitanika, *n\** - broj očekivanih ispitanika, *p* – statistička značajnost usporedbe uočene i očekivane homozigotnosti i heterozigotnosti

Na lokusu HLA-A, u skupini od 13 vrlo čestih alela, najčešći je bio alel HLA-A\*02:01 kojeg je imalo 29,1% ispitanika. Još su tri alela (HLA-A\*01:01, -A\*24:02 i -A\*03:01) pokazala zastupljenost veću od 10% dok su svi ostali aleli bili zastupljeni manje od 10%. Na lokusu HLA- B jedino je alel HLA-B\*51:01 bio prisutan u više od 10% ispitanika, dok je preostalih

25 alela iz skupine vrlo čestih alela lokusa HLA-B, imalo učestalost manju od 10%. Petnaest alela lokusa HLA-C pripada skupini vrlo čestih alela, a najčešći je bio alel HLA-C\*07:01 (15,8%). Slijedili su ga još aleli HLA-C\*04:01 i HLA-C\*12:03 s učestalošću višom od 10%. Alel HLA-DRB1\*03:01 bio je najzastupljeniji alel na lokusu HLA-DRB1 s frekvencijom od 10,6%, a zastupljenost veću od 10% dostigao je još samo alel HLA-DRB1\*16:01 (tablica 13).

U skupini čestih alela prikazanih u tablici 14, na lokusu HLA-A najčešći je bio HLA-A\*02:05 s učestalošću 0,8%, a slijedili su aleli HLA-A\*03:02 i -A\*29:02 s učestalostima 0,5%. Svi preostali aleli lokusa HLA-A unutar ove skupine bili su zastupljeni s učestalošću manjom od 0,5%. Na lokusu HLA-B, alel HLA-B\*37:01 bio je najzastupljeniji (0,9%), a učestalost veću od 0,5% imala su još tri alela (HLA-B\*35:08, -B\*41:02 i -B\*14:01). Dvanaest alela lokusa HLA-C tvorilo je skupinu čestih alela s učestalostima od 0,04% do 0,7%. Unutar skupine čestih alela na lokusu HLA-DRB1 najčešći je bio alel HLA-DRB1\*13:03 (1,0%), a još su tri alela (HLA-DRB1\*11:03, -DRB1\*10:01 i -DRB1\*16:02) pokazala zastupljenost veću od 0,5%.

Tablica 13. Raspodjela vrlo čestih\* alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000). \*aleli uočeni  $\geq 200$  puta

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
02:01	29,11	51:01	10,47	07:01	15,76	03:01	10,60
01:01	13,13	18:01	8,61	04:01	14,87	16:01	10,04
24:02	11,46	08:01	8,05	12:03	12,06	01:01	9,64
03:01	10,95	07:02	7,06	02:02	9,18	07:01	8,96
11:01	7,21	35:01	6,20	06:02	8,58	15:01	8,75
26:01	4,94	44:02:01G <sup>a</sup>	5,90	07:02	7,59	11:04	8,02
32:01	4,28	35:03	5,06	01:02	4,83	11:01	7,98
68:01	4,05	38:01	4,65	05:01	4,10	13:01	6,31
25:01	2,87	15:01	4,05	03:03	3,92	13:02	4,20
23:01	2,30	27:05	3,99	15:02	3,68	14:01:01G <sup>b</sup>	3,75
31:01	2,15	13:02	3,38	03:04	2,92	04:01	2,86
33:01	1,94	44:03	2,64	08:02	2,67	08:01	2,77
30:01	1,09	57:01	2,43	14:02	2,40	04:02	2,36
		39:01	2,33	07:04	2,28	04:04	1,84
		27:02	2,22	12:02	1,48	12:01	1,53
		14:02	2,20			15:02	1,32
		40:02	2,12			04:03	1,26
		49:01	1,74			01:02	1,12
		40:01	1,63				
		52:01	1,45				
		55:01	1,34				
		35:02	1,27				
		50:01	1,26				
		58:01	1,16				
		44:05	1,14				
		56:01	1,11				

*f* - učestalost alela HLA; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Tablica 14. Raspodjela čestih\* alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000).  
\*aleli uočeni 5-200 puta

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
02:05	0,80	37:01	0,90	03:02	0,69	13:03	0,99
03:02	0,53	35:08	0,88	16:02	0,69	11:03	0,97
29:02	0,53	41:02	0,57	16:01	0,67	10:01	0,96
68:02	0,39	14:01	0,51	17:03	0,54	16:02	0,71
66:01	0,38	41:01	0,46	16:04	0,36	04:07	0,37
30:04	0,35	15:17	0,41	17:01	0,35	08:04	0,34
24:03	0,32	53:01	0,39	08:03	0,10	04:05	0,31
30:02	0,26	39:06	0,38	15:06	0,08	13:05	0,31
29:01	0,22	07:05	0,19	08:01	0,06	04:08	0,30
02:06	0,15	45:01	0,18	15:04	0,06	09:01	0,24
02:02	0,13	48:01	0,16	18:02	0,05	11:02	0,18
33:03	0,12	39:31	0,15	15:05	0,04	01:03	0,15
69:01	0,07	47:01	0,14			08:02	0,15
80:01	0,07	15:18	0,13			11:12	0,14
02:17	0,05	51:08	0,09			15:03	0,12
26:08	0,04	40:06	0,08			08:03	0,11
66:02	0,03	15:03	0,07			14:04	0,10
		15:10	0,07			11:06	0,05
		57:03	0,07			04:15	0,04
		51:07	0,06			11:11	0,04
		15:08	0,05			04:06	0,03
		57:02	0,05			11:28	0,03
		73:01	0,05			14:05	0,03
		07:04	0,04				
		15:09	0,04				
		18:03	0,04				
		27:14	0,04				
		44:21	0,04				
		15:24	0,03				
		39:03	0,03				
		54:01	0,03				

*f* - učestalost alela HLA



Osam rijetkih alela otkriveno je na lokusu HLA-A, osamnaest na lokusu HLA-B, četiri na lokusu HLA-C te sedam na lokusu HLA-DRB1 (tablica 15). U genskoj skupini HLA-A\*02 otkrivena su tri rijetka alela (HLA-A\*02:11, -A\*02:22 i -A\*02:35). Na lokusu HLA-B tri različita rijetka alela otkrivena su u genskim skupinama HLA-B\*15 (HLA-B\*15:07, -B\*15:23 i -B\*15:39) i -B\*27 (HLA-B\*27:07, -B\*27:09 i B\*27:30) te čak četiri različita alela u genskoj skupini HLA-B\*39 (HLA-B\*39:04, -B\*39:05, -B\*39:10 i -B\*39:24).

Tablica 15. Raspodjela rijetkih\* alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000). \*aleli uočeni 2-5 puta

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
01:02	0,020	07:10	0,020	07:07	0,015	11:15	0,020
01:03	0,020	15:07	0,020	15:09	0,015	11:58	0,020
02:35	0,015	39:05	0,020	02:05	0,010	12:02	0,020
34:02	0,015	39:10	0,020	05:08	0,010	13:15	0,020
68:23	0,015	39:24	0,020			14:07	0,015
02:11	0,010	40:03	0,020			13:32	0,010
02:22	0,010	18:05	0,015			15:07	0,010
74:01	0,010	27:09	0,015				
		27:30	0,015				
		35:04	0,015				
		51:05	0,015				
		15:23	0,010				
		15:39	0,010				
		27:07	0,010				
		37:09	0,010				
		39:04	0,010				
		44:06	0,010				
		53:05	0,010				

*f* - učestalost alela HLA

Ukupan broj vrlo rijetkih alela uočenih u ispitivanom uzorku bio je 36, što je 15,5% od ukupnog broja uočenih alela testiranih lokusa. Najviše ih je bilo na lokusu HLA-B (N=15), zatim 11 na lokusu HLA-A dok je na lokusima HLA-C i -DRB1 po jednom bilo uočeno pet

alela (tablica 16). Dva alela, HLA-A\*01:200 i -B\*18:37:02, su novootkriveni aleli HLA koji su u našem uzorku uočeni prvi put i prijavljeni u bazu IPD-IMGT/HLA.

Tablica 16. Lista vrlo rijetkih alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 uočenih u hrvatskoj populaciji (N=10 000). Aleli su razvrstani prema statusu u bazi IPD-IMGT/HLA; zeleno– česti aleli; žuto– dobro opisani aleli; crveno– ne definirani, rijetki aleli; plavo - novootkriveni aleli [3]

HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*
02:03	15:16		14:02
24:07	27:03		
24:25	39:15		
	44:04		
	46:01		
	51:09		
	55:02		

HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*
31:08	08:04	07:17	03:05
31:12	13:10	12:05	03:06
32:04	27:12		
68:06	44:29		
	51:03		

HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*
01:08	07:02:03	03:13	01:31
23:02	38:08	06:32	12:39
24:41		14:25	

HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*
01:200	18:37:02		

#### 4.1.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji

Sljedeći cilj ovog istraživanja bio je analizirati haplotipove HLA-A~B, HLA-B~C i HLA-B~DRB1. Analiza raspodjele haplotipova HLA-A~B pokazala je ukupno 781 haplotip, a pedeset najčešćih prikazano je u tablici 17. Preostali uočeni haplotipovi HLA-A~B prikazani su u dodatku, tablica S1. Najčešći haplotip bio je HLA-A\*01:01~B\*08:01 (6,23%), a još samo četiri haplotipa imala su učestalost veću od 2,0%. To su haplotipovi HLA-A\*02:01~B\*51:01 (4,59%), HLA-A\*02:01~B\*18:01 (3,06%), HLA-A\*03:01~B\*07:02 (2,92%) i HLA-A\*02:01~B\*44:02:01G (2,81%). Vrijednost LD-a bila je pozitivna za 38 haplotipova HLA-A~B prikazanih u tablici 17, a među njima najjači LD imao je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01. Međutim, za pet haplotipova (HLA-A\*03:01~B\*35:01, HLA-A\*02:01~B\*27:02, HLA-A\*03:01~B\*35:03, HLA-A\*24:02~B\*13:02 i HLA-A\*32:01~B\*35:01) vrijednost LD-a nije bila statistički značajna. Preostalih dvanaest haplotipova imalo je statistički značajnu negativnu vrijednost LD-a.

Tablica 17. Raspodjela 50 najčešćih haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-A*~B*	f(%)	LD	p	HLA-A*~B*	f(%)	LD	p
01:01~08:01	6,234	0,05178	<0,0001	01:01~57:01	0,819	0,00500	0,0002
02:01~51:01	4,586	0,01540	<0,0001	03:01~18:01	0,805	-0,00138	<0,0001
02:01~18:01	3,055	0,00549	<0,0001	11:01~51:01	0,804	0,00049	<0,0001
03:01~07:02	2,915	0,02143	<0,0001	03:01~51:01	0,739	-0,00407	<0,0001
02:01~44:02:01G <sup>a</sup>	2,810	0,01324	0,0321	02:01~40:01	0,723	0,00249	<0,0001
02:01~15:01	1,963	0,00784	<0,0001	68:01~51:01	0,722	0,00298	0,0215
11:01~35:01	1,864	0,01417	<0,0001	30:01~13:02	0,689	0,00652	<0,0001
02:01~27:05	1,772	0,00612	<0,0001	24:02~13:02	0,674	0,00287	0,0644
26:01~38:01	1,720	0,01490	<0,0001	32:01~40:02	0,664	0,00573	<0,0001
24:02~51:01	1,476	0,00276	<0,0001	24:02~44:02:01G <sup>a</sup>	0,636	0,00051	<0,0001
25:01~18:01	1,474	0,01227	<0,0001	11:01~18:01	0,632	0,00011	<0,0001
03:01~35:01	1,435	0,00757	0,2553	24:02~15:01	0,631	0,00166	<0,0001
02:01~27:02	1,385	0,00738	0,0688	24:02~35:01	0,630	-0,00080	<0,0001
33:01~14:02	1,362	0,01319	<0,0001	02:01~39:01	0,617	-0,00062	<0,0001
02:01~38:01	1,266	-0,00088	<0,0001	02:01~08:01	0,563	-0,01780	<0,0001
23:01~44:03	1,233	0,01173	<0,0001	24:02~35:03	0,543	-0,00037	<0,0001
02:01~07:02	1,210	-0,00844	<0,0001	24:02~35:02	0,539	0,00393	<0,0001
02:01~13:02	1,187	0,00204	<0,0001	26:01~51:01	0,534	0,00017	<0,0001
02:01~35:03	1,181	-0,00292	<0,0001	11:01~52:01	0,533	0,00428	<0,0001
24:02~07:02	1,042	0,00233	<0,0001	01:01~37:01	0,519	0,00401	<0,0001
03:01~35:03	1,032	0,00478	0,2142	32:01~51:01	0,513	0,00065	<0,0001
24:02~18:01	0,978	-0,00009	<0,0001	02:01~44:05	0,505	0,00174	<0,0001
02:01~57:01	0,934	0,00228	<0,0001	32:01~35:01	0,496	0,00231	0,4807
02:01~35:01	0,918	-0,00885	<0,0001	02:01~40:02	0,491	-0,00126	<0,0001
68:01~35:03	0,852	0,00647	<0,0001	24:02~27:05	0,471	0,00014	<0,0001

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); crveno osjenčano - nije statistički značajno; zeleno osjenčano - negativna vrijednost LD-a

#### **4.1.4. Raspodjela haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji**

Pedeset najčešćih, od ukupno 365 uočenih, haplotipova HLA-B~C prikazani su u tablici 18, dok su oni s manjom učestalošću prikazani u dodatku, u tablici S2. Četiri haplotipa pokazala su učestalost veću od 5,0% (HLA-B\*08:01~C\*07:01, HLA-B\*07:02~C\*07:02, HLA-B\*35:01~C\*04:01 i HLA-B\*18:01~C\*07:01).. Unutar skupine 50 najčešćih haplotipova HLA-B~C, 44 haplotipa imala su pozitivnu vrijednost LD-a, a samo šest haplotipova pokazalo je negativnu vrijednost LD-a. Najjači LD imao je haplotip HLA-B\*08:01~C\*07:01. Među prikazanim haplotipovima HLA-B~C svi su imali statistički značajnu vrijednost LD-a bez obzira radi li se o pozitivnoj ili negativnoj neravnoteži udruživanja.

Provedena je i analiza raspodjele haplotipova HLA-B~C za sve alele genskih skupina HLA-B za koje je učestalost u populaciji bila  $\geq 3\%$ .

Tablica 18. Raspodjela 50 najčešćih haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-B*~C*	f (%)	LD	p	HLA-B*~C*	f (%)	LD	p
08:01~07:01	7,617	0,06349	<0,0001	55:01~03:03	1,151	0,01099	<0,0001
07:02~07:02	6,549	0,06014	<0,0001	56:01~01:02	1,105	0,01052	<0,0001
35:01~04:01	5,862	0,04941	<0,0001	35:02~04:01	1,033	0,00844	<0,0001
18:01~07:01	5,003	0,03646	<0,0001	15:01~03:04	0,996	0,00878	<0,0001
38:01~12:03	4,570	0,04010	<0,0001	27:05~01:02	0,975	0,00783	<0,0001
35:03~04:01	4,011	0,03259	<0,0001	44:05~02:02	0,975	0,00870	<0,0001
13:02~06:02	3,273	0,02984	<0,0001	35:03~12:03	0,956	0,00346	<0,0001
51:01~15:02	3,204	0,02819	<0,0001	37:01~06:02	0,872	0,00795	<0,0001
44:02:01G~05:01 <sup>a</sup>	3,188	0,02613	<0,0001	51:01~02:02	0,800	-0,00160	<0,0001
18:01~12:03	3,055	0,02017	<0,0001	35:08~04:01	0,687	0,00556	<0,0001
27:05~02:02	2,854	0,02488	<0,0001	58:01~03:02	0,655	0,00647	<0,0001
51:01~14:02	2,307	0,02055	<0,0001	44:03~16:01	0,585	0,00568	<0,0001
57:01~06:02	2,299	0,02091	<0,0001	51:01~12:03	0,542	-0,00720	<0,0001
15:01~03:03	2,259	0,02101	<0,0001	15:01~04:01	0,524	-0,00078	<0,0001
14:02~08:02	2,180	0,02122	<0,0001	41:02~17:03	0,520	0,00517	<0,0001
51:01~01:02	2,140	0,01635	<0,0001	58:01~07:01	0,467	0,00285	<0,0001
39:01~12:03	2,068	0,01787	<0,0001	14:01~08:02	0,455	0,00442	<0,0001
27:02~02:02	2,068	0,01864	<0,0001	51:01~16:02	0,452	0,00380	0,0051
40:02~02:02	1,898	0,01704	<0,0001	15:17~07:01	0,375	0,00311	<0,0001
44:03~04:01	1,861	0,01469	<0,0001	08:01~07:02	0,371	-0,00240	<0,0001
44:02:01G~07:04 <sup>a</sup>	1,690	0,01573	<0,0001	41:01~17:01	0,345	0,00343	<0,0001
49:01~07:01	1,632	0,01358	<0,0001	53:01~04:01	0,340	0,00282	<0,0001
40:01~03:04	1,588	0,01541	<0,0001	07:02~12:03	0,313	-0,00537	<0,0001
52:01~12:02	1,415	0,01394	<0,0001	44:02:01G~16:04 <sup>a</sup>	0,285	0,00267	<0,0001
50:01~06:02	1,226	0,01117	<0,0001	18:01~05:01	0,256	-0,00097	<0,0001

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); zeleno osjenčano – negativna vrijednost neravnoteže udruživanja

#### 4.1.4.1. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35~C u hrvatskoj populaciji

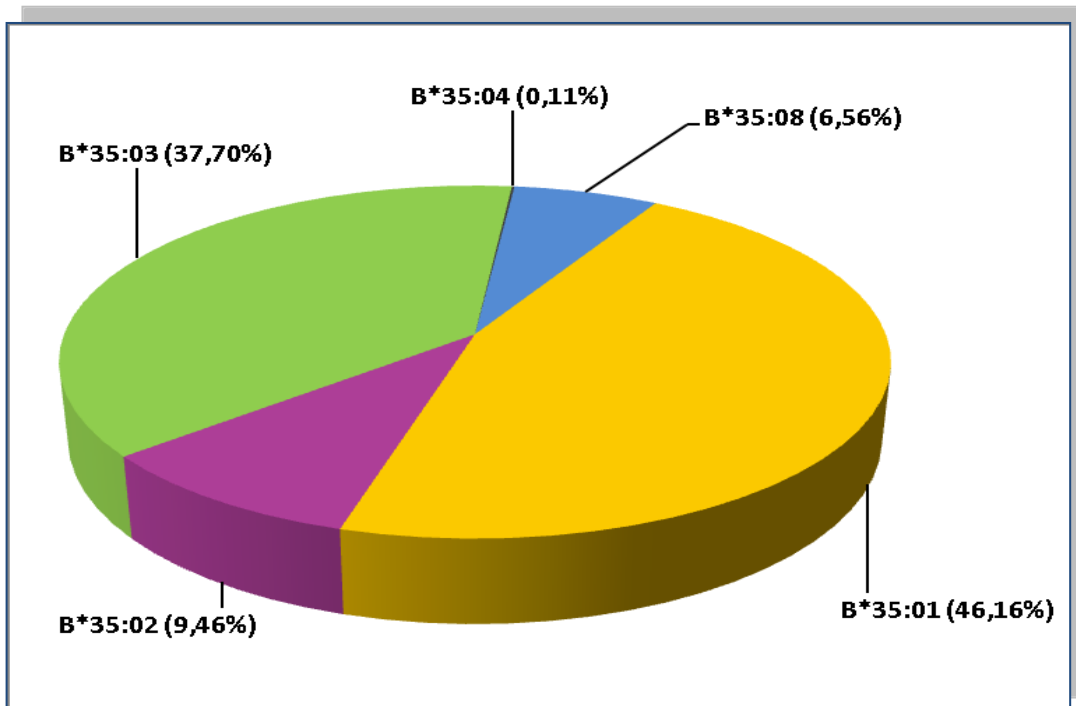
U ispitivanom uzorku aleli genske skupine HLA-B\*35 bili su prisutni s učestalošću 13,4% (N=2684), a njihova raspodjela prikazana je na slici 32. Ukupno je uočeno pet različitih alela, među kojima je HLA-B\*35:01 bio najčešći (46,2%). Za sve alele genske skupine HLA-B\*35 najčešći haplotip bio je HLA-B\*35~C\*04:01, s učestalošću 78,1% za B\*35:08 do 94,6% za B\*35:01 (slike 33-36).

Međutim, za svaki pojedini alel HLA-B\*35 na drugom mjestu po učestalosti bili su haplotipovi s različitim alelom lokusa HLA-C. Analiza haplotipova HLA-B\*35:01~C pokazala je da je drugi haplotip po zastupljenosti bio haplotip HLA-B\*35:01~C\*03:03 (2,5%), zatim HLA-B\*35:01~C\*02:02 (1,5%) dok su sve preostale kombinacije uočene s učestalošću manjom od 0,5% (slika 33).

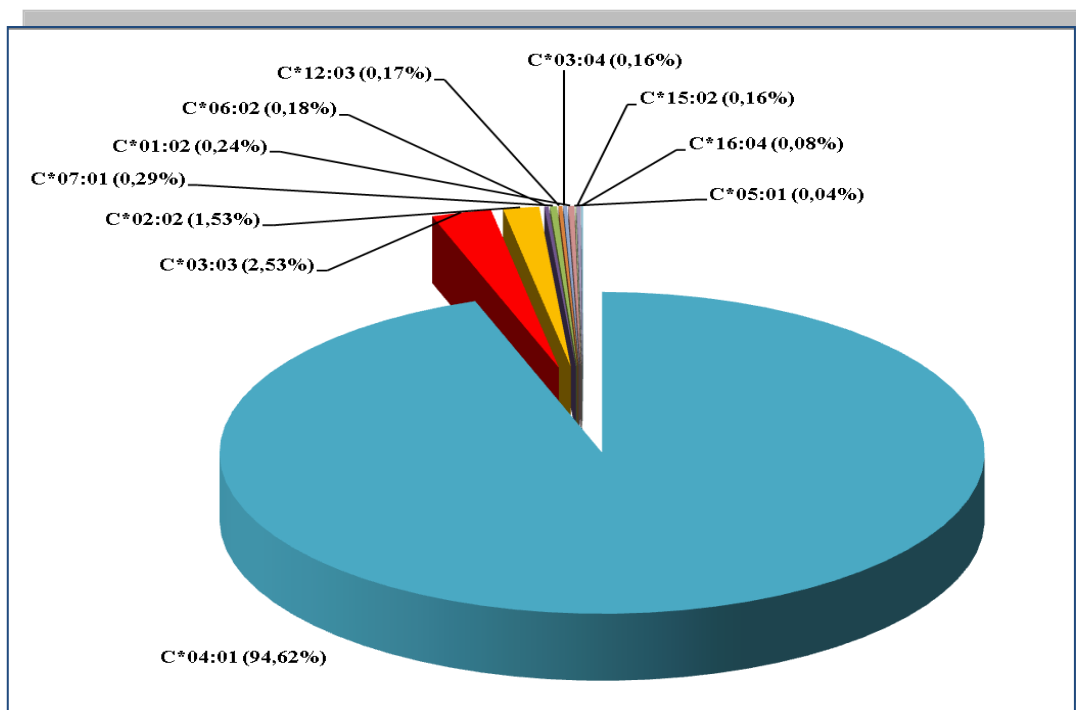
Slika 34 prikazuje raspodjelu haplotipova HLA-B\*35:02~C. Unutar ove skupine haplotipova na drugom mjestu po učestalosti bio je haplotip HLA-B\*35:02~C\*06:02 (17,3%), a još su tri alela lokusa HLA-C uočena među haplotipovima HLA-B\*35:02~C s frekvencijom manjom od 1%.

Alel HLA-B\*35:03 osim snažne neravnoteže udruživanja s alelom HLA-C\*04:01, pojavljivao se još u haplotipu s alelom HLA-C\*12:03 (18,9%). Svi ostali haplotipovi HLA-B\*35:03~C uočeni su sporadično, odnosno s učestalošću manjom od 1% (slika 35).

Najveća raznolikost uočena je za haplotipove HLA-B\*35:08~C među kojima su haplotipovi s čak osam različitih alela HLA-C imali zastupljenost veću od 1% (slika 36). Među haplotipovima, ističe se drugi po učestalosti haplotip HLA-B\*35:08~C\*15:02 koji gotovo i nije bio prisutan u haplotipovima HLA-B\*35~C koje čine ostali aleli genske skupine HLA-B\*35.

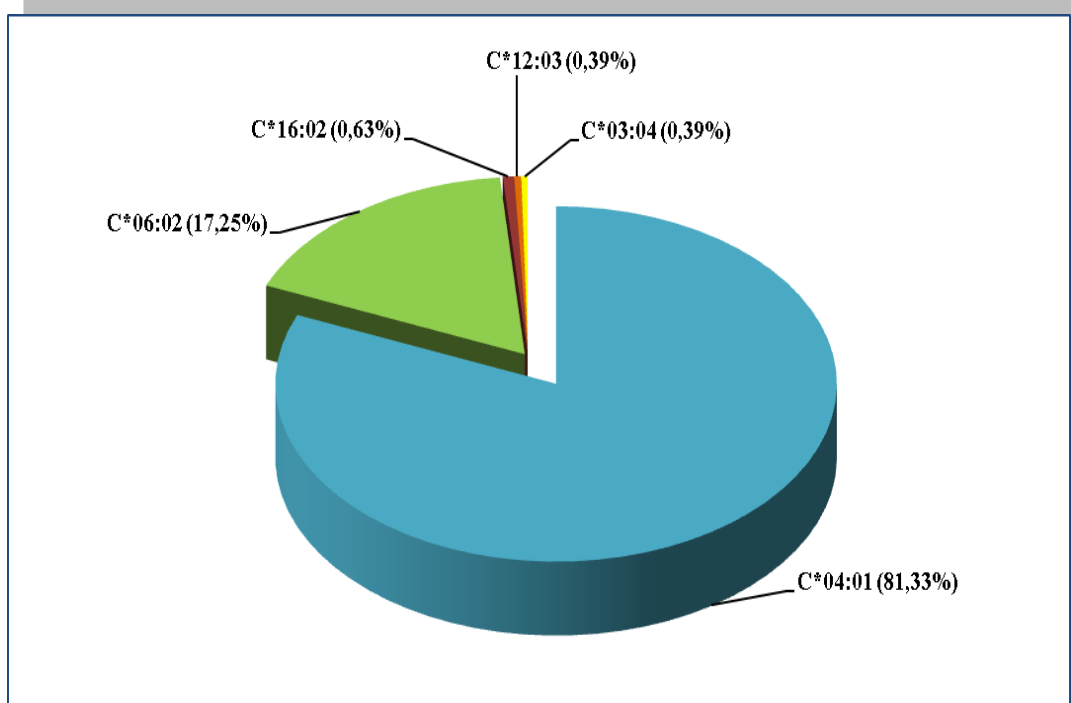


Slika 32. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*35 u hrvatskoj populaciji (N=2684)

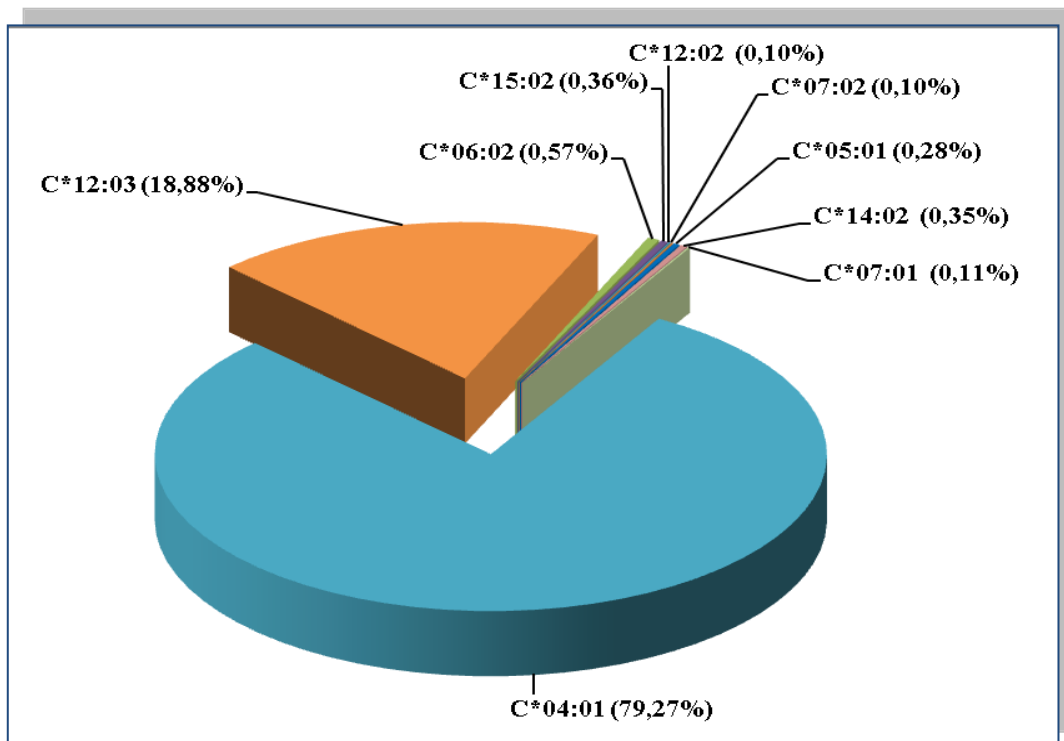


Slika 33. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35:01~C u hrvatskoj populaciji (N=1239)

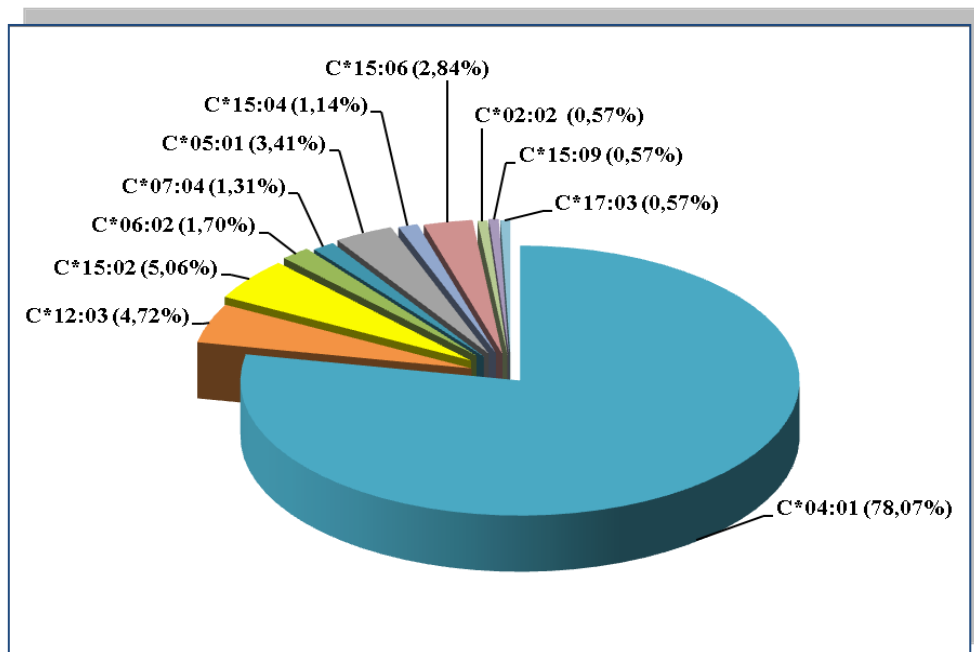




Slika 34. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35:02~C u hrvatskoj populaciji (N=254)

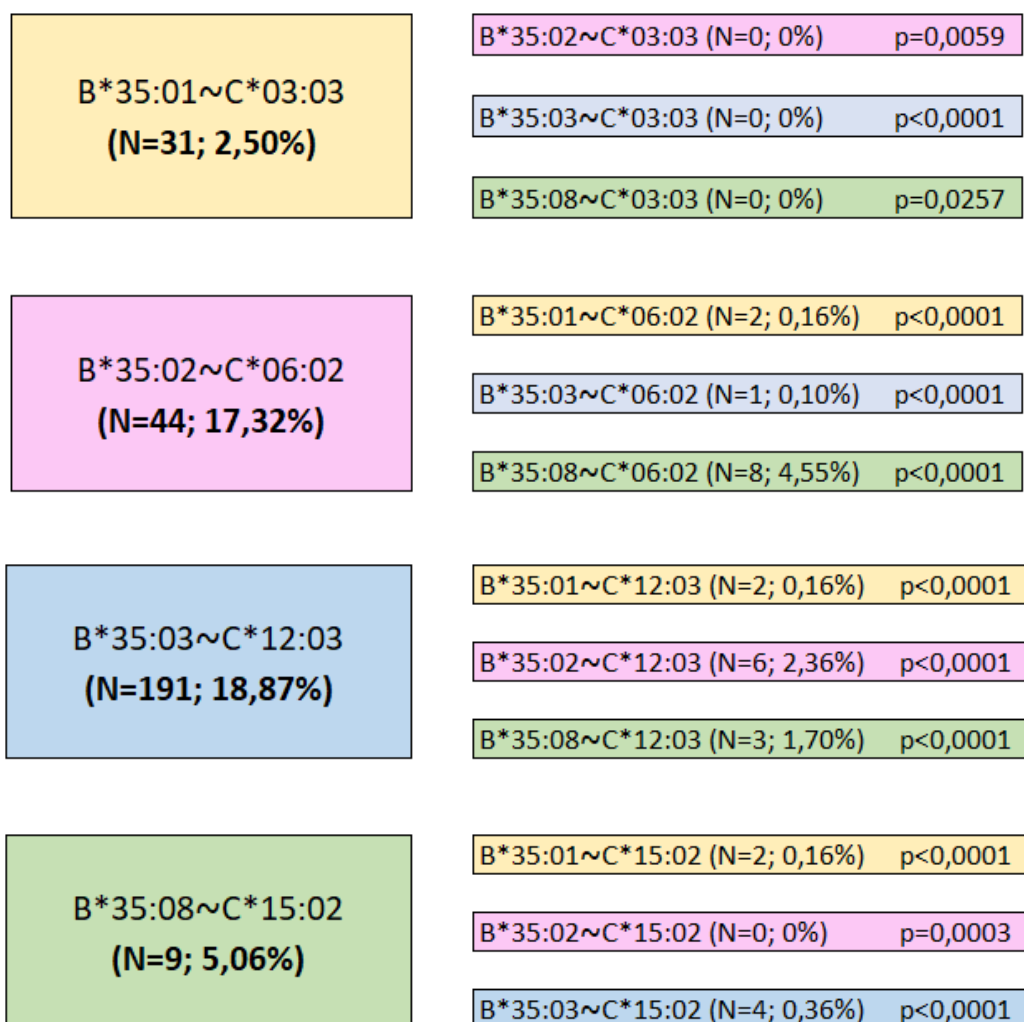


Slika 35. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35:03~C u hrvatskoj populaciji (N=1012)



Slika 36. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35:08~C u hrvatskoj populaciji (N=176)

Međusobna usporedba učestalosti pojedinih haplotipova alela genske skupine HLA-B\*35~C prikazana je na slici 37. Analiza je pokazala isključivu te statistički značajnu povezanost alela HLA-C\*03:03 u haplotipu s alelom HLA-B\*35:01, jer niti jednom nije bio prisutan u haplotipu s alelima HLA-B\*35:02, -B\*35:03 i -B\*35:08 ( $p=0,0059$ ,  $p<0,0001$  i  $p=0,0257$ ). Alel HLA-B\*35:02 statistički se značajno češće pojavljivao u haplotipu s alelom HLA-C\*06:02 nego svi drugi aleli genske skupine HLA-B\*35 ( $p<0,0001$ ). Treći alel iz ove grupe, alel HLA-B\*35:03 bio je u kombinaciji s alelom HLA-C\*12:03 statistički značajno češće ( $p<0,0001$ ), u usporedbi s preostalim alelima genske skupine HLA-B\*35. Bez obzira na mali uzorak, i kombinacija alela HLA-B\*35:08 s alelom HLA-C\*15:02 bila je statistički značajno češće prisutna u usporedbi s preostala tri alela genske skupine HLA-B\*35.

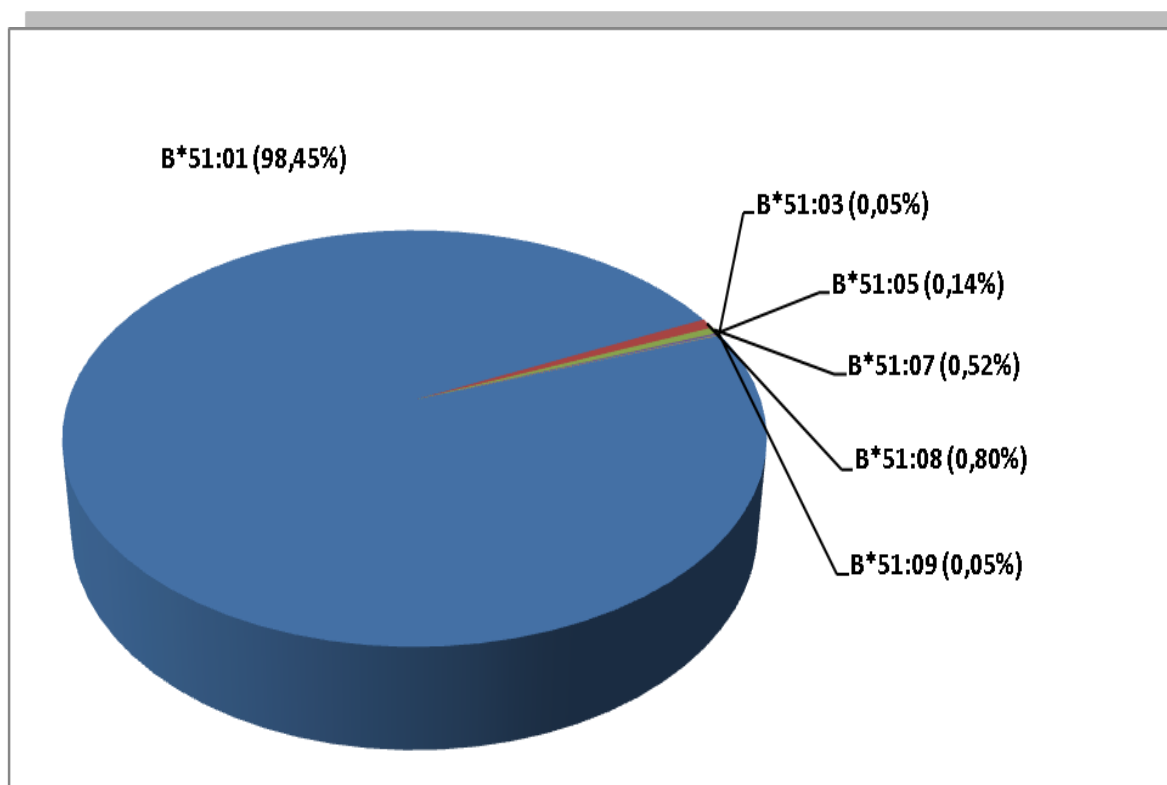


Slika 37. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*35~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim učenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

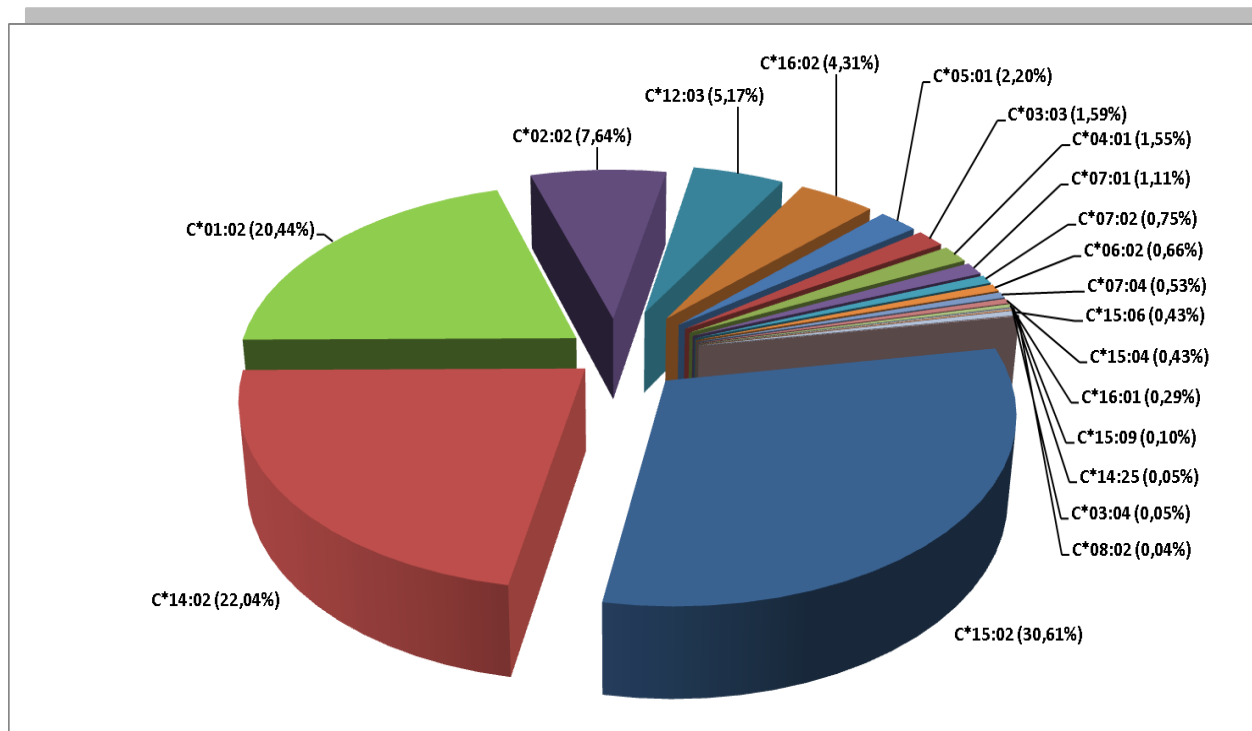
#### 4.1.4.2. Raspodjela haplotipova HLA-B\*51~C u hrvatskoj populaciji

Druga najčešća genska skupina na lokusu HLA-B u Hrvatskoj bila je HLA-B\*51 (10,6%) s najčešćim alelom HLA-B\*51:01, a među našim ispitanicima otkriveno je još pet alela (HLA-B\*51:03, -B\*51:05, -B\*51:07, -B\*51:08 i -B\*51:09) s učestalošću <1% (slika 38).

Haplotipovi HLA-B\*51:01~C prikazani su na slici 39. Alel HLA-B\*51:01 nalazi se u haplotipovima s čak 20 različitih alela HLA-C, ali više od 70% svih kombinacija alela HLA-B\*51:01~C čine haplotipovi s alelima HLA-C\*15:02, -C\*14:02 i -C\*01:02. S obzirom na zastupljenost manju od 1% svih preostalih alela genske skupine HLA-B\*51, nisu rađene dodatne analize haplotipova HLA-B\*51~C.



Slika 38. Raspodjela alela gena HLA-B\*51 u hrvatskoj populaciji (N=2126)



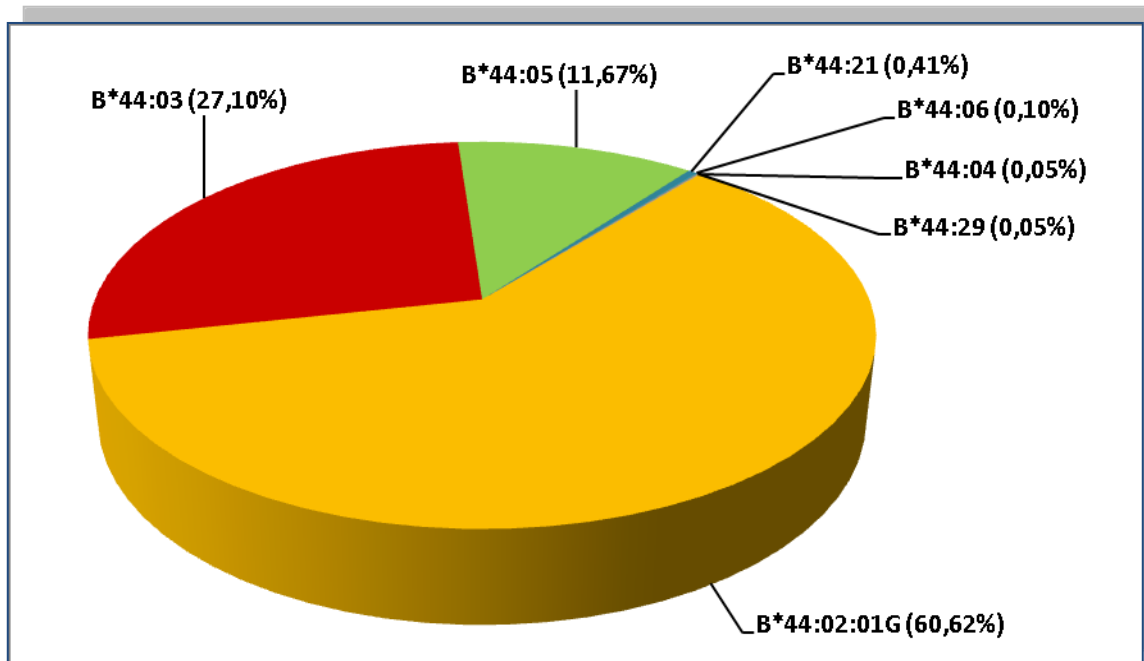
Slika 39. Raspodjela haplotipova HLA-B\*51:01~C u hrvatskoj populaciji (N=2093)

#### 4.1.4.3. Raspodjela haplotipova HLA-B\*44~C u hrvatskoj populaciji

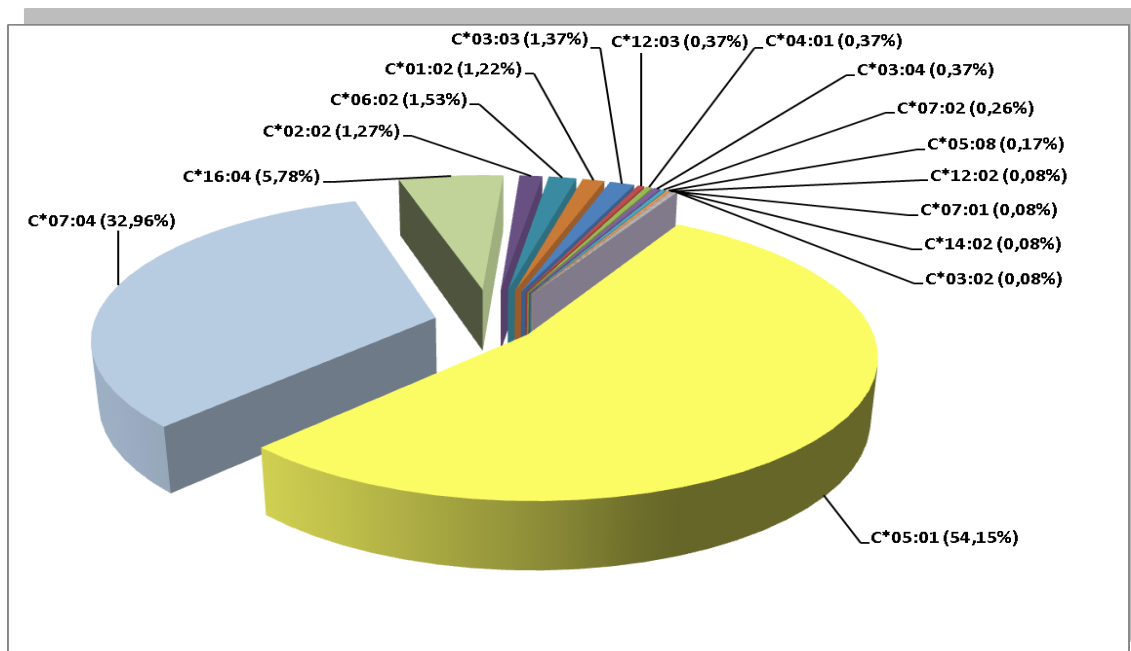
Treća genska skupina po učestalosti u našoj populaciji bila je genska skupina HLA-B\*44 s frekvencijom 9,7%, a unutar ove skupine uočeno je 7, odnosno 8 različitih alela (slika 40). Naime, HLA-B\*44:02:01G obuhvaća dva vrlo česta alela HLA-B\*44:02 i -B\*44:27 koji se međusobno razlikuju u egzonu 4 u jednoj aminokiselini u kodonu 199, a taj polimorfizam u ovom istraživanju nije testiran.

Osobitost alela genske skupine HLA-B\*44 je da svaki od analiziranih alela dolazi u haplotipu s različitim alelom lokusa HLA-C. Aleli HLA-B\*44:02:01G najčešće su uočeni u haplotipovima s alelima HLA-C\*05:01 i -C\*07:04. Osim dva navedena haplotipa, učestalost veću od 5% pokazao je i haplotip HLA-B\*44:02:01G~C\*16:04. Slika 41 pokazuje još 13 različitih alela HLA-C koji su tvorili haplotipove s alelom HLA-B\*44:02:01G.

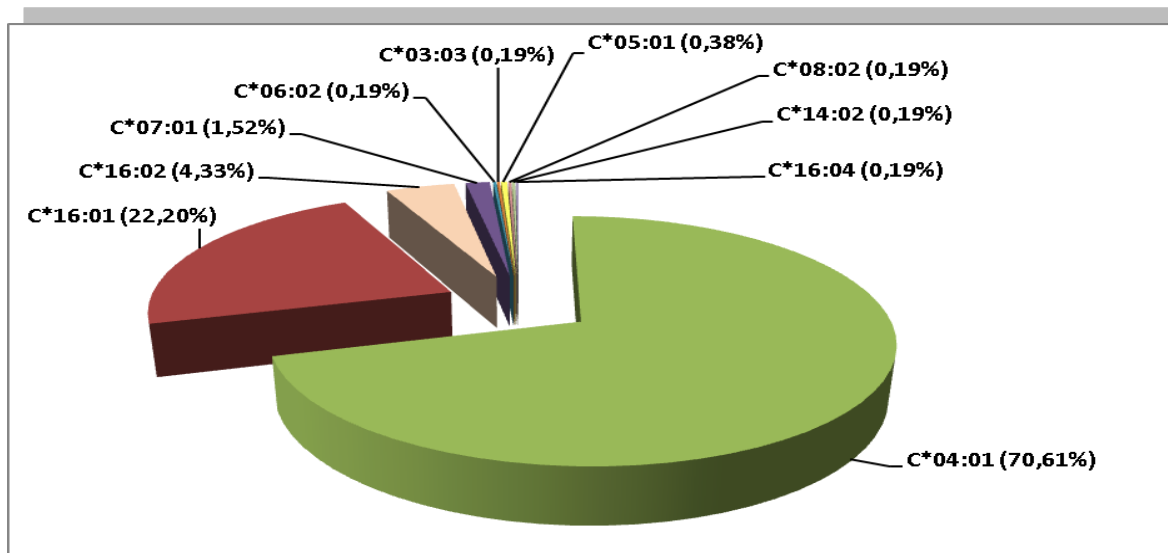
Analiza haplotipova HLA-B\*44:03~C otkrila je HLA-C\*04:01 kao najčešći alel na lokusu HLA-C (70,6%), a slijedio je alel HLA-C\*16:01 koji je uočen u 22,2% haplotipova (slika 42). Alel HLA-B\*44:05 najčešće je bio u haplotipu s alelom HLA-C\*02:02 (85,9%), dok je još šest alela lokusa HLA-C bilo prisutno u 14,1% haplotipova HLA-B\*44:05~C (slika 43).



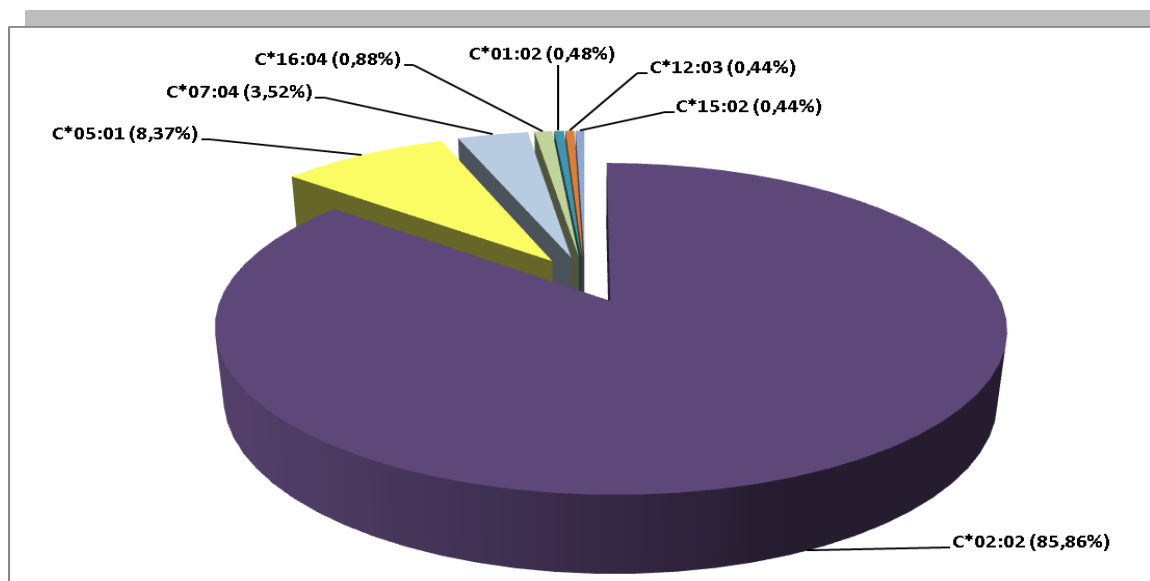
Slika 40. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*44 u hrvatskoj populaciji (N=1945)



Slika 41. Raspodjela haplotipova HLA-B\*44:02:01G~C u hrvatskoj populaciji (N=1177)

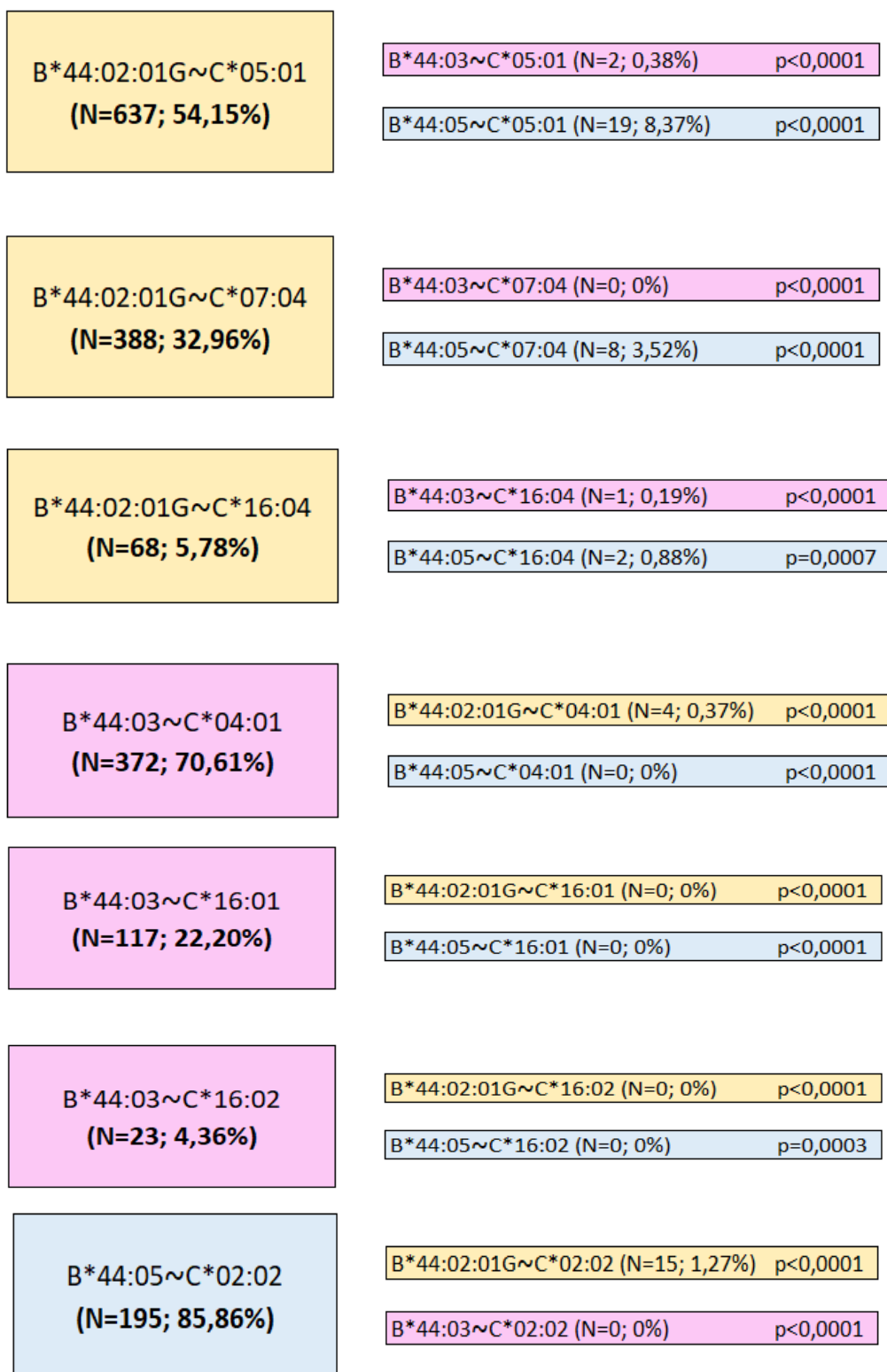


Slika 42. Raspodjela haplotipova HLA-B\*44:03~C u hrvatskoj populaciji (N=527)



Slika 43. Raspodjela haplotipova HLA-B\*44:05~C u hrvatskoj populaciji (N=227)

Usporedba pojedinih haplotipova HLA-B\*44~C prikazana je na slici 44. Za razliku od genske skupine HLA-B\*35, ne postoji niti jedan alel lokusa HLA-C s kojim svi aleli genske skupine HLA-B\*44 predominantno stvaraju haplotip. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da aleli HLA-C\*05:01, -C\*07:04 i -C\*16:04 statistički značajno češće dolaze u haplotipu s alelom HLA-B\*44:02:01G nego s alelima HLA-B\*44:03 i -B\*44:05. Istovremeno, alel HLA-B\*44:03 statistički značajno tvori haplotip s alelima HLA-C\*04:01, -C\*16:01 i -C\*16:02 nego drugi aleli genske skupine HLA-B\*44, dok je treći alel iz ove grupa, alel HLA-B\*44:05 sa statistički značajnom razlikom, u usporedbi s preostalim alelima genske skupine HLA-B\*44, uočen u kombinaciji s alelom HLA-C\*02:02.



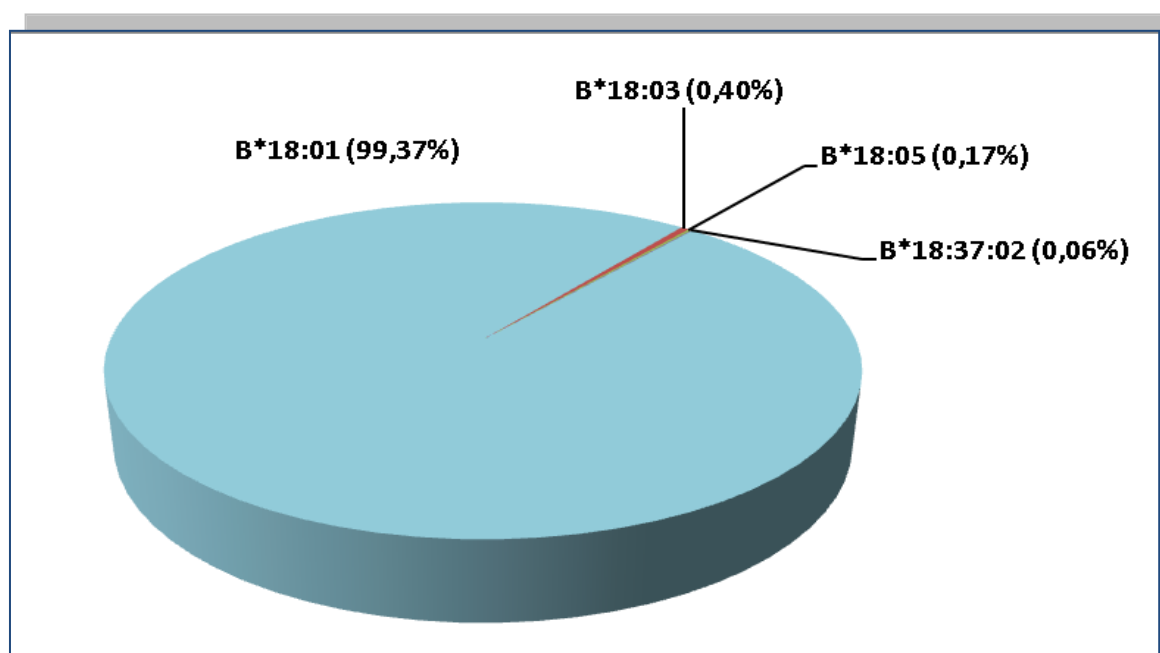
Slika 44. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*44~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)



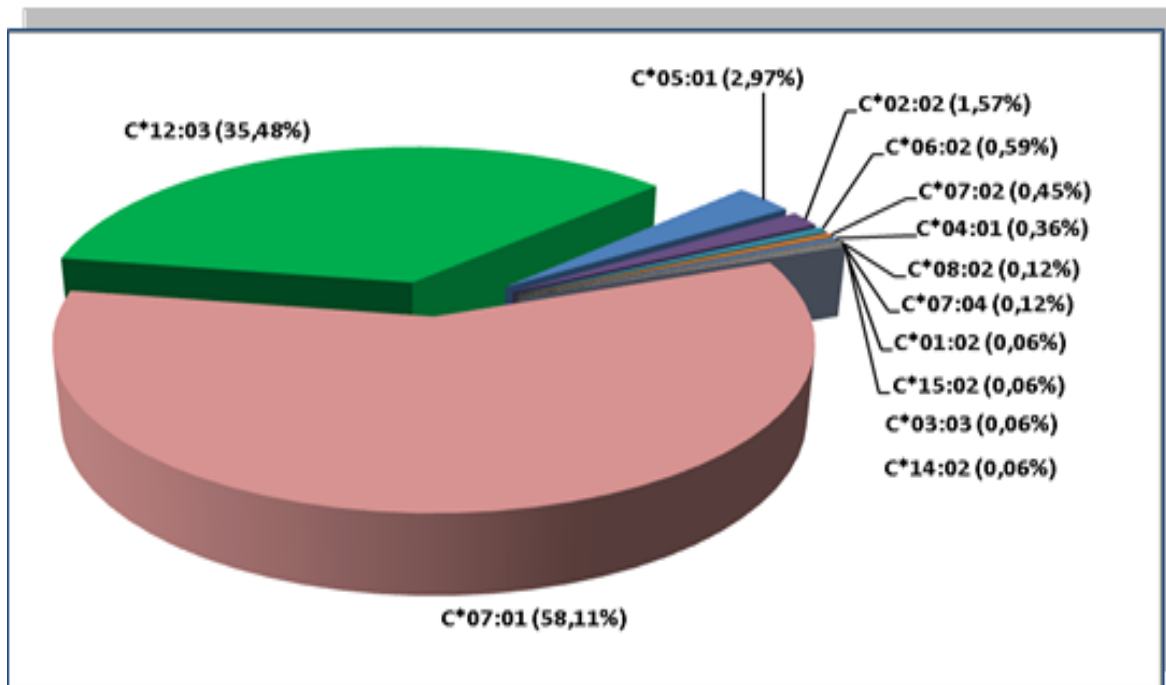
#### 4.1.4.4. Raspodjela haplotipova HLA-B\*18~C u hrvatskoj populaciji

Genska skupina HLA-B\*18 s frekvencijom od 8,7% bila je na četvrtom mjestu po učestalosti u Hrvatskoj s predominantnim alelom HLA-B\*18:01 koji je bio prisutan u više od 99% nositelja ove genske skupine (slika 45). Unutar skupine uočeni su još aleli HLA-B\*18:03, -B\*18:05 te alel -B\*18:37:02.

Analiza raspodjele haplotipova HLA-B\*18:01~C pokazuje dominaciju haplotipova HLA-B\*18:01~C\*07:01 i HLA-B\*18:01~C\*12:03 dok su preostali uočeni haplotipovi bili zastupljeni manje od 3% (slika 46).



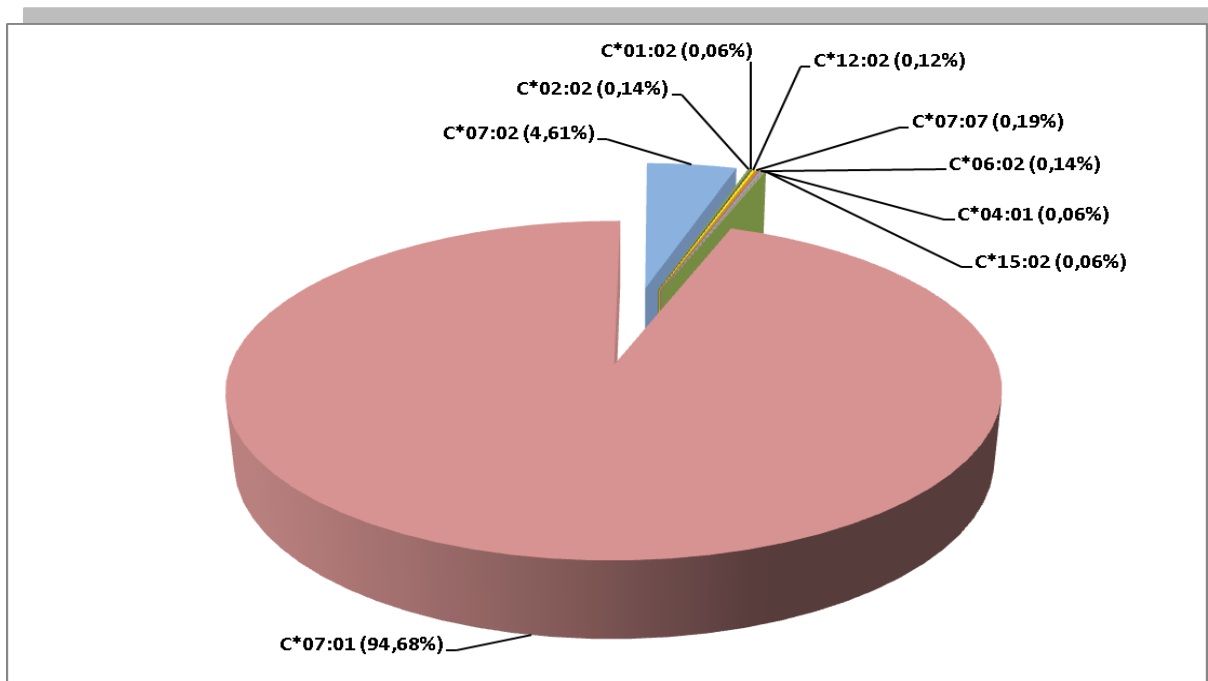
Slika 45. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*18 u hrvatskoj populaciji (N=1733)



Slika 46. Raspodjela haplotipova HLA-B\*18:01~C u hrvatskoj populaciji (N=1722)

#### 4.1.4.5. Raspodjela haplotipova HLA-B\*08~C u hrvatskoj populaciji

Genska skupina HLA-B\*08 je u uzorku 10 000 nesrodnih davatelja pokazala vrlo oskudan polimorfizam i u 99,9% ispitanika bila je riječ o alelu HLA-B\*08:01. Osim navedenog alela, u uzorku je samo jednom uočen alel HLA-B\*08:04. Raspodjela haplotipova HLA-B\*08:01~C na slici 47 prikazuje da je u više od 94% haplotipova bio prisutan alel HLA-C\*07:01. Drugi haplotip po učestalosti bio je s alelom HLA-C\*07:02 (4,6%), dok su svi ostali haplotipovi HLA-B\*08:01~C imali učestalost manju od 1%.

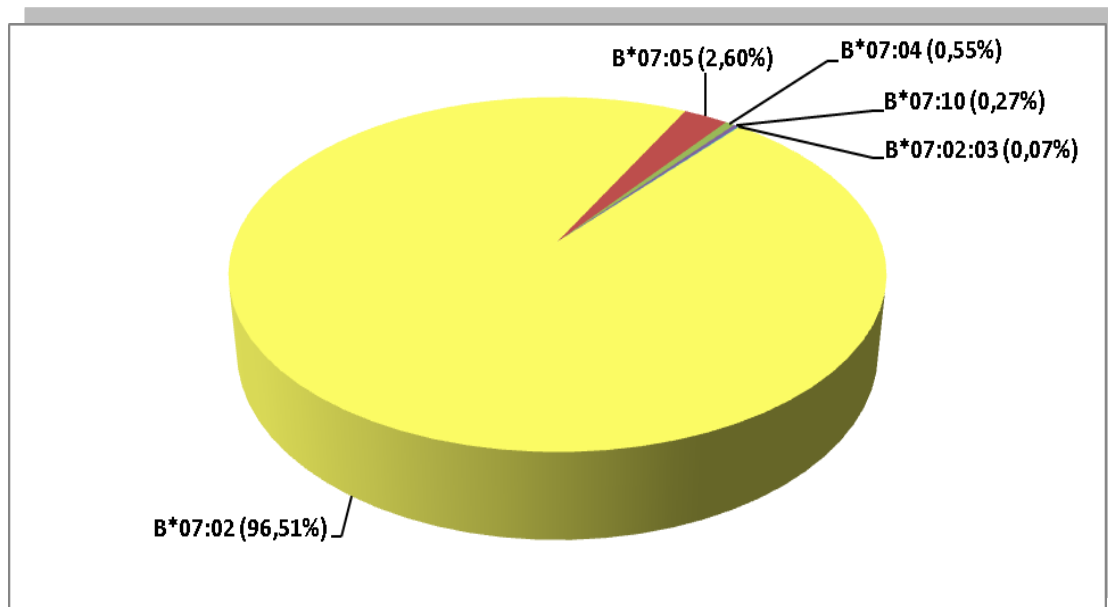


Slika 47. Raspodjela haplotipova HLA-B\*08:01~C u hrvatskoj populaciji (N=1610)

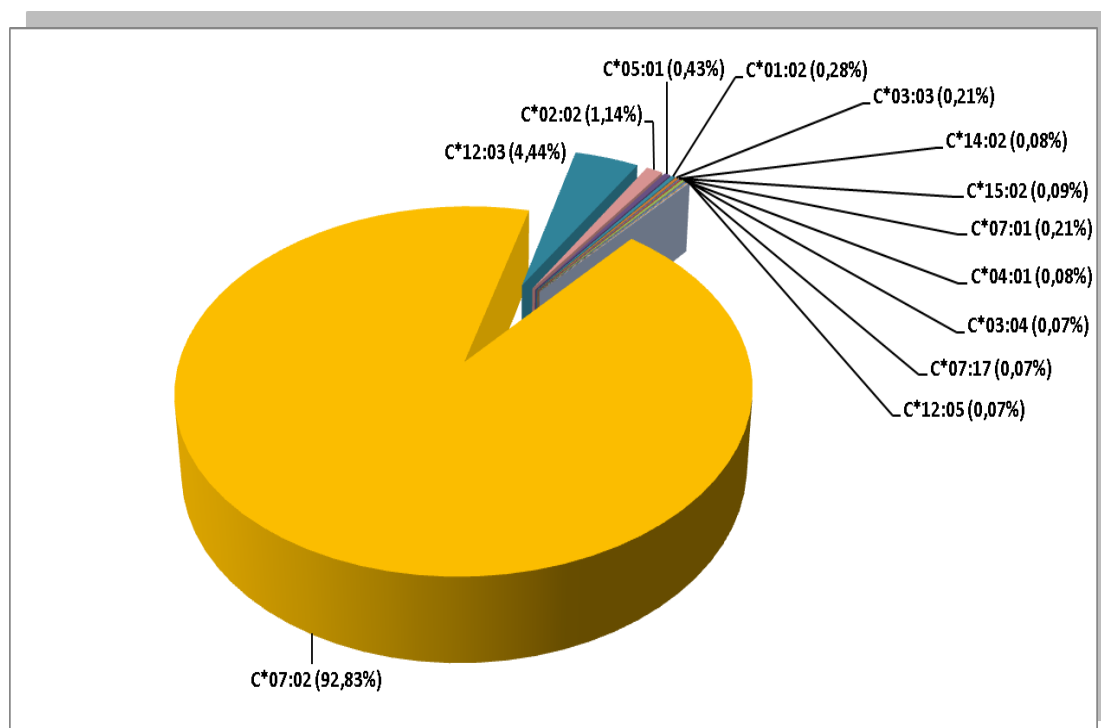
#### 4.1.4.6. Raspodjela haplotipova HLA-B\*07~C u hrvatskoj populaciji

Ovim istraživanjem otkriveno je pet različitih alela genske skupine HLA-B\*07, od kojih je alel HLA-B\*07:02 bio predominantan (96,5%) (slika 48).

Analiza učestalosti haplotipova HLA-B\*07:02~C pokazala je da je najčešći haplotip HLA-B\*07:02~C\*07:02 (92,8%). Zanimljivo je spomenuti da su još dva haplotipa (HLA-B\*07:02~C\*12:03 i HLA-B\*07:02~C\*02:02) bila zastupljena više od 1%, dok je preostalih deset haplotipova bilo prisutno s učestalošću <1% (slika 49).



Slika 48. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*07 u hrvatskoj populaciji (N=1462)

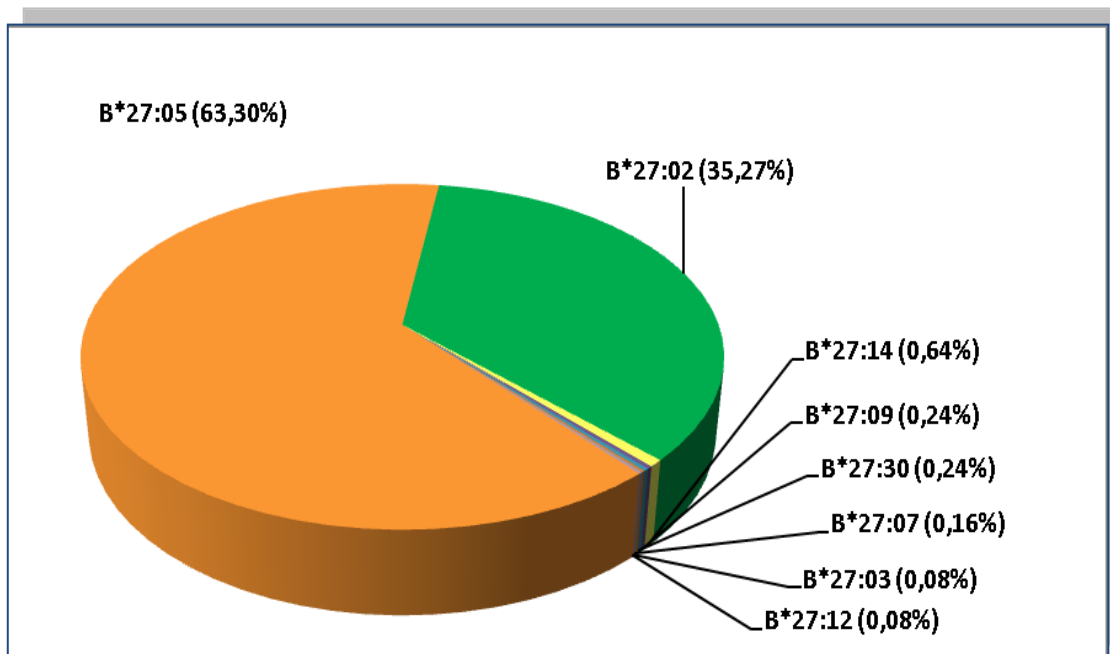


Slika 49. Raspodjela haplotipova HLA-B\*07:02~C u hrvatskoj populaciji (N=1411)

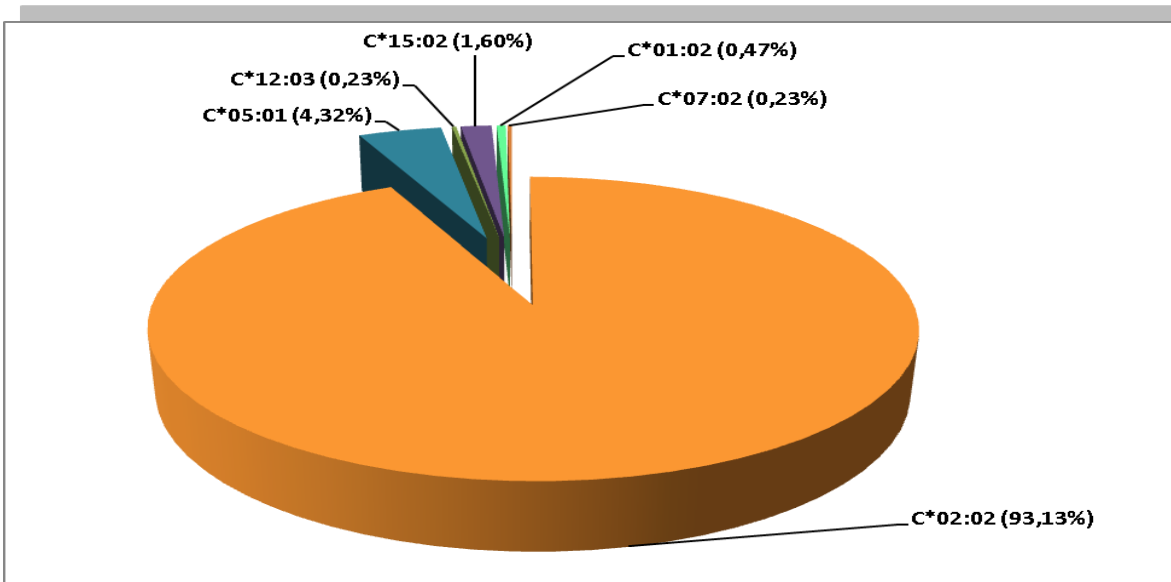
#### 4.1.4.7. Raspodjela haplotipova HLA-B\*27~C u hrvatskoj populaciji

Učestalost genske skupine HLA-B\*27 u ispitivanom uzorku iznosila je 6,3%, najčešći alel bio je HLA-B\*27:05 (63,3%), a iza njega je slijedio alel HLA-B\*27:02 (35,3%). Preostalih šest uočenih alela imalo je frekvenciju manju od 1% (slika 50).

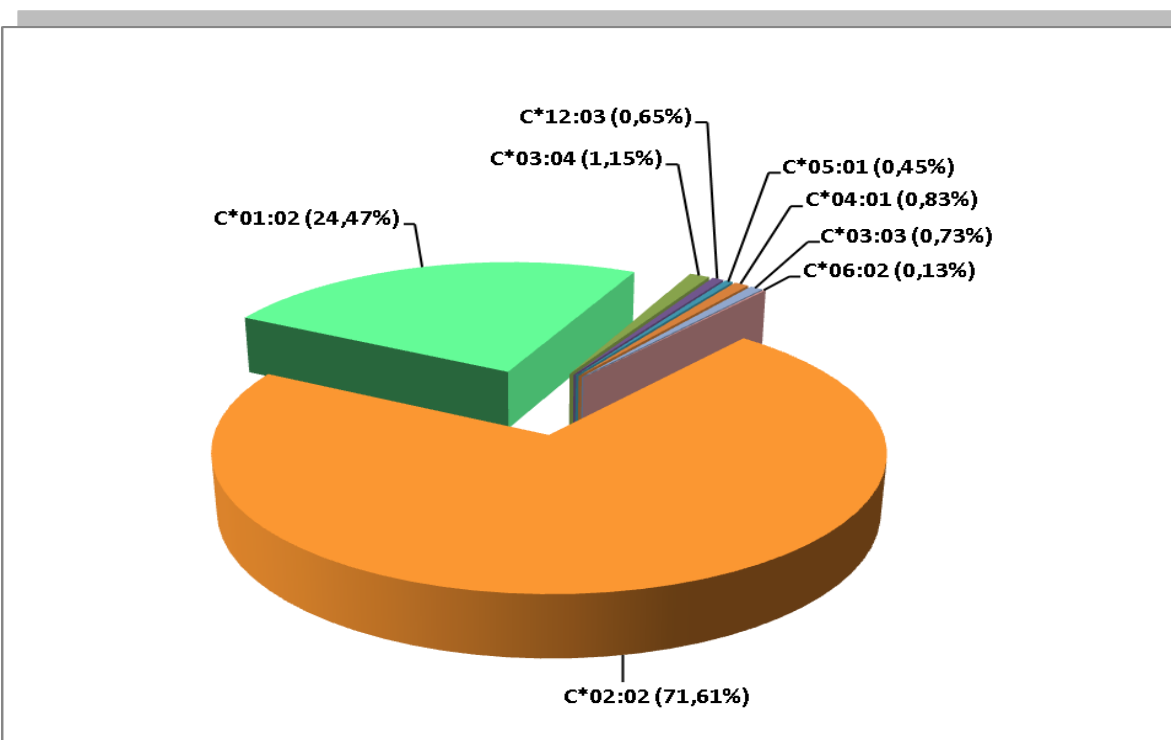
Raspodjele haplotipova HLA-B\*27~C prikazane su na slikama 51 i 52. Oba česta alela predominantno se nalaze u haplotipu s HLA-C\*02:02. Međutim, alel HLA-B\*27:05 još se vrlo često pojavljuje i u haplotipu s HLA-C\*01:02, dok ta povezanost nije uočena za alel HLA-B\*27:02. Usporedba učestalosti haplotipova genske skupine HLA-B\*27 prikazana je na slici 53. Analiza pokazuje da je alel HLA-C\*02:02 statistički značajno češće prisutan u kombinaciji s alelom HLA-B\*27:02 nego s alelom HLA-B\*27:05 ( $p < 0,0001$ ), dok alel HLA-B\*27:05 statistički značajno češće tvori haplotip s alelom HLA-C\*01:02 nego alel HLA-B\*27:02 ( $p < 0,0001$ ).



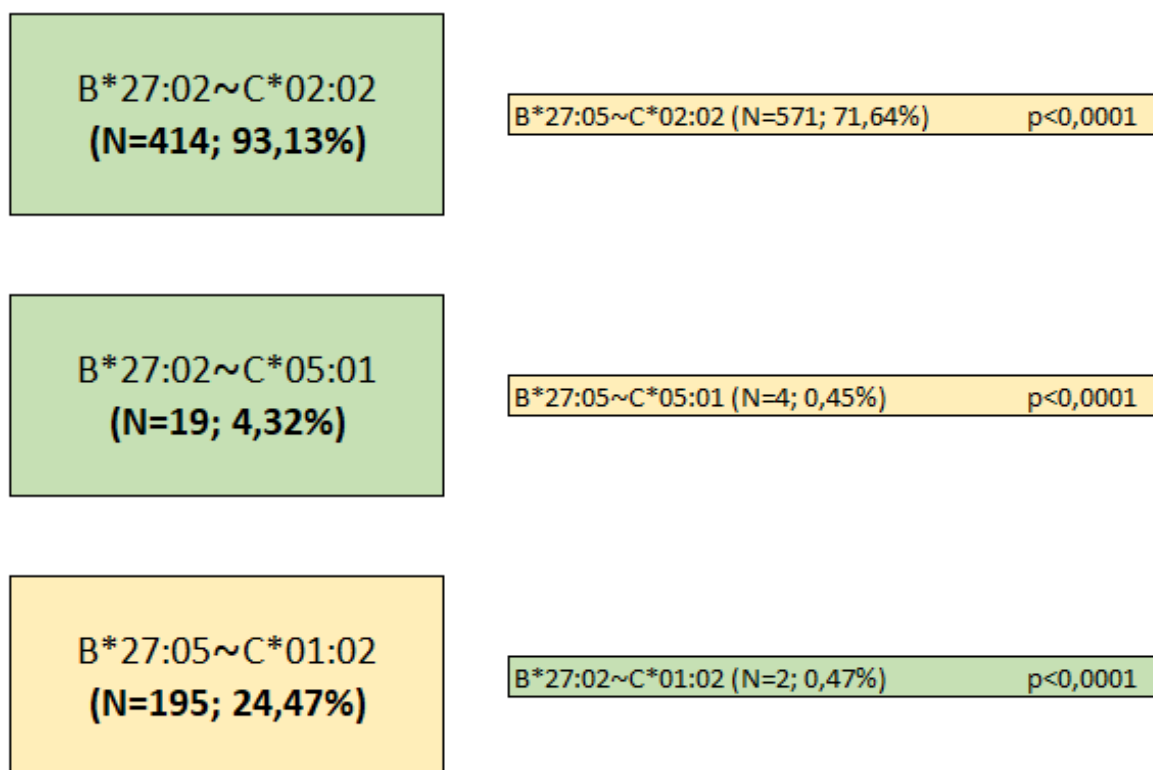
Slika 50. Raspodjela alela gena HLA-B\*27 u hrvatskoj populaciji (N=1259)



Slika 51. Raspodjela haplotipova HLA-B\*27:02~C u hrvatskoj populaciji (N=444)



Slika 52. Raspodjela haplotipova HLA-B\*27:05~C u hrvatskoj populaciji (N=797)



Slika 53. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*44~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

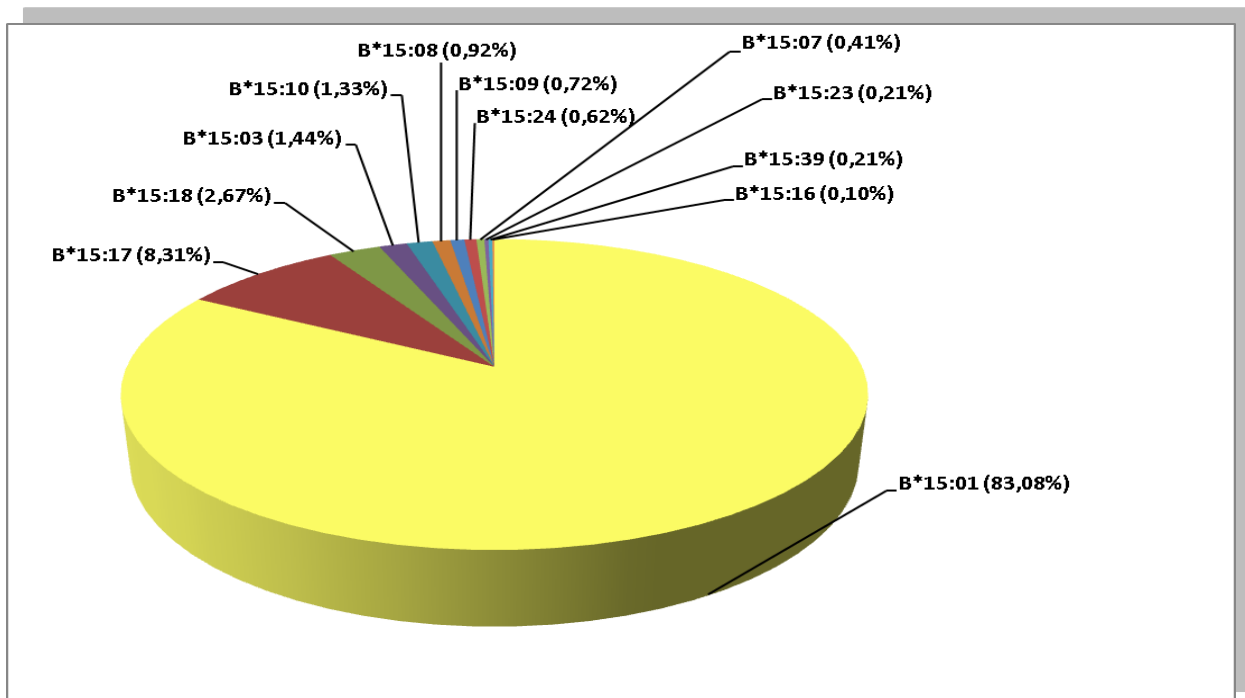
#### 4.1.4.8. Raspodjela haplotipova HLA-B\*15~C u hrvatskoj populaciji

Genska skupina HLA-B\*15 s učestalošću 4,9% i s ukupno 12 različitih alela jedna je od najpolimorfnijih genskih skupina u našoj populaciji (slika 54). Alel HLA-B\*15:01 bio je dominantan (83,1%), drugi prema učestalosti bio je HLA-B\*15:17 (8,3%), dok su svi ostali aleli ove genske skupine imali frekvenciju manju od 3%.

Zanimljivo je istaknuti i veliki polimorfizam haplotipova HLA-B\*15:01~C gdje je uočeno čak 13 kombinacija. Najčešći haplotip bio je HLA-B\*15:01~C\*03:03 s učestalošću od 55,8%. Slijedili su haplotipovi HLA-B\*15:01~C\*03:04 i HLA-B\*15:01~C\*04:01 s učestalostima od 24,6% i 12,9% (slika 55). Za razliku od alela HLA-B\*15:01, alel -B\*15:17 nije pokazao veliku raznolikost haplotipova s alelima HLA-C. Slika 56 prikazuje dominaciju haplotipa HLA-B\*15:17~C\*07:01 s učestalošću od 92,5%, a preostalih 7,5% ispitanika imalo je jedan od četiri alela lokusa HLA-C prikazana na slici 56.

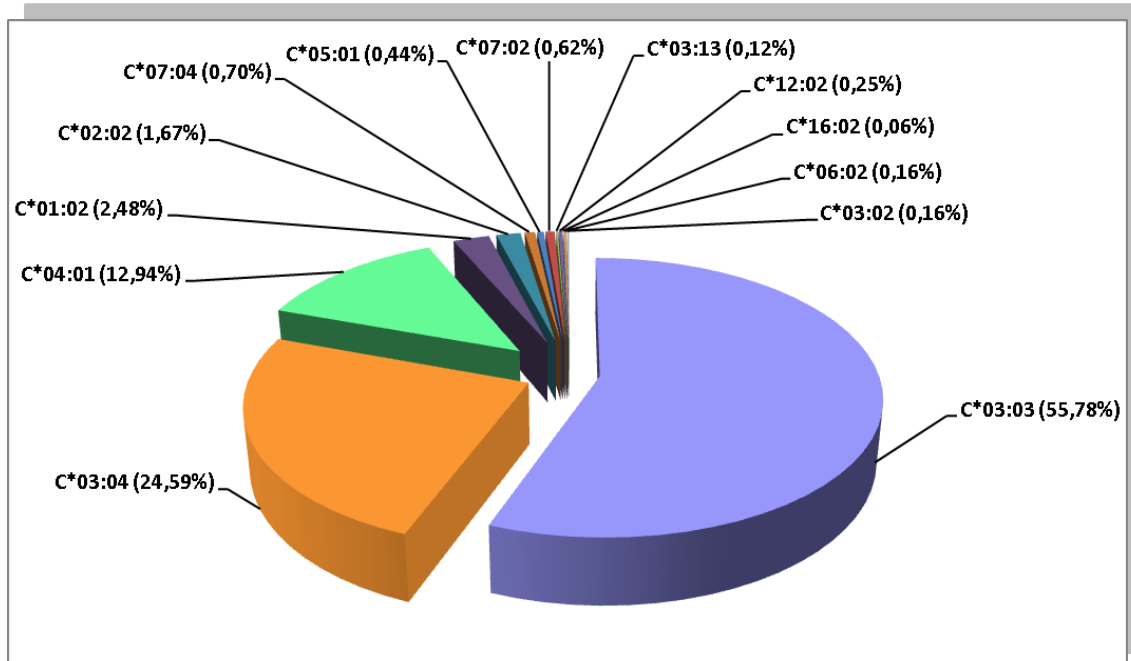
Alel HLA-B\*15:18 također je pokazao mali polimorfizam haplotipova te je u 96,2% slučajeva tvorio haplotip s alelom HLA-C\*07:04 dok je u preostalih 3,8% slučajeva bio u kombinaciji s alelom HLA-C\*03:04 (slika 57).

Međusobna usporedba pojedinih haplotipova triju najčešćih alela genske skupine HLA-B\*15 prikazana je na slici 58. Alel HLA-B\*15:01 je statistički značajno češće tvorio haplotipove s alelima HLA-C\*03:03 ( $p < 0,0001$ ), -C\*03:04 ( $p < 0,0001$ ) i -C\*04:01 ( $p < 0,0001$ ) nego alel HLA-B\*15:17. Haplotipovi HLA-B\*15:17~C\*03:03 i HLA-B\*15:17~C\*03:04 bili su statistički značajno češći u usporedbi s alelom HLA-B\*15:18, dok haplotipovi s alelom HLA-C\*04:01 nisu pokazivali statistički značajnu razliku. Istovremeno je alel HLA-B\*15:17 statistički značajno češće bio prisutan u haplotipu s alelom HLA-C\*07:01 nego preostala dva alela genske skupine HLA-B\*15. Alel HLA-B\*15:18 formirao je statistički značajno češće haplotip s alelom HLA-C\*07:04 u usporedbi s alelom HLA-B\*15:01, odnosno -B\*15:17.

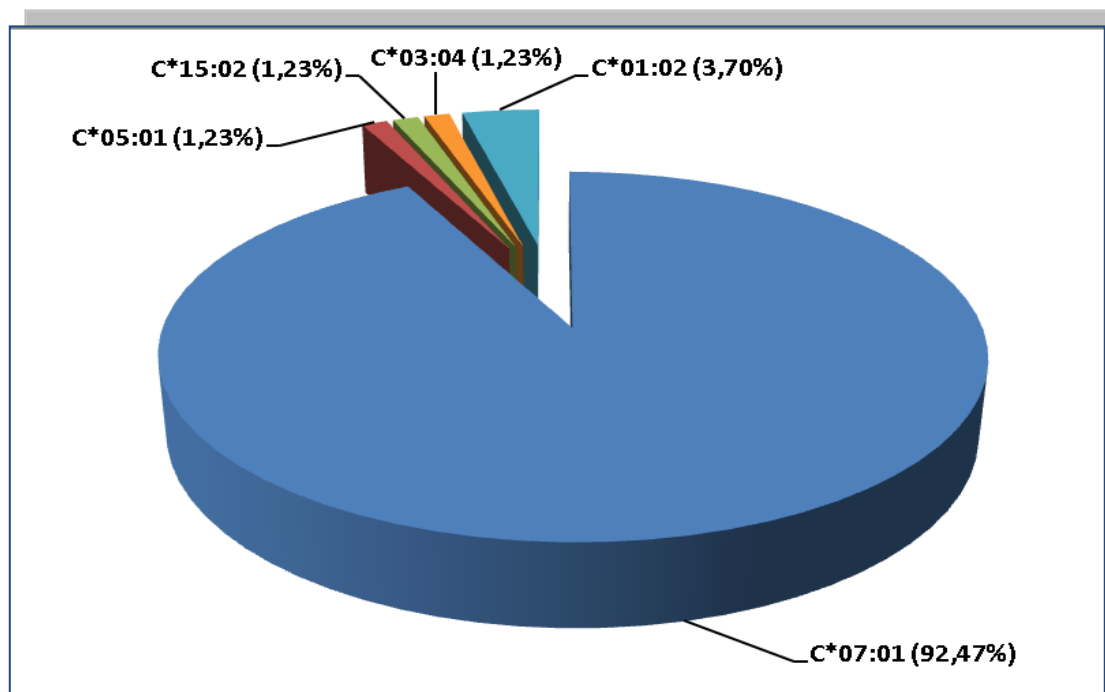


Slika 54. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*15 u hrvatskoj populaciji (N=975)

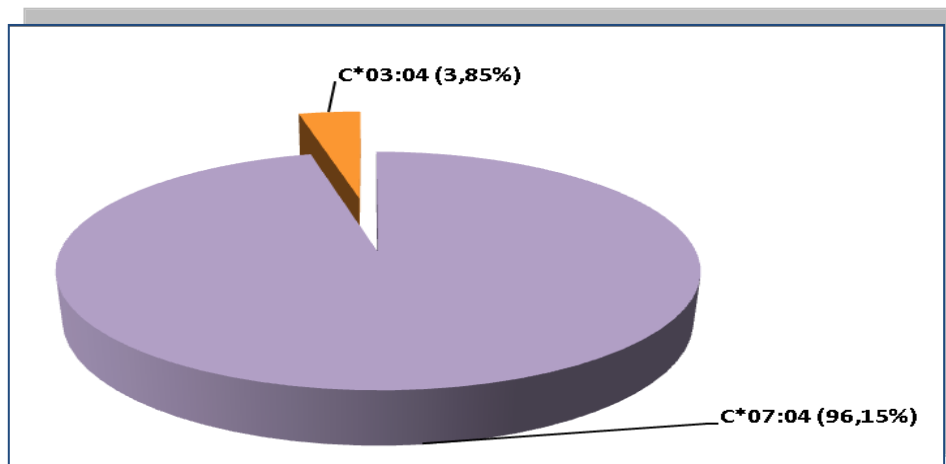




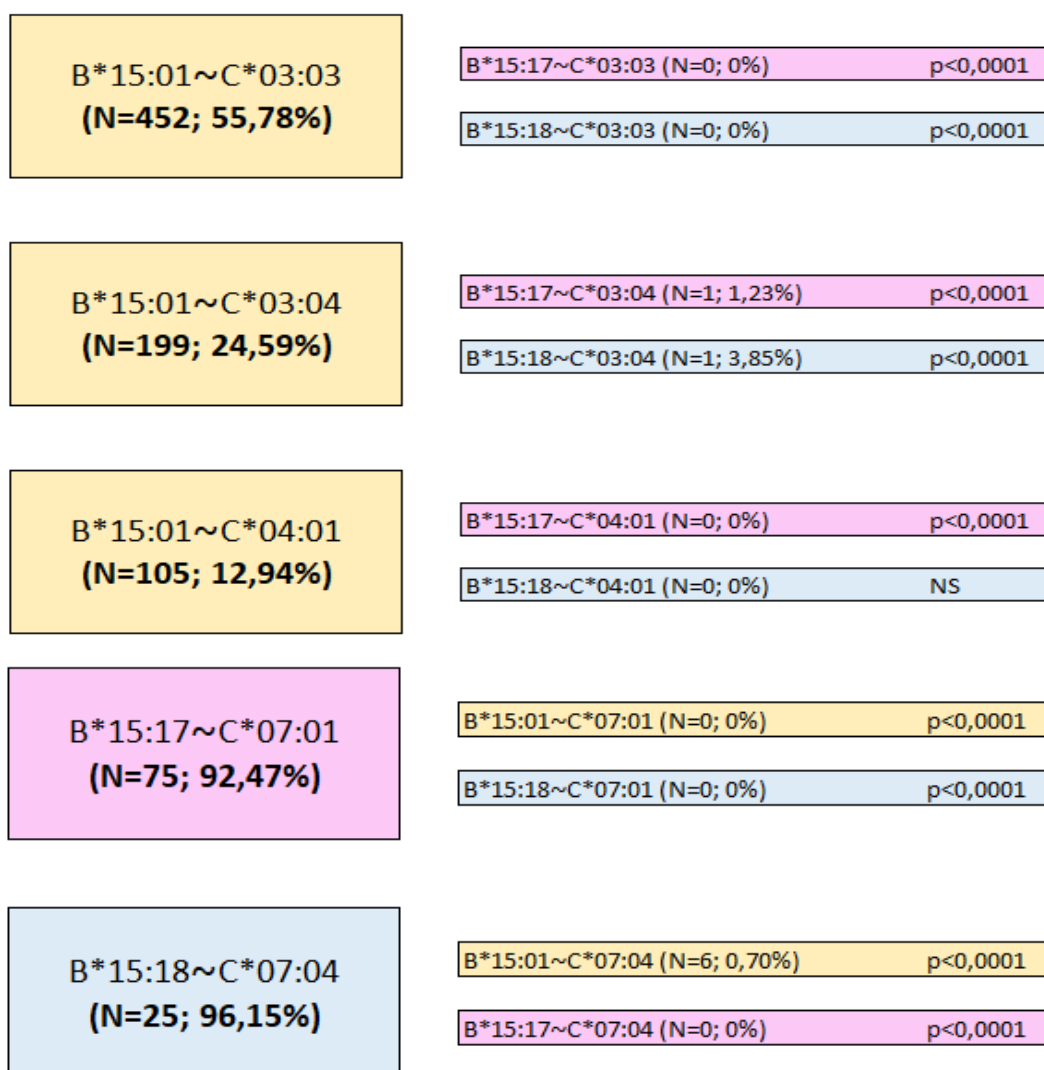
Slika 55. Raspodjela haplotipova HLA-B\*15:01~C u hrvatskoj populaciji (N=930)



Slika 56. Raspodjela haplotipova HLA-B\*15:17~C u hrvatskoj populaciji (N=81)



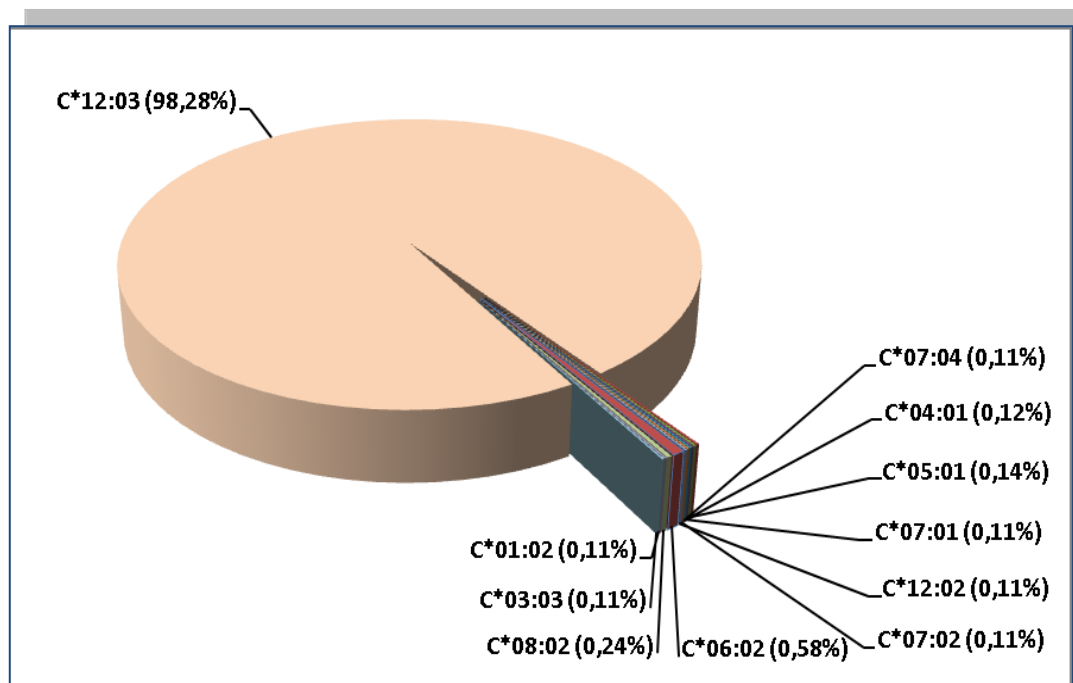
Slika 57. Raspodjela haplotipova HLA-B\*15:18~C u hrvatskoj populaciji (N=26)



Slika 58. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*15~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba statistički nije značajna

#### 4.1.4.9. Raspodjela haplotipova HLA-B\*38~C u hrvatskoj populaciji

U skupini nesrodnih dobrovoljnih davatelja još su četiri genske skupine bile prisutne s učestalošću od 3-5%. To su genske skupine HLA-B\*38, -B\*40, -B\*13 i -B\*39. Alel HLA-B\*38:01 najčešći je alel genske skupine HLA-B\*38, a osim njega, u uzorku je uočen i alel HLA-B\*38:08 (samo jedan put). Alel HLA-B\*38:01 pojavljivao se u haplotipu s alelom HLA-C\*12:03 kod 98,3% ispitanika, dok su sve druge kombinacije haplotipova bile vrlo rijetke (slika 59).

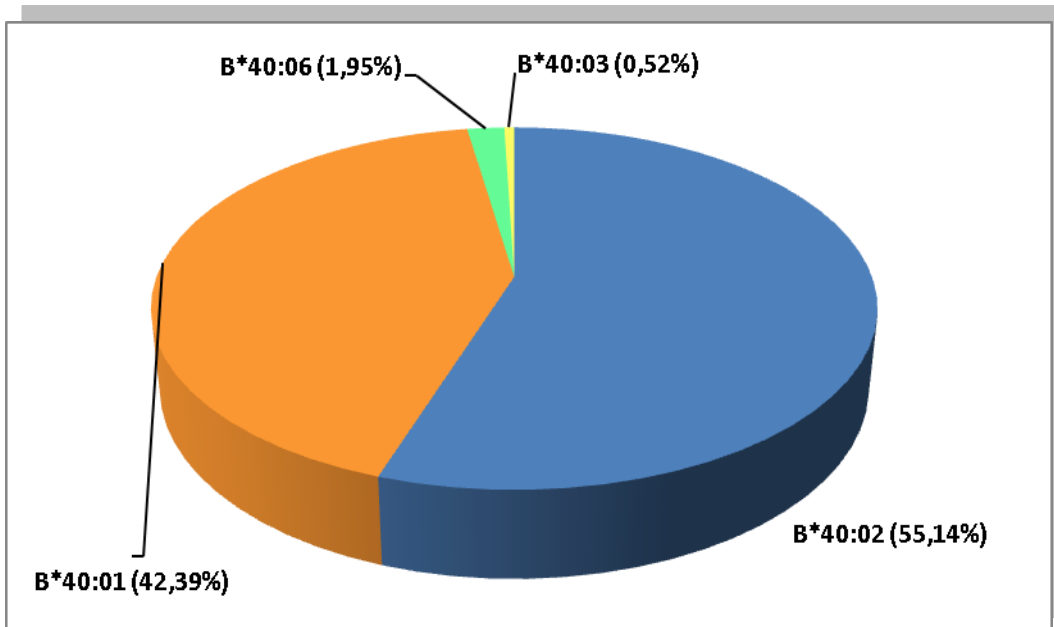


Slika 59. Raspodjela haplotipova HLA-B\*38:01~C u hrvatskoj populaciji (N=930)

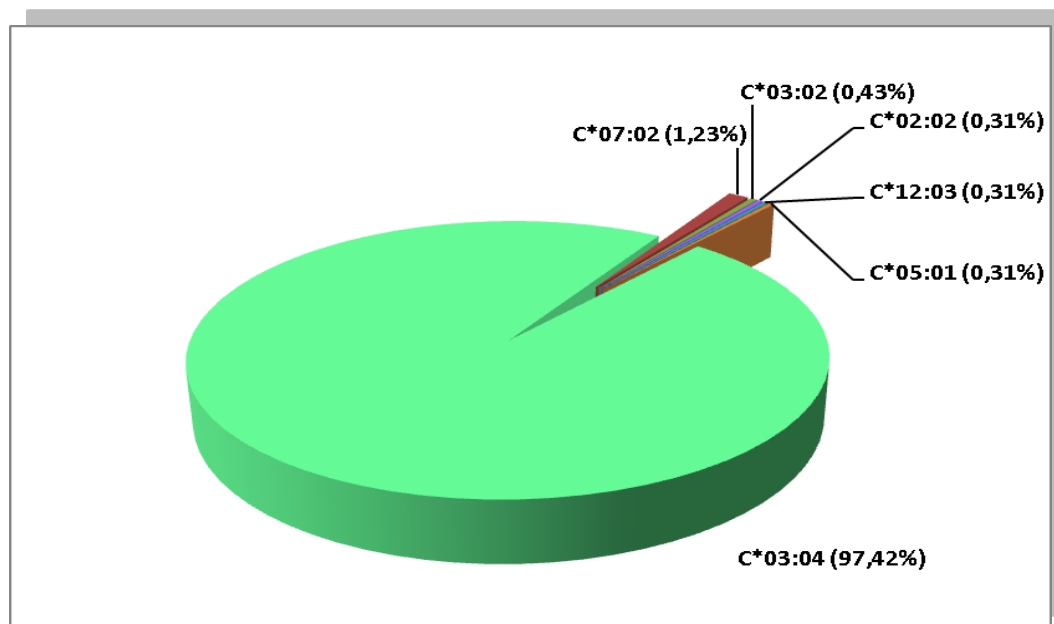
#### 4.1.4.10. Raspodjela haplotipova HLA-B\*40~C u hrvatskoj populaciji

Genska skupina HLA-B\*40 bila je zastupljena s četiri različita alela od kojih su dva alela (HLA-B\*40:01 i -B\*40:02) iz skupine vrlo čestih alela (tablica 13). Na slici 60 prikazana je raspodjela alela genske skupine HLA-B\*40 prema kojoj su aleli HLA-B\*40:01 i -B\*40:02 prisutni kod više od 97,5% ispitanika.

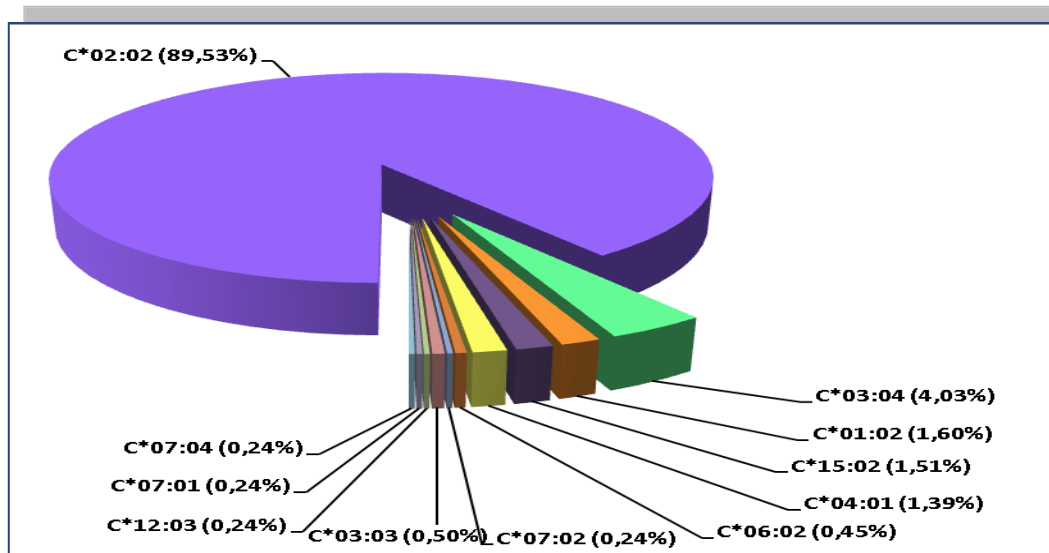
Haplotipovi HLA-B\*40~C prikazani su na slikama 61 i 62. Alel HLA-B\*40:02 pokazao je veći polimorfizam haplotipova koje je tvorio s alelima lokusa HLA-C, 11 kombinacija u usporedbi sa šest koje je tvorio alel HLA-B\*40:01. Alel HLA-B\*40:01 predominantno se nalazi u haplotipu s alelom HLA-C\*03:04 (97,4%), dok se alel HLA-B\*40:02 najčešće pojavljuje u haplotipu s alelom HLA-C\*02:02 (89,5%). Međusobna usporedba haplotipova HLA-B\*40~C prikazana je na slici 63.



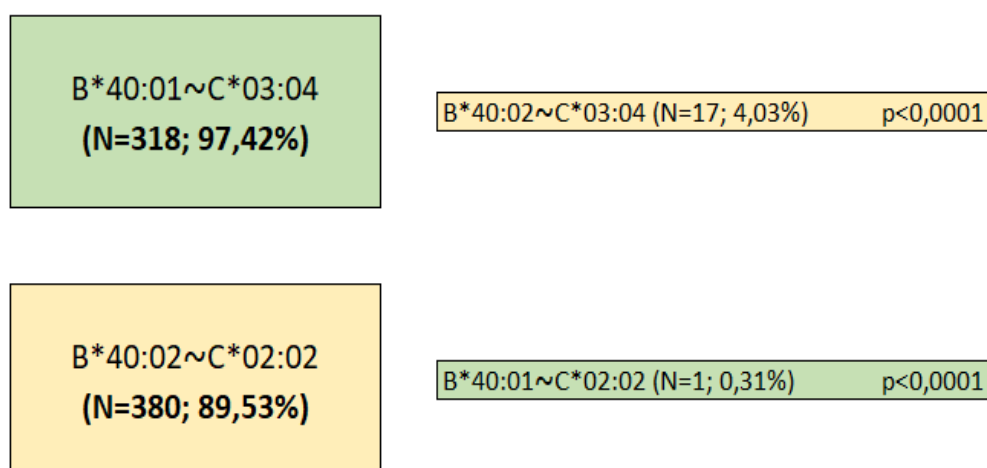
Slika 60. Raspodjela alela genske skupine HLA-B\*40 u hrvatskoj populaciji (N=769)



Slika 61. Raspodjela haplotipova HLA-B\*40:01~C u hrvatskoj populaciji (N=326)



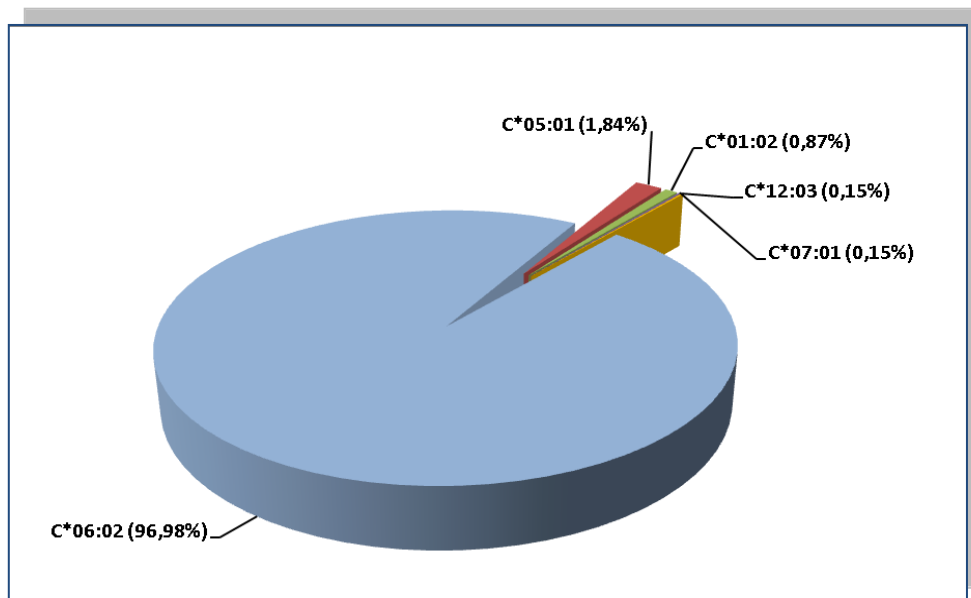
Slika 62. Raspodjela haplotipova HLA-B\*40:02~C u hrvatskoj populaciji (N=424)



Slika 63. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*40~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

#### 4.1.4.11. Raspodjela haplotipova HLA-B\*13~C u hrvatskoj populaciji

Alel HLA-B\*13:02 bio je prisutan s učestalošću 3,4%, a uz njega samo je jednom uočen alel HLA-B\*13:10. Haplotype HLA-B\*13:02~C\*06:02 imao je frekvenciju od 97,0%, dok su preostali haplotipovi uočeni sporadično, s učestalošću manjom od 2%. (slika 64).

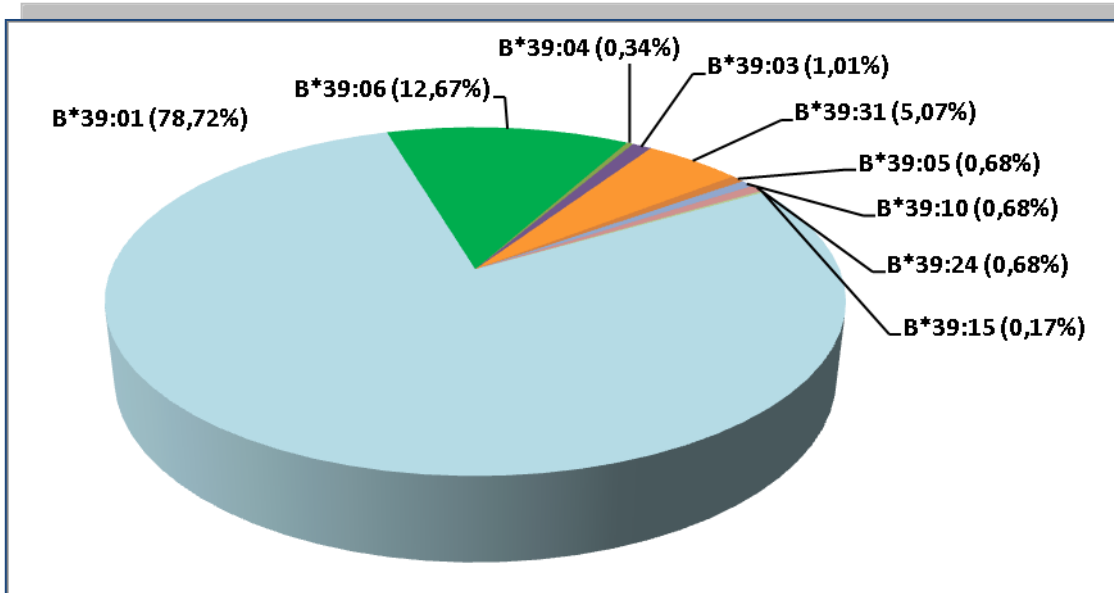


Slika 64. Raspodjela haplotipova HLA-B\*13:02~C u hrvatskoj populaciji (N=675)

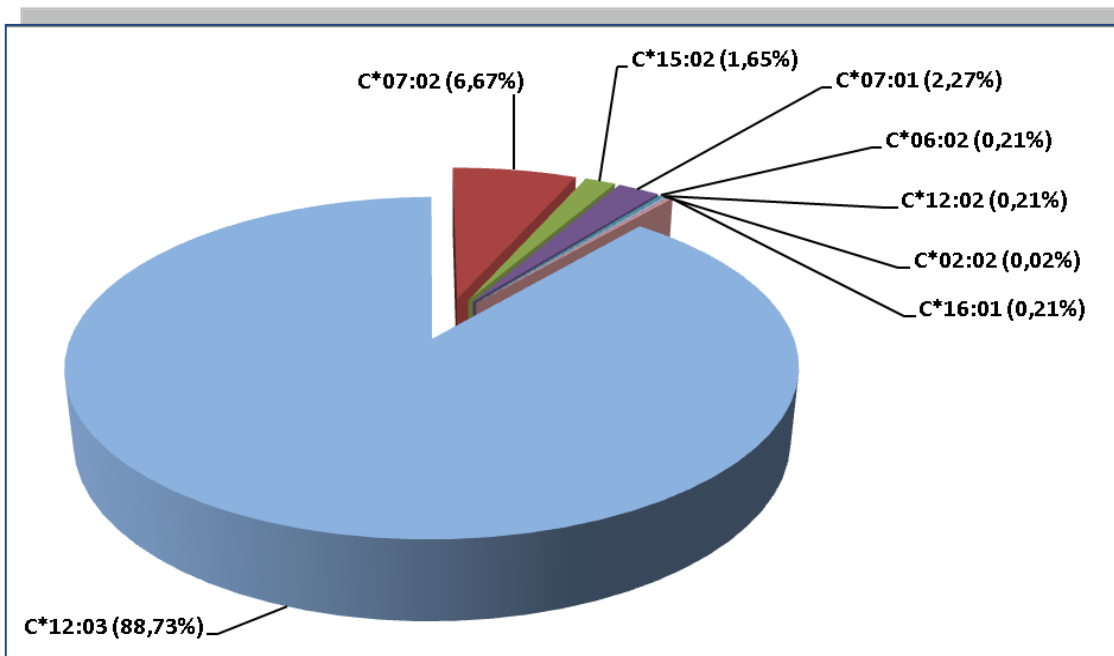
#### 4.1.4.12. Raspodjela haplotipova HLA-B\*39~C u hrvatskoj populaciji

Zadnja genska skupina s učestalošću 3,0% i vrlo velikim polimorfizmom bila je genska skupina HLA-B\*39. Slika 65 prikazuje raspodjelu alela genske skupine HLA-B\*39, s najzastupljenijim alelom HLA-B\*39:01 (78,7%), slijedili su aleli HLA-B\*39:06 (12,7%) i -B\*39:31 (5,1%), dok je preostalih šest alela ove genske skupine imalo učestalost manju od 1%.

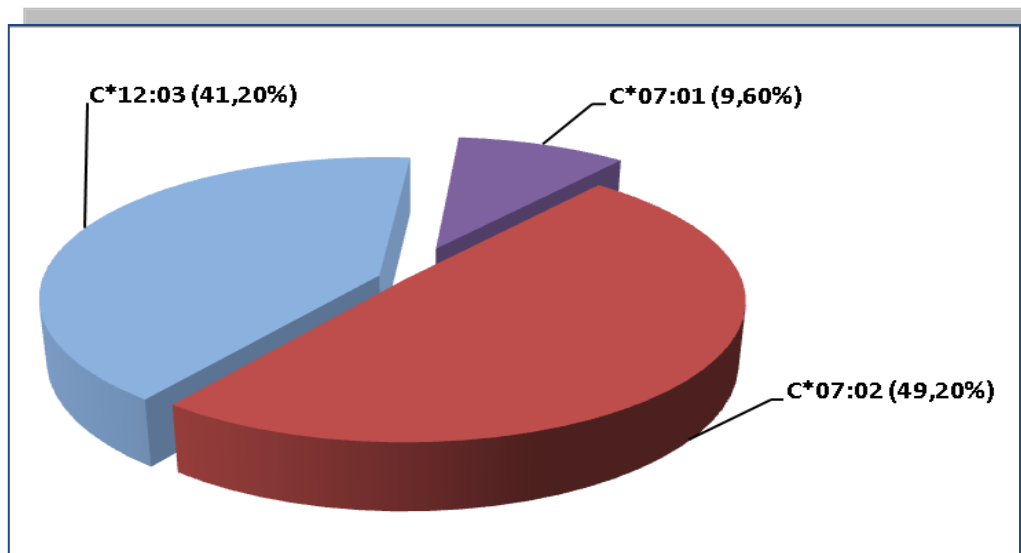
Raspodjela haplotipova HLA-B\*39:01~C pokazala je da su najčešći haplotipovi bili HLA-B\*39:01~C\*12:03 s učestalošću od preko 88% te HLA-B\*39:01~C\*07:02 s učestalošću od 6,7% (slika 66). Alel HLA-B\*39:06 pokazao je približno jednaku zastupljenost u dvije kombinacije: s alelom HLA-B\*07:02 (49,2%) i alelom HLA-C\*12:03 (41,2%) (slika 67). Međusobna usporedba haplotipova genske skupine HLA-B\*39 pokazala je statistički značajne razlike u raspodjeli za haplotip HLA-B\*39:01~C\*12:03 u usporedbi s haplotipom HLA-B\*39:06~C\*12:03 ( $p < 0,0001$ ). Također, alel HLA-B\*39:06 statistički je značajno češće tvorio haplotipove s alelima HLA-C\*07:01 i -C\*07:02 nego alel HLA-B\*39:01 (slika 68).



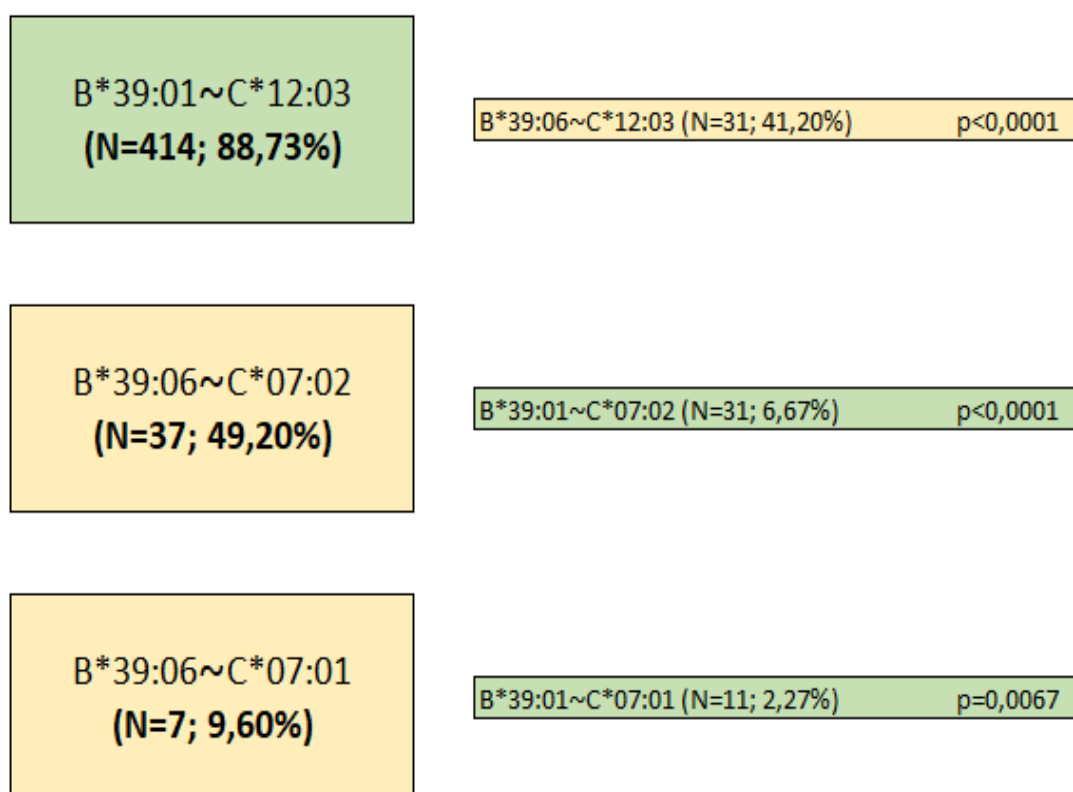
Slika 65. Raspodjela alela gena HLA-B\*39 u hrvatskoj populaciji (N=592)



Slika 66. Raspodjela haplotipova HLA-B\*39:01~C u hrvatskoj populaciji (N=466)



Slika 67. Raspodjela haplotipova HLA-B\*39:06~C u hrvatskoj populaciji (N=75)



Slika 68. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*39~C. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)



#### 4.1.5. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Sljedeći analizirani haplotipovi HLA bili su haplotipovi HLA-B~DRB1. Od ukupno 998 uočenih haplotipova HLA-B~DRB1, 50 najčešćih prikazano je u tablici 19. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciju pokazala je da je samo jedan haplotip (HLA-B\*08:01~DRB1\*03:01) imao učestalost veću od 5,0%, a četiri haplotipa učestalost veću od 2,0% (tablica 19). Unutar skupine 50 najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1, njih 40 imalo je pozitivnu vrijednost LD-a, a za 5 haplotipova vrijednost neravnoteže udruživanja nije bila statistički značajna. Deset haplotipova imalo je negativnu vrijednost neravnoteže udruživanja. Lista preostalih haplotipova HLA-B~DRB1 nalazi se u dodatku, tablica S3.

Kao i u analizama haplotipova HLA-B~C, i u istraživanjima haplotipova HLA-B~DRB1 pratili smo i međusobno uspoređivali alele pojedinih genskih skupina HLA-B koji tvore različite haplotipove s alelima lokusa HLA-DRB1. Ovom analizom obuhvaćene su genske skupine HLA-B\*15, -B\*27, -B\*35, -B\*39, -B\*40 i -B\*44, odnosno skupine s dva ili više vrlo čestih alela i učestalošću  $\geq 3\%$ .

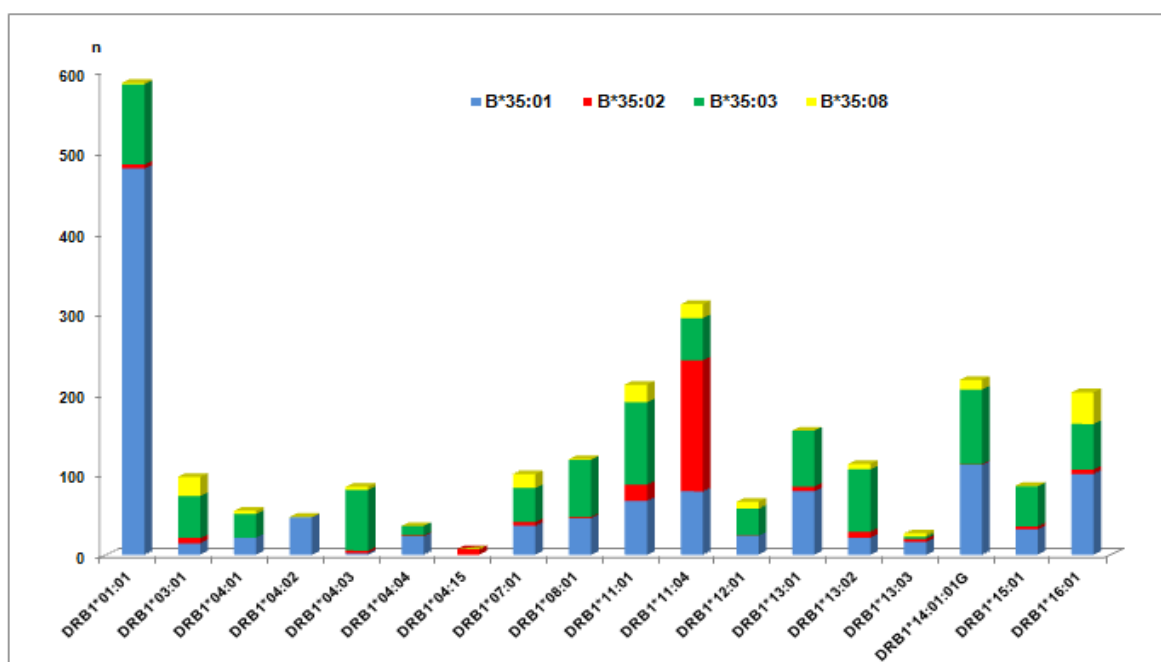
Tablica 19. Raspodjela 50 najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-B*~DRB1*	f (%)	LD	p	HLA-B*~DRB1*	f (%)	LD	p
08:01~03:01	6,789	0,05937	<0,0001	15:01~13:01	0,674	0,00419	<0,0001
18:01~11:04	3,524	0,02834	<0,0001	51:01~08:01	0,599	0,00310	<0,0001
07:02~15:01	3,501	0,02884	<0,0001	18:01~01:01	0,598	-0,00232	<0,0001
35:01~01:01	2,404	0,01807	<0,0001	50:01~07:01	0,582	0,00469	0,2235
13:02~07:01	2,361	0,02059	<0,0001	18:01~11:01	0,552	-0,00135	0,0005
27:05~01:01	1,829	0,01445	<0,0001	35:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,549	0,00328	<0,0001
51:01~11:01	1,796	0,00961	0,1	44:02:01G~04:01 <sup>a</sup>	0,545	0,00400	0,0133
44:03~07:01	1,759	0,01523	<0,0001	51:01~04:02	0,545	0,00299	<0,0001
27:02~16:01	1,624	0,01402	<0,0001	15:01~01:01	0,529	0,00139	<0,0001
44:02:01G~16:01 <sup>a</sup>	1,433	0,00921	<0,0001	51:01~07:01	0,526	-0,00412	0,0203
18:01~15:01	1,247	0,00495	0,0003	35:03~11:01	0,514	0,00110	0,6674
38:01~13:01	1,154	0,00861	<0,0001	07:02~01:01	0,513	-0,00167	<0,0001
57:01~07:01	1,138	0,00921	0,0002	38:01~15:01	0,512	0,00105	<0,0001
51:01~13:01	1,069	0,00409	<0,0001	35:01~16:01	0,503	-0,00119	<0,0001
38:01~04:02	1,016	0,00907	<0,0001	35:03~01:01	0,498	0,00010	<0,0001
39:01~16:01	1,008	0,00774	<0,0001	57:01~16:01	0,485	0,00242	<0,0001
14:02~01:02	0,913	0,00888	<0,0001	51:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,483	0,00109	<0,0001
51:01~01:01	0,909	-0,00100	<0,0001	14:02~03:01	0,469	0,00236	0,9052
52:01~15:02	0,893	0,00874	<0,0001	51:01~04:04	0,464	0,00272	1
51:01~16:01	0,863	-0,00187	<0,0001	07:02~11:01	0,456	-0,00106	<0,0001
40:02~11:01	0,856	0,00687	<0,0001	35:03~14:01:01G <sup>b</sup>	0,455	0,00275	<0,0001
15:01~04:01	0,851	0,00735	<0,0001	51:01~15:01	0,441	-0,00474	<0,0001
35:02~11:04	0,814	0,00713	<0,0001	44:05~16:01	0,438	0,00325	<0,0001
18:01~16:01	0,803	-0,00061	<0,0001	44:02:01G~13:01 <sup>a</sup>	0,431	0,00109	<0,0001
51:01~11:04	0,702	-0,00137	<0,0001	49:01~13:02	0,419	0,00347	<0,0001

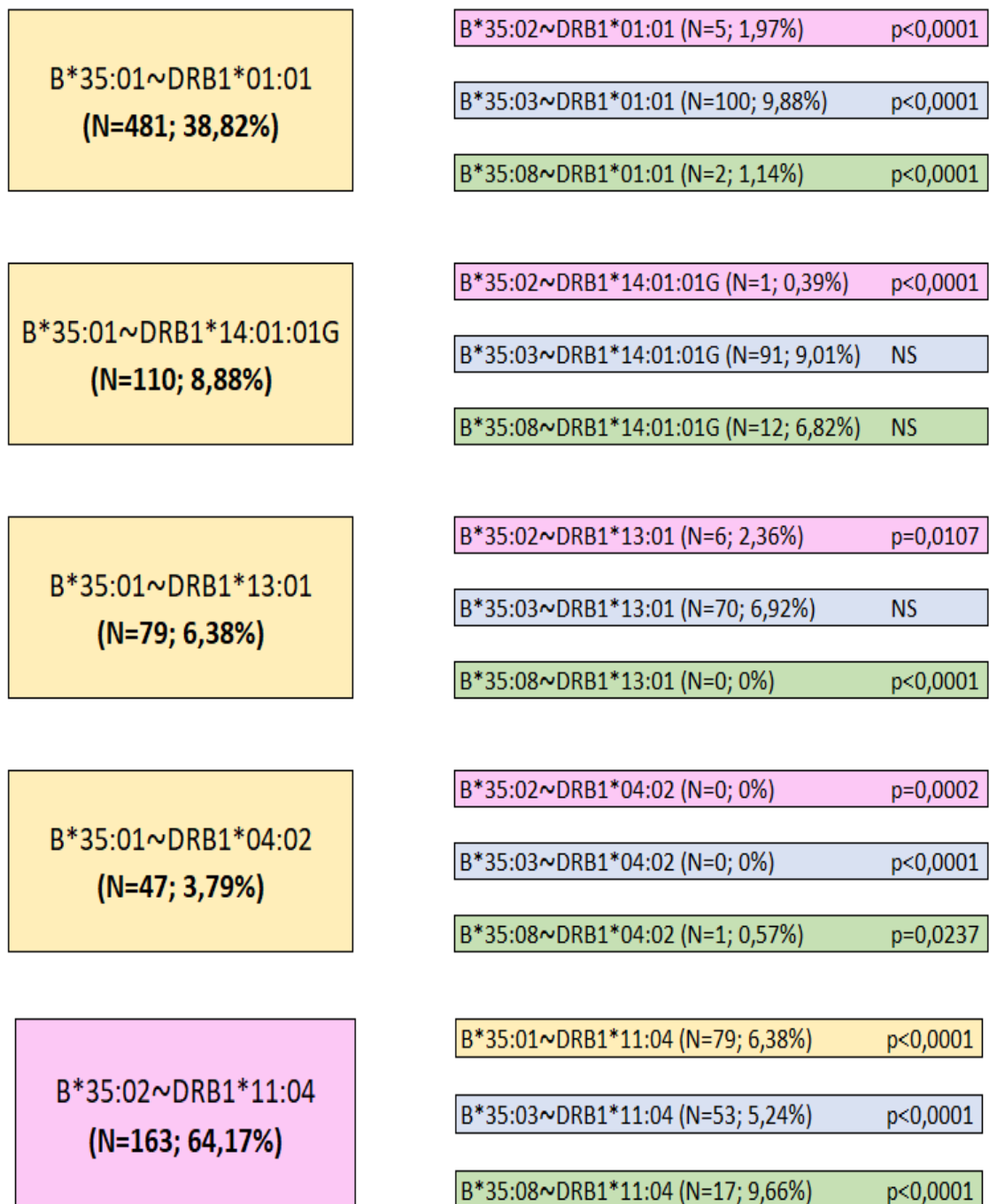
*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); crveno osjencanje - bez statističke značajnosti; zeleno osjencanje - negativna vrijednost neravnoteže udruživanja

#### 4.1.5.1. Raspodjela haplotipova HLA-B\*35~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Analiza raspodjele najčešćih haplotipova HLA-B\*35~DRB1 prikazana je na slici 69. Genska skupina HLA-B\*35 najčešće dolazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*01:01 (21,9%) te alelom -DRB1\*11:04 (11,6%). Međusobna usporedba učestalosti pojedinih haplotipova alela genske skupine HLA-B\*35~DRB1 prikazana je na slici 70. Na temelju dobivenih rezultata alel HLA-B\*35:01 statistički je značajno češće prisutan u kombinaciji s alelom HLA-DRB1\*01:01 nego aleli HLA-B\*35:02, -B\*35:03 i -B\*35:08. Statistička značajnost uočena je i za alel HLA-DRB1\*04:02 koji je također češći u haplotipu s alelom HLA-B\*35:01 nego s ostala tri uočena alela genske skupine HLA-B\*35. Istovremeno, alel HLA-B\*35:02 statistički je značajno češće tvorio haplotip s alelom HLA-DRB1\*11:04 nego drugi aleli genske skupine HLA-B\*35 ( $p < 0,0001$ ). Treći alel iz ove grupe, alel HLA-B\*35:03 je sa statistički značajnom razlikom u usporedbi s preostala tri alela genske skupine HLA-B\*35, uočen u kombinaciji s alelima HLA-DRB1\*04:03 i -DRB1\*08:01. Treba napomenuti da su još neki aleli lokusa HLA-DRB1 bili češći u haplotipu s alelom HLA-B\*35:03, ali bez statistički značajne razlike u usporedbi s ostalim alelima HLA-B\*35. Bez obzira na mali uzorak, haplotipovi HLA-B\*35:08~DRB1\*03:01 i HLA-B\*35:08~DRB1\*16:01 imali su statistički značajno veću učestalost u usporedbi s preostala tri alela genske skupine HLA-B\*35.



Slika 69. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*35~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=2684). n – broj uočenih haplotipova



Slika 70. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*35~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba nema statističke značajnosti

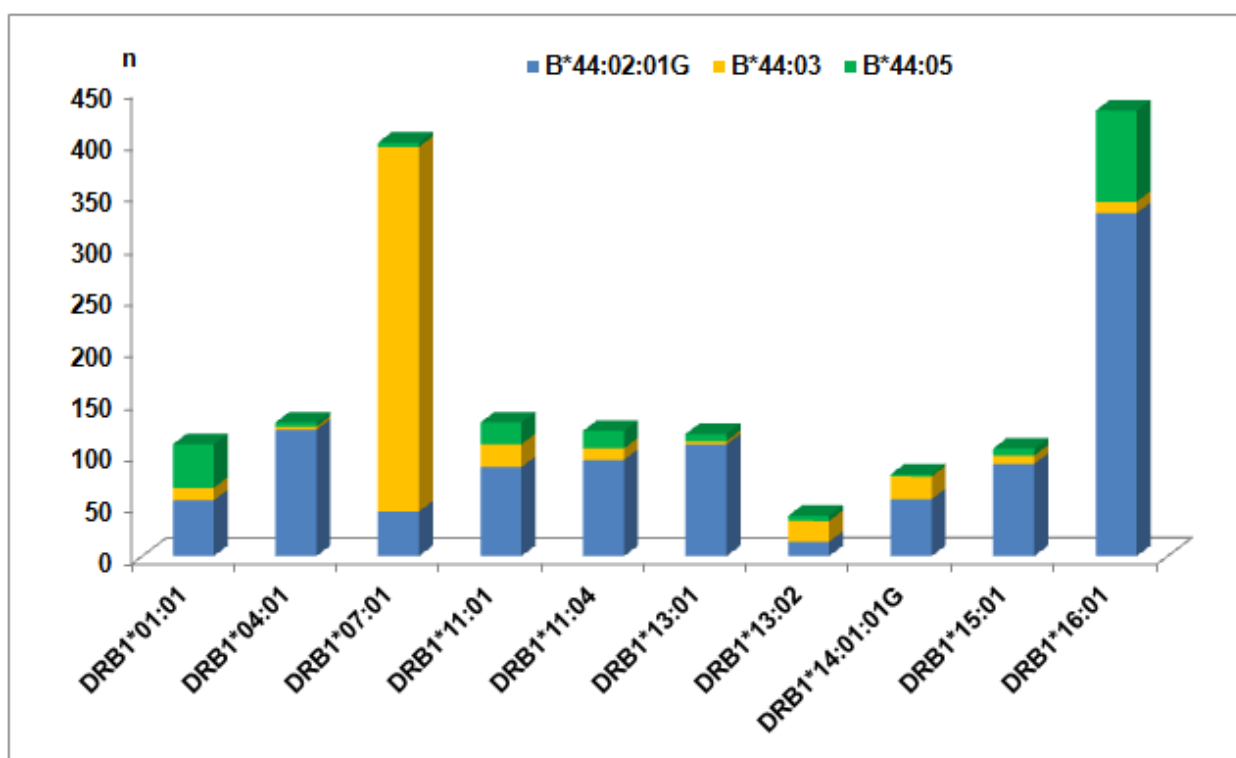
<b>B*35:03~DRB1*11:01</b> <b>(N=103; 10,18%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*11:01 (N=67; 5,41%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:02~DRB1*11:01 (N=20; 7,87%)</b> <b>NS</b>
	<b>B*35:08~DRB1*11:01 (N=22; 12,50%)</b> <b>NS</b>
<b>B*35:03~DRB1*13:02</b> <b>(N=78; 7,71%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*13:02 (N=21; 1,69%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:02~DRB1*13:02 (N=8; 3,15%)</b> <b>p=0,0078</b>
	<b>B*35:08~DRB1*13:02 (N=7; 3,98%)</b> <b>NS</b>
<b>B*35:03~DRB1*04:03</b> <b>(N=75; 7,41%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*04:03 (N=2; 0,16%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:02~DRB1*04:03 (N=3; 1,18%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:08~DRB1*04:03 (N=4; 2,27%)</b> <b>p=0,0083</b>
<b>B*35:03~DRB1*08:01</b> <b>(N=71; 7,02%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*08:01 (N=45; 3,63%)</b> <b>p=0,0004</b>
	<b>B*35:02~DRB1*08:01 (N=2; 0,79%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:08~DRB1*08:01 (N=1; 0,57%)</b> <b>p=0,0002</b>
<b>B*35:03~DRB1*04:01</b> <b>(N=30; 2,96%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*04:01 (N=21; 1,69%)</b> <b>p=0,0470</b>
	<b>B*35:02~DRB1*04:01 (N=0; 0%)</b> <b>p=0,0019</b>
	<b>B*35:08~DRB1*04:01 (N=4; 2,27%)</b> <b>NS</b>
<b>B*35:08~DRB1*16:01</b> <b>(N=39; 22,16%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*16:01 (N=101; 8,15%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:02~DRB1*16:01 (N=5; 1,97%)</b> <b>p=0,0001</b>
	<b>B*35:03~DRB1*16:01 (N=57; 5,63%)</b> <b>p=0,0203</b>
<b>B*35:08~DRB1*03:01</b> <b>(N=24; 13,64%)</b>	<b>B*35:01~DRB1*03:01 (N=14; 1,13%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:02~DRB1*03:01 (N=7; 2,76%)</b> <b>p&lt;0,0001</b>
	<b>B*35:03~DRB1*03:01 (N=52; 5,14%)</b> <b>p=0,0001</b>

Slika 70 - nastavak. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*35~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba nema statističke značajnosti

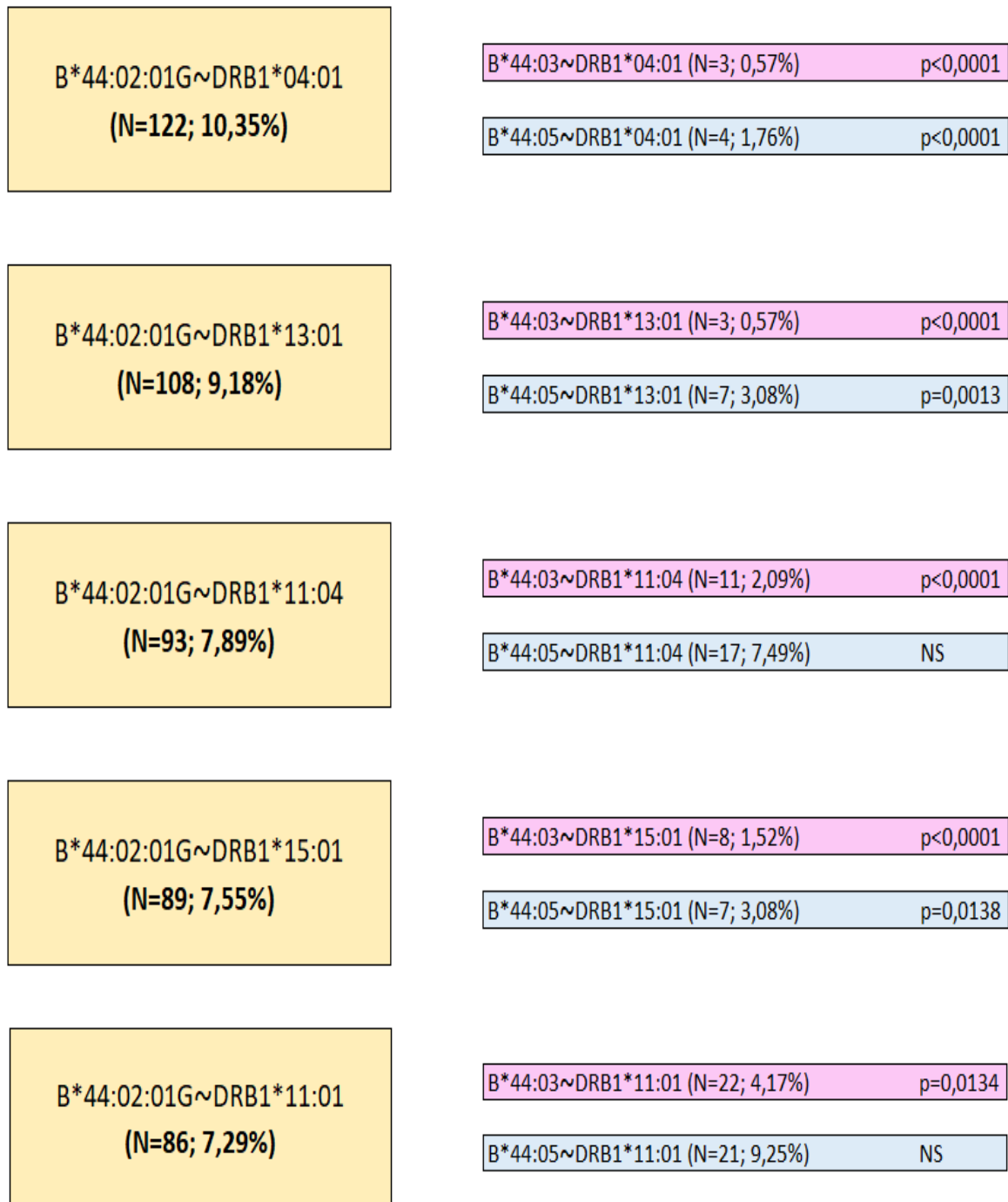
#### 4.1.5.2. Raspodjela haplotipova HLA-B\*44~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Aleli genske skupine HLA-B\*44 najčešće su se pojavljivali s alelima HLA-DRB1\*07:01 i -DRB1\*16:01 (slika 71).

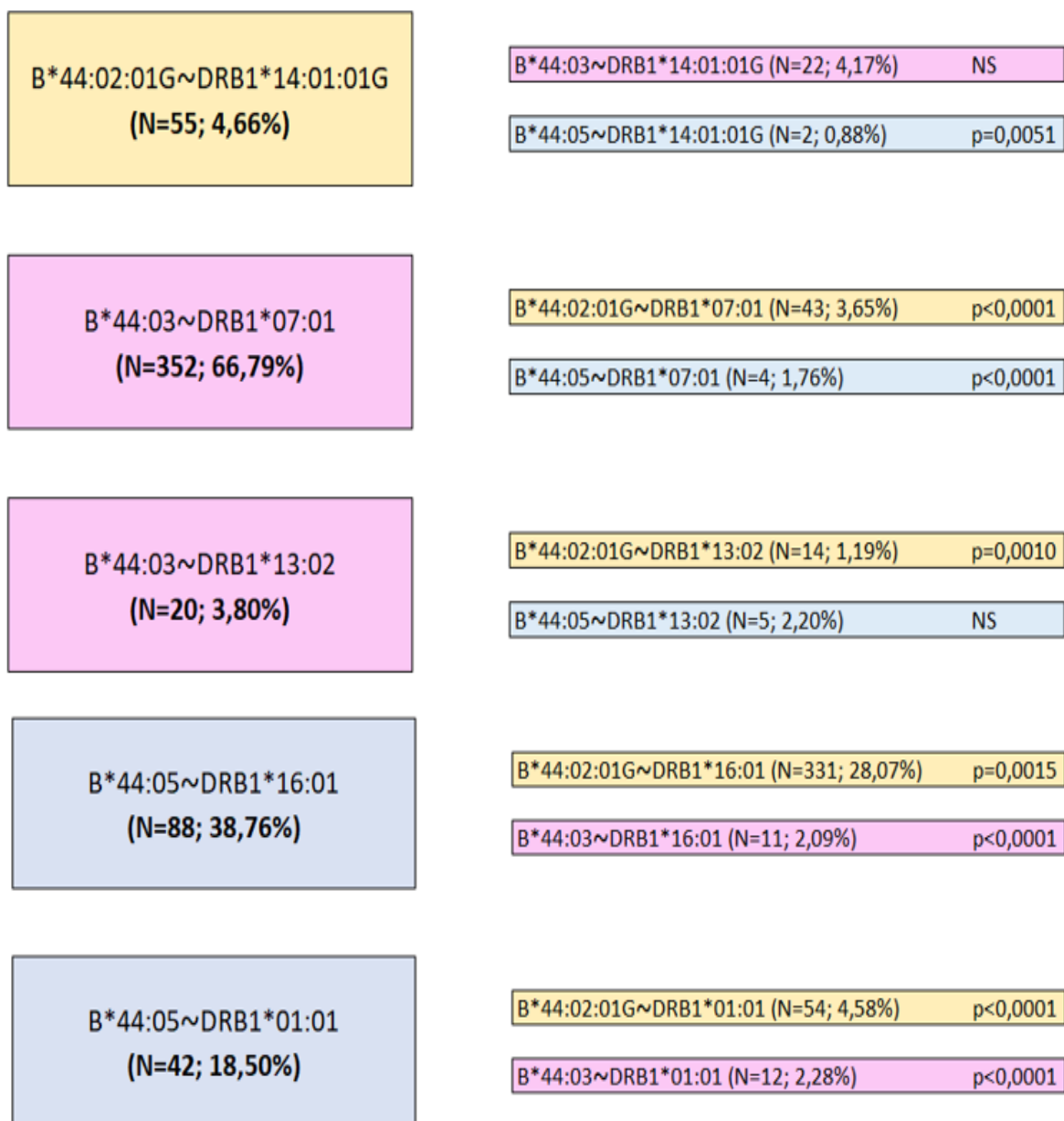
Usporedba pojedinih haplotipova HLA-B~DRB1 alela genske skupine HLA-B\*44 prikazana je na slici 72. Alel HLA-B\*44:02:01G statistički značajno češće tvori haplotipove s alelima HLA-DRB1\*04:01, -DRB1\*13:01 i -DRB1\*15:01 nego aleli HLA-B\*44:03 i -B\*44:05. Alel HLA-B\*44:03 statistički značajno češće tvori haplotip s alelom HLA-DRB1\*07:01 ( $p < 0,0001$ ) nego drugi aleli genske skupine HLA-B\*44, dok je alel HLA-B\*44:05 sa statistički značajnom razlikom, u usporedbi s preostalim alelima genske skupine HLA-B\*44, uočen u haplotipu s alelima HLA-DRB1\*01:01 i -DRB1\*16:01.



Slika 71. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*44~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=1945). n – broj uočenih haplotipova



Slika 72. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*44~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba nema statističke značajnosti



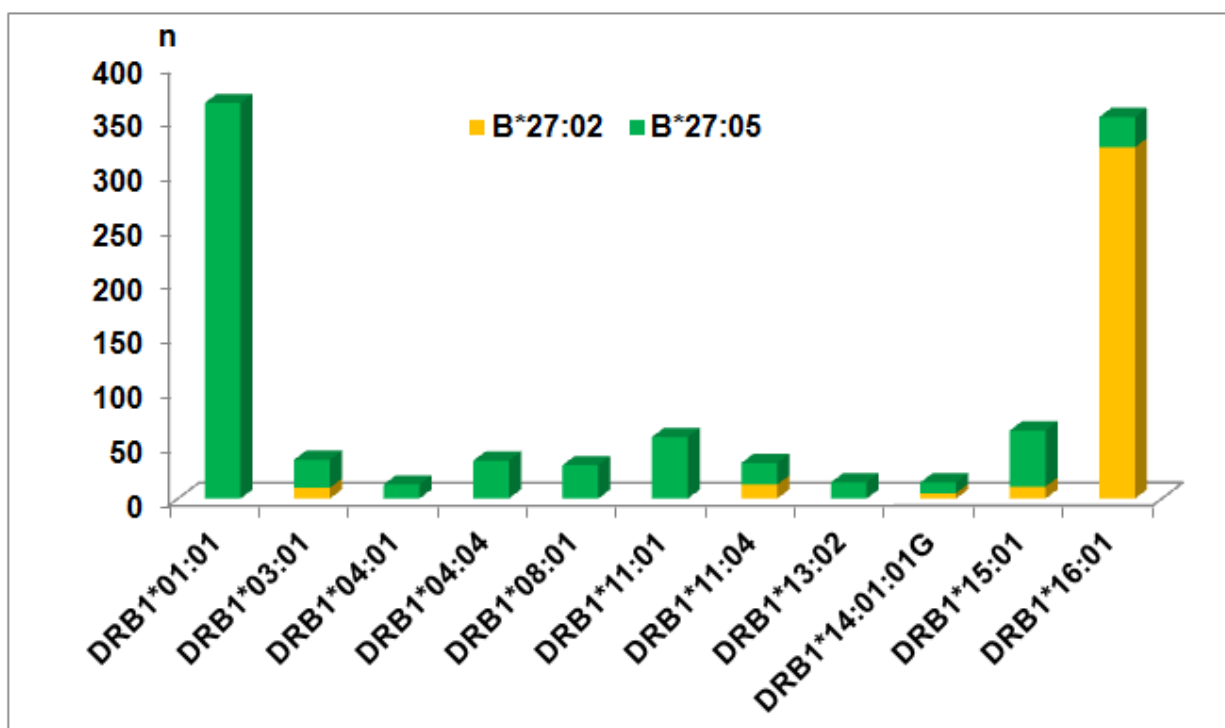
Slika 72 – nastavak. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*44~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba nema statističke značajnosti



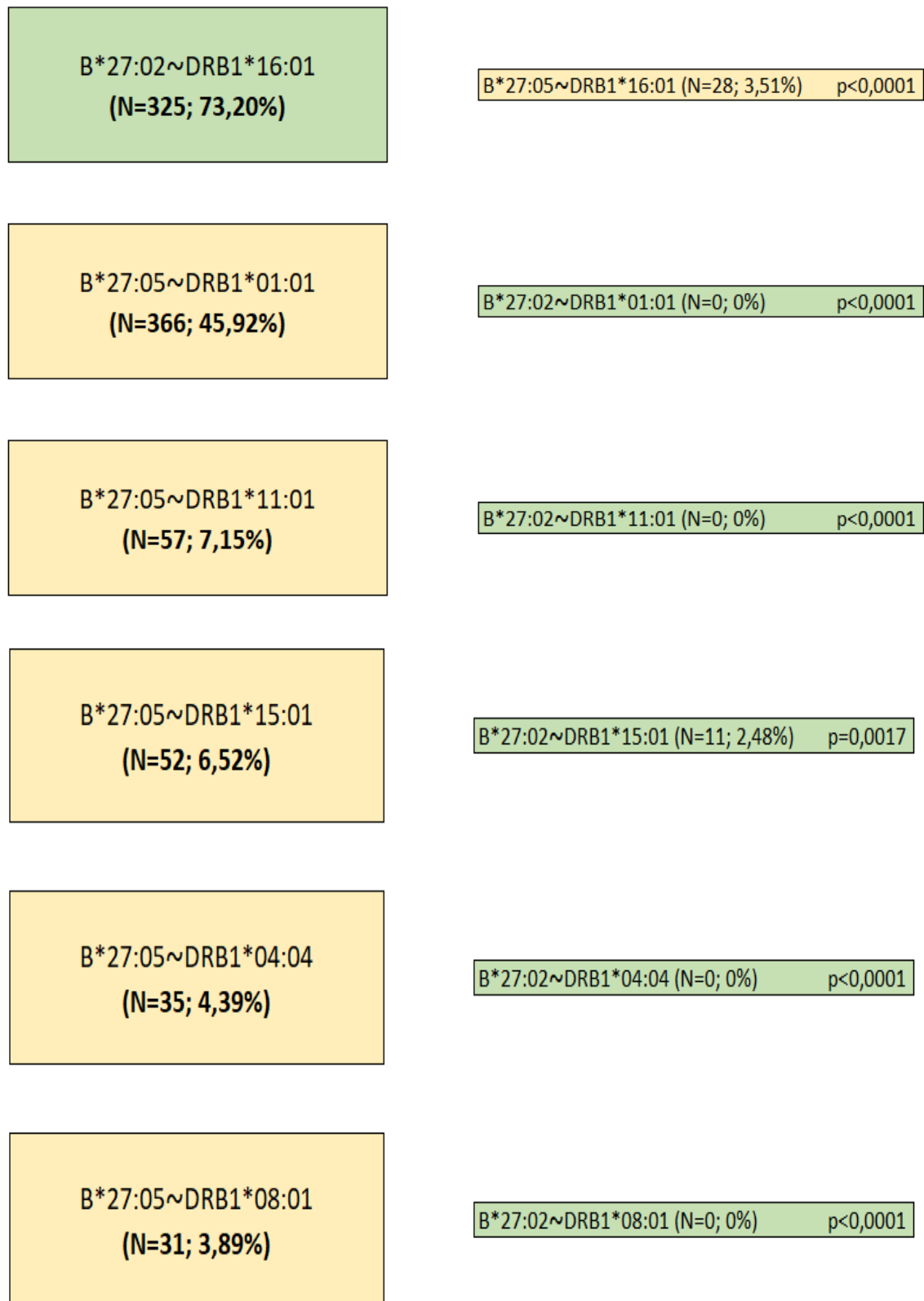
#### 4.1.5.3. Raspodjela haplotipova HLA-B\*27~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Najčešći aleli genske skupine HLA-B\*27 predominantno tvore haplotipove s alelima HLA-DRB1\*01:01 i -DRB1\*16:01 (slika 73).

Alel HLA-B\*27:02 statistički značajno češće dolazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*16:01 nego alel HLA-B\*27:05 ( $p < 0,0001$ ). Istovremeno, alel HLA-B\*27:05 statistički značajno češće tvori haplotip s alelom HLA-DRB1\*01:01 nego alel HLA-B\*27:02. Također, alel HLA-B\*27:05 pokazuje i puno veći polimorfizam formiranja haplotipova s alelima lokusa HLA-DRB1. Od devet preostalih alela HLA-DRB1 s kojima se još pojavljuje alel HLA-B\*27:05, najčešći su HLA-DRB1\*03:01, -DRB1\*04:04, -DRB1\*08:01, -DRB1\*11:01, -DRB1\*13:02 i -DRB1\*15:01 (slika 74).



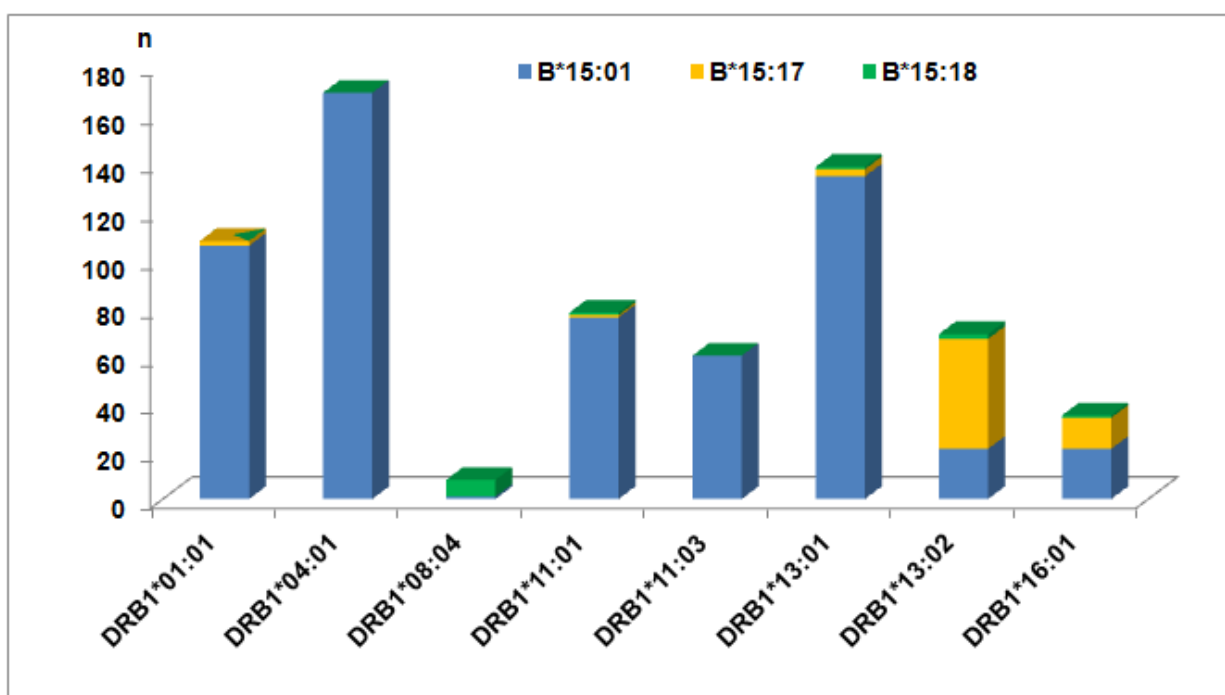
Slika 73. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*27~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=1259). n – broj uočenih haplotipova



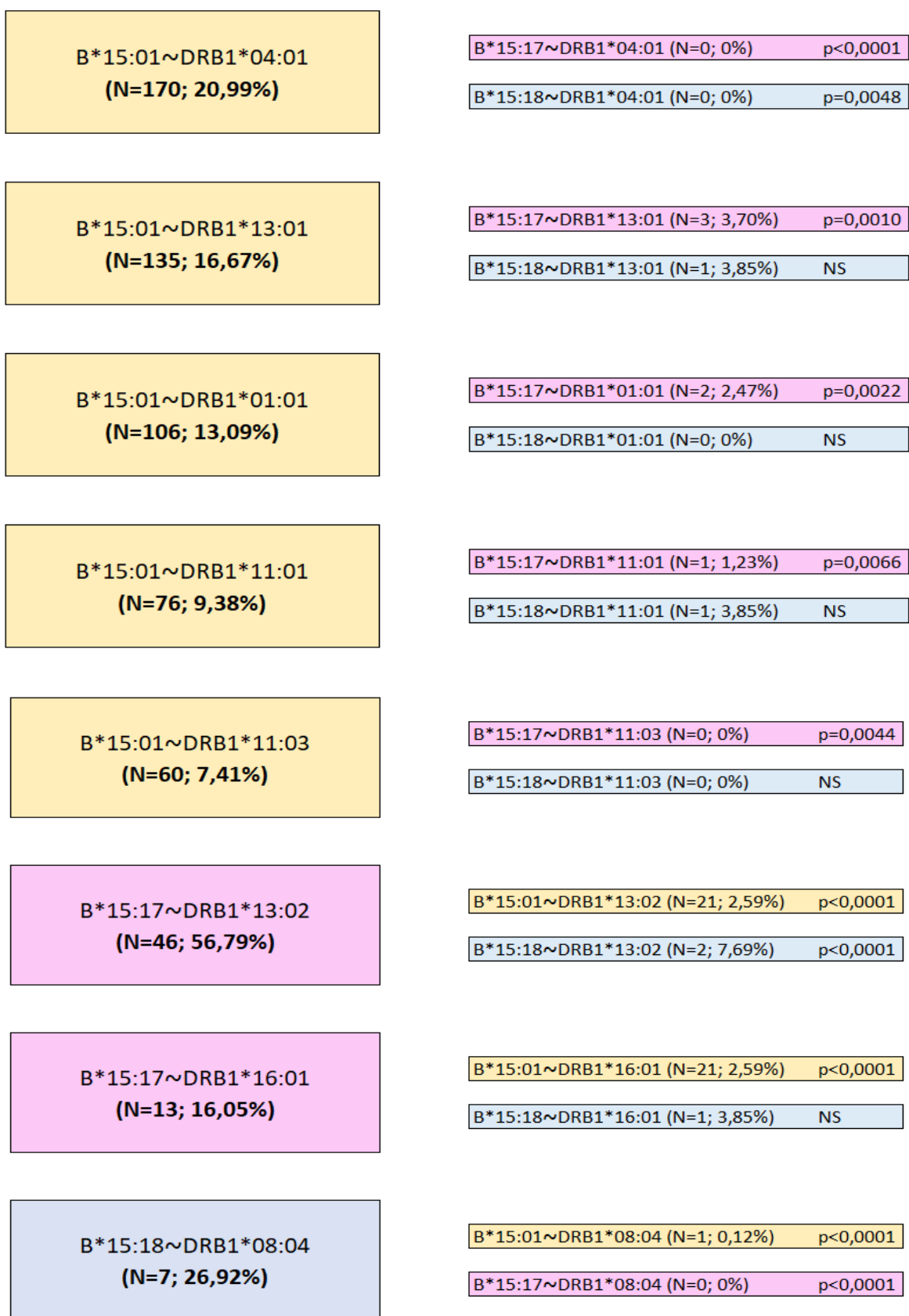
Slika 74. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*27~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim učenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

#### 4.1.5.4. Raspodjela haplotipova HLA-B\*15~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Aleli skupine HLA-B\*15 najčešće se nalaze u haplotipu s alelima HLA-DRB1\*04:01 i -DRB1\*13:01 (slika 75). Usporedba raspodjele haplotipova pokazuje statistički značajno veću učestalost alela HLA-B\*15:01 u kombinacijama s alelima HLA-DRB1\*01:01, -DRB1\*04:01, -DRB1\*11:01, -DRB1\*11:03 i -DRB1\*13:01 u odnosu na alel HLA-B\*15:17. U odnosu na alel HLA-B\*15:18, alel HLA-B\*15:01 se statistički značajno češće pojavljuje samo s alelom HLA-DRB1\*04:01. S druge strane, alel HLA-B\*15:17 statistički značajno češće formira haplotip s alelom HLA-DRB1\*13:02 u odnosu na preostala dva alela B\*15, dok se s alelom HLA-DRB1\*16:01 pojavljuje statistički značajno češće, ali samo u odnosu na alel HLA-B\*15:01. Alel HLA-B\*15:18 statistički značajno češće dolazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*08:04 u usporedbi s oba preostala ispitivana alela HLA-B\*15 (slika 76).



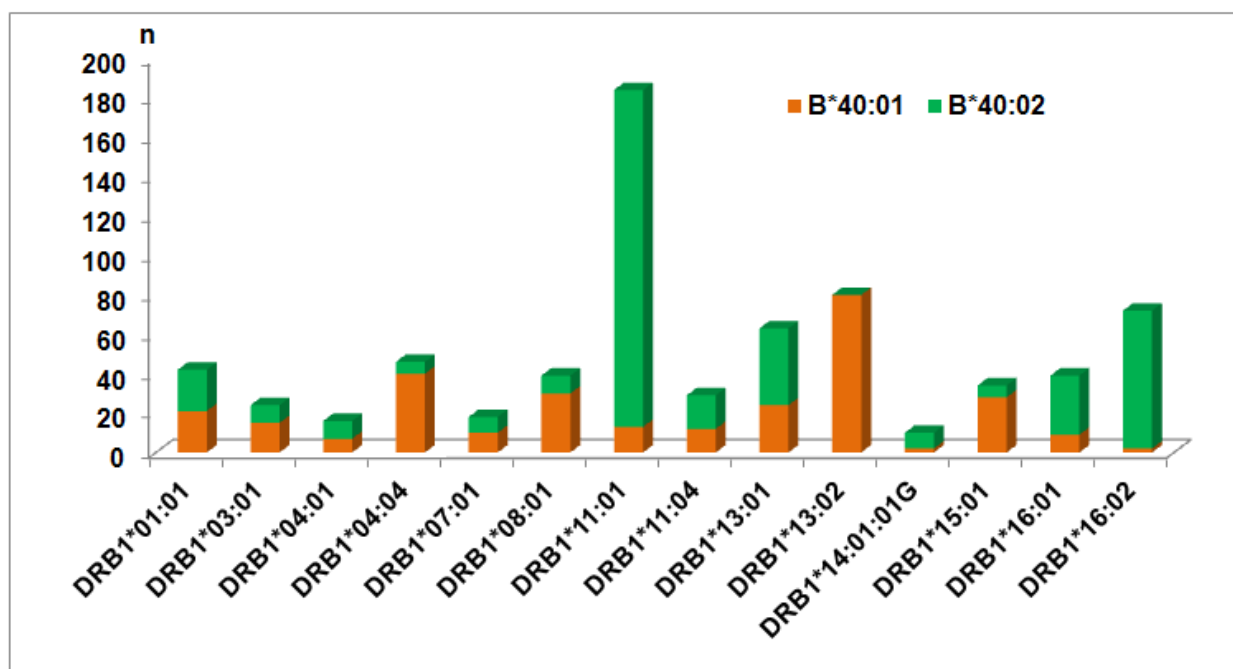
Slika 75. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*15~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=975). n – broj uočenih haplotipova



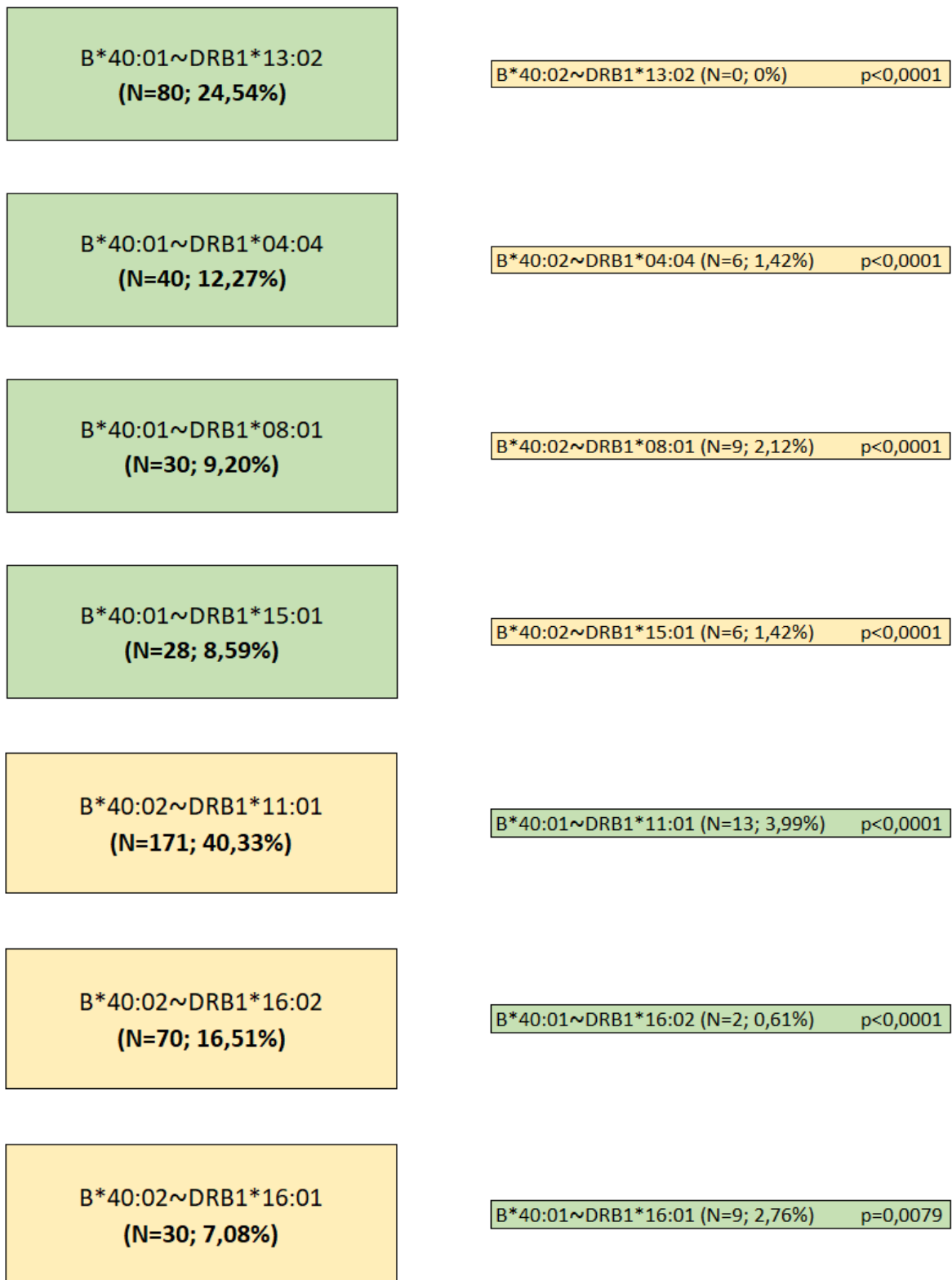
Slika 76. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*15~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno); NS – usporedba nema statističke značajnosti

#### 4.1.5.5. Raspodjela haplotipova HLA-B\*40~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Analiza haplotipova HLA-B~DRB1 uključila je i dva alela genske skupine HLA-B\*40 (slika 77). Alel HLA-B\*40:01 najčešće se, i statistički značajno češće negoli -B\*40:02, nalazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*13:02, a osim njega, statistički češće još dolazi u kombinaciji s alelima HLA-DRB1\*04:04, -DRB1\*08:01 i -DRB1\*15:01. Nasuprot tome, alel HLA-B\*40:02 statistički češće dolazi u kombinaciji s alelima HLA-DRB1\*11:01, HLA-DRB1\*16:01 i -DRB1\*16:02 (slika 78).



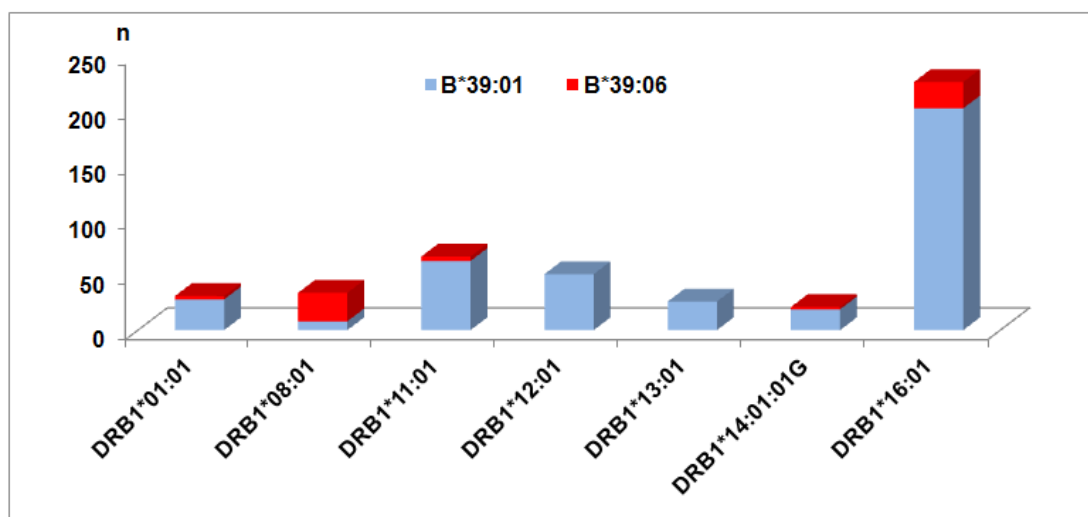
Slika 77. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*40~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=769). n – broj uočenih haplotipova



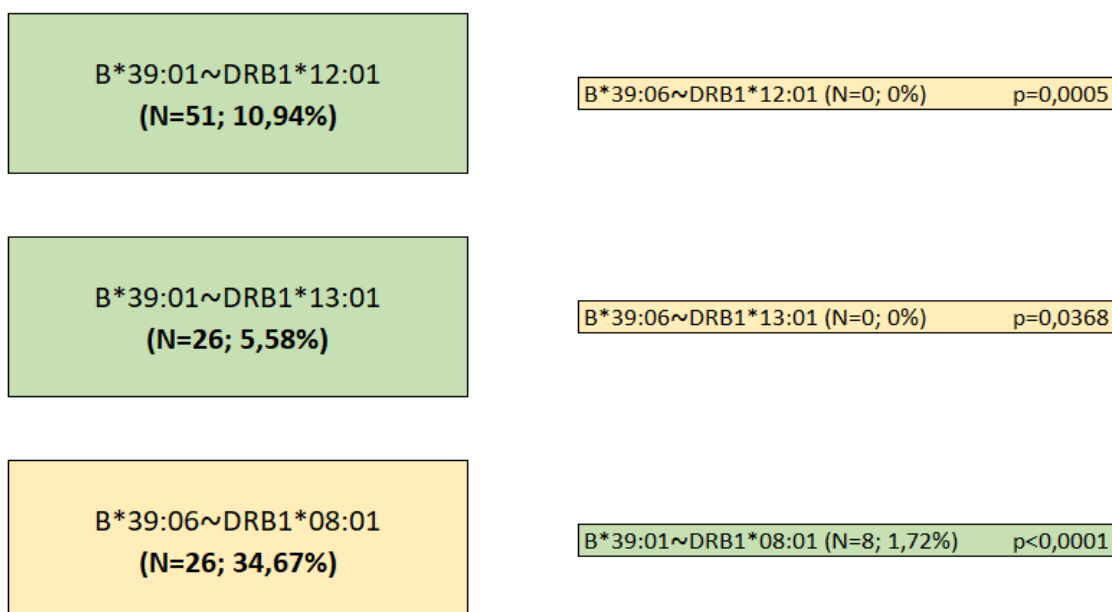
Slika 78. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*40~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

#### 4.1.5.6. Raspodjela haplotipova HLA-B\*39~DRB1 u hrvatskoj populaciji

Unutar skupine alela HLA-B\*39, najčešći uočeni haplotip bio je HLA-B\*39~DRB1\*16:01. Sve ostale kombinacije HLA-B\*39~DRB1 pojavile su se manje od 100 puta (slika 79). Statističku značajnost u usporedbi kombinacija koje čine aleli HLA-B\*39:01 i -B\*39:06 imali su samo haplotipovi HLA-B\*39:01~DRB1\*12:01 i HLA-B\*39:01~DRB1\*13:01 te HLA-B\*39:06~DRB1\*08:01 (slika 80).



Slika 79. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B\*39~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=592). n – broj uočenih haplotipova



Slika 80. Usporedba raspodjele haplotipova HLA-B\*39~DRB1. N – broj haplotipova; p – statistička značajnost, odnosi se na usporedbu haplotipa s najvećom učestalošću (lijevo) sa svakim pojedinim uočenim haplotipom unutar analizirane skupine (desno)

#### **4.1.6. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji**

Tablica 20 prikazuje raspodjelu 50 najčešćih, od ukupno 1414, haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji. Najčešći haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01 bio je prisutan s učestalošću od 6,1%, a sljedeća dva najčešća haplotipa HLA-A\*03:01~B\*07:02~C\*07:02 i HLA-A\*02:01~B\*18:01~C\*07:01 uočena su s približno sličnim frekvencijama (2,9% i 2,3%) Svih 50 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C imalo je statistički visoko značajne ( $p < 0,0001$ ) pozitivnu vrijednost LD-a. Lista preostalih haplotipova HLA-A~B~C nalazi se u dodatku, u tablici S4.

#### **4.1.7. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji**

Istraživanje haplotipova HLA-A~B~DRB1 u našoj populaciji, od 3490 uočenih haplotipova, istaknulo je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~DRB1\*03:01 kao najčešći haplotip s frekvencijom od 5,4%. Niti jedan drugi haplotip HLA-A~B~DRB1 nije imao učestalost veću od 2%. I među 50 najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 sve vrijednosti neravnoteže udruživanja bile su pozitivne, a za samo tri haplotipa (HLA-A\*02:01~B\*51:01~DRB1\*11:01, HLA-A\*02:01~B\*15:01~DRB1\*01:01, HLA-A\*02:01~B\*51:01~DRB1\*14:01:01G) ta vrijednost nije bila statistički značajna (tablica 21). Preostali haplotipovi HLA-A~B~DRB1 prikazani su u dodatku, u tablici S5.



Tablica 20. Raspodjela 50 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-A*~B*~C*	f (%)	LD	p	HLA-A*~B*~C*	f (%)	LD	p
01:01~08:01~07:01	6,085	0,05918	<0,0001	68:01~35:03~04:01	0,789	0,00759	<0,0001
03:01~07:02~07:02	2,900	0,02841	<0,0001	02:01~15:01~03:03	0,740	0,00694	<0,0001
02:01~18:01~07:01	2,292	0,01897	<0,0001	02:01~35:01~04:01	0,729	0,00461	<0,0001
11:01~35:01~04:01	1,844	0,01778	<0,0001	02:01~40:01~03:04	0,716	0,00702	<0,0001
26:01~38:01~12:03	1,714	0,01686	<0,0001	30:01~13:02~06:02	0,682	0,00679	<0,0001
02:01~44:02:01G~05:01 <sup>a</sup>	1,490	0,01430	<0,0001	24:02~13:02~06:02	0,662	0,00629	<0,0001
25:01~18:01~12:03	1,444	0,01415	<0,0001	24:02~35:01~04:01	0,659	0,00554	<0,0001
03:01~35:01~04:01	1,415	0,01314	<0,0001	32:01~40:02~02:02	0,656	0,00648	0,0316
02:01~27:05~02:02	1,377	0,01271	<0,0001	02:01~15:01~03:04	0,637	0,00603	<0,0001
02:01~27:02~02:02	1,366	0,01307	<0,0001	02:01~18:01~12:03	0,626	0,00324	<0,0001
33:01~14:02~08:02	1,351	0,01350	<0,0001	24:02~18:01~07:01	0,596	0,00441	<0,0001
02:01~51:01~14:02	1,308	0,01235	<0,0001	11:01~18:01~07:01	0,593	0,00496	<0,0001
02:01~38:01~12:03	1,274	0,01111	<0,0001	24:02~15:01~03:03	0,561	0,00543	<0,0001
23:01~44:03~04:01	1,228	0,01219	<0,0001	03:01~18:01~07:01	0,543	0,00394	<0,0001
02:01~13:02~06:02	1,173	0,01089	<0,0001	24:02~35:02~04:01	0,532	0,00510	<0,0001
02:01~51:01~15:02	1,173	0,01061	<0,0001	11:01~52:01~12:02	0,518	0,00517	<0,0001
02:01~51:01~01:02	1,080	0,00934	<0,0001	02:01~51:01~02:02	0,514	0,00235	<0,0001
02:01~07:02~07:02	1,103	0,00948	<0,0001	01:01~37:01~06:02	0,513	0,00503	<0,0001
02:01~51:01~01:02	1,080	0,00934	<0,0001	02:01~08:01~07:01	0,512	0,00143	<0,0001
02:01~44:02:01G~07:04 <sup>a</sup>	1,055	0,01022	<0,0001	24:02~44:02:01G~05:01 <sup>a</sup>	0,491	0,00468	<0,0001
24:02~07:02~07:02	0,970	0,00909	<0,0001	32:01~35:01~04:01	0,488	0,00449	<0,0001
03:01~35:03~04:01	0,889	0,00807	<0,0001	02:01~40:02~02:02	0,486	0,00429	<0,0001
02:01~57:01~06:02	0,884	0,00823	<0,0001	24:02~51:01~15:02	0,484	0,00440	<0,0001
02:01~35:03~04:01	0,867	0,00648	<0,0001	02:01~39:01~12:03	0,458	0,00376	<0,0001
01:01~57:01~06:02	0,811	0,00784	<0,0001	02:05~50:01~06:02	0,454	0,00453	<0,0001

*f* – frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Tablica 21. Raspodjela 50 najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

HLA-A*~B*~DRB1*	f(%)	LD	P	HLA-A*~B*~DRB1*	f(%)	LD	P
01:01~08:01~03:01	5,345	0,05233	<0,0001	02:01~51:01~13:01	0,431	0,00238	0,0017
02:01~18:01~11:04	1,615	0,01414	<0,0001	24:02~35:02~11:04	0,426	0,00414	<0,0001
03:01~07:02~15:01	1,531	0,01463	<0,0001	02:01~51:01~01:01	0,414	0,00120	<0,0001
02:01~27:02~16:01	1,120	0,01055	<0,0001	26:01~38:01~13:01	0,404	0,00390	<0,0001
02:01~13:02~07:01	1,003	0,00915	<0,0001	01:01~52:01~15:02	0,402	0,00400	<0,0001
02:01~27:05~01:01	0,979	0,00867	<0,0001	30:01~13:02~07:01	0,402	0,00399	<0,0001
02:01~44:02:01G~16:01 <sup>a</sup>	0,961	0,00812	<0,0001	33:01~14:02~03:01	0,402	0,00397	0,0012
03:01~35:01~01:01	0,905	0,00840	<0,0001	02:01~51:01~04:02	0,389	0,00317	<0,0001
23:01~44:03~07:01	0,886	0,00881	<0,0001	02:01~44:02:01G~04:01 <sup>a</sup>	0,385	0,00342	<0,0001
11:01~35:01~01:01	0,855	0,00812	<0,0001	02:01~18:01~16:01	0,371	0,00119	<0,0001
02:01~51:01~11:01	0,812	0,00569	0,1425	02:01~57:01~16:01	0,338	0,00267	<0,0001
25:01~18:01~15:01	0,753	0,00731	<0,0001	01:01~57:01~07:01	0,337	0,00309	<0,0001
26:01~38:01~04:02	0,677	0,00671	<0,0001	02:01~51:01~07:01	0,334	0,00061	<0,0001
02:01~51:01~16:01	0,620	0,00314	<0,0001	11:01~07:02~15:01	0,331	0,00287	<0,0001
33:01~14:02~01:02	0,614	0,00613	<0,0001	02:01~15:01~13:01	0,327	0,00252	0,0199
02:01~07:02~15:01	0,596	0,00416	<0,0001	02:01~15:01~01:01	0,322	0,00208	0,1335
02:01~15:01~04:01	0,577	0,00543	<0,0001	24:02~18:01~11:04	0,312	0,00233	<0,0001
02:01~57:01~07:01	0,514	0,00451	<0,0001	02:01~44:03~07:01	0,296	0,00227	<0,0001
02:01~51:01~08:01	0,502	0,00417	<0,0001	68:01~39:01~16:01	0,296	0,00286	<0,0001
03:01~18:01~11:04	0,492	0,00416	<0,0001	02:01~38:01~13:01	0,295	0,00210	<0,0001
11:01~18:01~11:04	0,492	0,00442	<0,0001	02:05~50:01~07:01	0,295	0,00294	<0,0001
02:01~08:01~03:01	0,489	0,00240	<0,0001	02:01~51:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,290	0,00181	0,3463
24:02~13:02~07:01	0,454	0,00419	<0,0001	01:01~18:01~11:04	0,280	0,00189	<0,0001
24:02~07:02~15:01	0,440	0,00369	<0,0001	24:02~08:01~03:01	0,277	0,00179	<0,0001
24:02~51:01~11:01	0,435	0,00339	<0,0001	02:01~44:02:01G~13:01 <sup>a</sup>	0,271	0,00177	0,0261

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); crveno osjencanje - bez statističke značajnosti

#### 4.1.8. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji

U uzorku od 10 000 nesrodnih dobrovoljnih davatelja ukupno su uočena 4263 haplotipa. Za 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1, prikazanih u tablici 22 napravljena je usporedba s njihovom učestalošću u bazi HaploStats u kojoj je učestalost haplotipova dobivena u skupini od približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe – EUR CAU te haplotipova generiranih iz skupine približno 1,8 milijuna uzoraka davatelja europskog porijekla - s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike – CAU [83].

Najčešći haplotip i jedini s frekvencijom većom od 5% u Hrvatskoj bio je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01. Još su četiri haplotipa imala frekvenciju veću od 1%. Svih 100 haplotipova imalo je pozitivnu vrijednost LD-a, a za njih 15 vrijednost LD-a nije bila statistički značajna (tablica 22 – crveno osjenčani). Dvadeset i tri haplotipa koji su u našem uzorku bili među 100 najčešćih u bazi HaploStats nisu bili u prvih 500 haplotipova prema učestalosti bilo u skupini EUR CAU ili CAU.

Usporedba naših najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 pokazala je sličnosti, ali i razlike za brojne haplotipove. Samo tri haplotipa koji se kod nas nalaze među prvih deset najučestalijih haplotipova, nalazi se i među prvih deset najučestalijih haplotipova i u skupini EUR CAU i CAU. Pet haplotipova je u ovim bazama među prvih 100, a haplotip HLA-A\*02:01~B\*27:02~C\*02:02~DRB1\*16:01 koji je u Hrvatskoj na četvrtom mjestu po učestalosti nalazi se tek na 130. poziciji u skupini EUR-CAU, a na 77. mjestu među CAU. Među prvih deset haplotipova prema učestalosti u našoj populaciji još se nalazi haplotip HLA-A\*02:01~B\*44:02:01G~C\*07:04~DRB1\*16:01 koji se ne nalazi među 100 najčešćih haplotipova među CAU, odnosno EUR CAU nego na 133., odnosno 213. poziciji.

S druge strane, haplotipovi HLA-A\*02:01~B\*44:02:01G~C\*05:01~DRB1\*04:01, HLA-A\*01:01~B\*57:01~C\*06:02~DRB1\*07:01 i HLA-A\*29:02~B\*44:03~C\*16:01~DRB1\*07:01 nalaze se prema učestalosti među prvih deset haplotipova u obje HaploStats baze dok se u Hrvatskoj nalaze na 28., 29. i 46. mjestu. Najveća razlika u učestalosti haplotipova uočena je za haplotipove HLA-A\*02:01~B\*35:03~C\*04:01~DRB1\*16:01, HLA-A\*02:01~B\*18:01~C\*12:03~DRB1\*01:01 i HLA-A\*32:01~B\*35:01~C\*04:01~DRB1\*16:01 koji su u našoj populaciji bili na pozicijama 61., 74. i 79. dok su u navedenim bazama bili niže od 2000. mjesta.

Tablica 22. Raspodjela 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	LD	p	EUR CAU*	CAU#
1	01:01~08:01~07:01~03:01	5,206	0,05189	<0,0001	1	1
2	02:01~18:01~07:01~11:04	1,569	0,01538	<0,0001	33	27
3	03:01~07:02~07:02~15:01	1,528	0,01523	<0,0001	2	2
4	02:01~27:02~02:02~16:01	1,102	0,01096	<0,0001	130	77
5	02:01~13:02~06:02~07:01	1,023	0,01015	<0,0001	16	15
6	03:01~35:01~04:01~01:01	0,921	0,00911	<0,0001	7	6
7	23:01~44:03~04:01~07:01	0,888	0,00887	<0,0001	14	14
8	11:01~35:01~04:01~01:01	0,841	0,00834	<0,0001	15	16
9	02:01~44:02:01G~07:04~16:01 <sup>a</sup>	0,800	0,00797	<0,0001	213	133
10	02:01~27:05~02:02~01:01	0,787	0,00777	<0,0001	99	64
11	25:01~18:01~12:03~15:01	0,751	0,00749	<0,0001	19	17
12	26:01~38:01~12:03~04:02	0,683	0,00682	<0,0001	27	23
13	33:01~14:02~08:02~01:02	0,606	0,00606	<0,0001	22	18
14	02:01~07:02~07:02~15:01	0,511	0,00497	<0,0001	4	3
15	02:01~08:01~07:01~03:01	0,486	0,00446	<0,0001	8	10
16	11:01~18:01~07:01~11:04	0,484	0,00476	<0,0001	390	393
17	02:01~57:01~06:02~07:01	0,478	0,00473	<0,0001	13	13
18	24:02~07:02~07:02~15:01	0,436	0,00431	<0,0001	11	12
19	24:02~13:02~06:02~07:01	0,435	0,00432	<0,0001	70	58
20	02:01~15:01~03:04~04:01	0,413	0,00412	<0,0001	9	8
21	24:02~35:02~04:01~11:04	0,411	0,00409	<0,0001	32	26
22	30:01~13:02~06:02~07:01	0,406	0,00406	<0,0001	12	11
23	02:01~51:01~01:02~04:02	0,403	0,00399	<0,0001	3429	2782
24	03:01~18:01~07:01~11:04	0,399	0,00387	<0,0001	482	431
25	33:01~14:02~08:02~03:01	0,397	0,00397	0,0015	156	148

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; crveno osjenčano - bez statističke značajnosti; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); #CAU – haplotipovi generirani iz baze s približno 1,8 mil uzoraka davatelja s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike; \*EUR CAU - haplotipovi generirani iz baze s približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe; rank >500 mjesta

Tablica 22 – nastavak. Raspodjela 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	LD	p	EUR CAU*	CAU <sup>#</sup>
26	01:01~52:01~12:02~15:02	0,396	0,00396	<0,0001	62	52
27	26:01~38:01~12:03~13:01	0,385	0,00383	<0,0001	64	55
28	02:01~44:02:01G~05:01~04:01 <sup>a</sup>	0,378	0,00376	<0,0001	3	4
29	01:01~57:01~06:02~07:01	0,341	0,00339	<0,0001	6	7
30	02:01~38:01~12:03~13:01	0,340	0,00330	<0,0001	88	65
31	02:01~57:01~06:02~16:01	0,323	0,00317	<0,0001	1507	1256
32	02:01~51:01~14:02~16:01	0,315	0,00307	0,1175	646	551
33	02:01~18:01~12:03~16:01	0,308	0,00278	<0,0001	2372	2138
34	02:05~50:01~06:02~07:01	0,295	0,00294	<0,0001	34	31
35	68:01~39:01~12:03~16:01	0,293	0,00292	<0,0001	1694	1462
36	02:01~51:01~14:02~08:01	0,271	0,00269	<0,0001	138	124
37	01:01~18:01~07:01~11:04	0,265	0,00251	<0,0001	324	322
38	02:01~40:02~02:02~11:01	0,257	0,00252	<0,0001	140	114
39	24:02~51:01~15:02~11:01	0,256	0,00252	<0,0001	507	552
40	03:01~07:02~07:02~11:01	0,250	0,00245	<0,0001	84	71
41	68:01~35:03~04:01~08:01	0,250	0,00249	<0,0001	369	328
42	02:01~15:01~03:03~13:01	0,246	0,00243	<0,0001	24	20
43	02:01~44:05~02:02~16:01	0,237	0,00234	<0,0001	285	226
44	11:01~35:01~04:01~16:01	0,233	0,00226	0,0002	841	799
45	11:01~07:02~07:02~15:01	0,230	0,00227	<0,0001	30	33
46	29:02~44:03~16:01~07:01	0,226	0,00226	<0,0001	5	5
47	02:01~38:01~12:03~15:01	0,222	0,00207	1	843	728
48	11:01~52:01~12:02~01:01	0,216	0,00216	<0,0001	562	382
49	24:02~08:01~07:01~03:01	0,210	0,00195	<0,0001	46	51
50	02:01~41:02~17:03~13:03	0,209	0,00209	<0,0001	318	246

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; crveno osjenčano - bez statističke značajnosti; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); <sup>#</sup>CAU – haplotipovi generirani iz baze s približno 1,8 mil uzoraka davatelja s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike; \*EUR CAU - haplotipovi generirani iz baze s približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe; rank >500 mjesta

Tablica 22 – nastavak. Raspodjela 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	LD	p	EUR CAU*	CAU <sup>#</sup>
51	01:01~13:02~06:02~07:01	0,207	0,00203	<0,0001	104	86
52	02:01~51:01~02:02~11:01	0,205	0,00182	<0,0001	94	81
53	02:01~35:01~04:01~01:01	0,204	0,00178	0.0107	43	34
54	03:01~27:02~02:02~16:01	0,203	0,00201	<0,0001	791	539
55	11:01~51:01~15:02~04:04	0,202	0,00202	<0,0001	149	143
56	01:01~37:01~06:02~15:01	0,202	0,00201	<0,0001	61	73
57	02:01~27:05~01:02~01:01	0,202	0,00196	<0,0001	40	54
58	03:01~07:02~07:02~01:01	0,200	0,00194	<0,0001	29	28
59	24:02~38:01~12:03~13:01	0,196	0,00192	<0,0001	272	232
60	01:01~49:01~07:01~13:02	0,195	0,00194	<0,0001	564	560
61	02:01~35:03~04:01~16:01	0,195	0,00173	0.4449	3252	2090
62	03:01~35:03~04:01~04:03	0,192	0,00191	<0,0001	334	329
63	32:01~40:02~02:02~16:02	0,192	0,00191	<0,0001	714	628
64	02:01~40:01~03:04~13:02	0,190	0,00189	<0,0001	10	9
65	03:01~35:03~04:01~01:01	0,189	0,00181	0.5019	657	503
66	02:01~44:02:01G~05:01~13:01 <sup>a</sup>	0,189	0,00185	0.9294	21	21
67	02:01~51:01~15:02~07:01	0,188	0,00178	0.5467	411	449
68	02:01~51:01~14:02~01:01	0,188	0,00180	0.0473	230	248
69	02:01~15:01~04:01~01:01	0,186	0,00169	<0,0001	262	233
70	03:01~07:02~07:02~13:02	0,185	0,00183	0.0757	92	100
71	30:04~14:01~08:02~04:04	0,185	0,00185	<0,0001	2178	1678
72	02:01~35:03~12:03~14:01:01G <sup>b</sup>	0,184	0,00177	<0,0001	786	619
73	02:01~18:01~07:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,182	0,00168	0.5163	429	418
74	02:01~18:01~12:03~01:01	0,182	0,00152	0.0086	2096	2199
75	02:01~51:01~01:02~11:01	0,181	0,00169	0.7780	536	342

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; crveno osjenčano - bez statističke značajnosti; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); <sup>#</sup>CAU – haplotipovi generirani iz baze s približno 1,8 mil uzoraka davatelja s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike; \*EUR CAU - haplotipovi generirani iz baze s približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe; plavo osjenčano – rank >500 mjesta

Tablica 22 – nastavak. Raspodjela 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000)

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	LD	p	EUR CAU*	CAU#
76	02:01~35:03~04:01~11:04	0,00179	0,00161	0.0953	1170	882
77	02:01~52:01~12:02~15:02	0,00178	0,00178	<0.0001	139	110
78	02:01~35:01~04:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,00176	0,00166	<0.0001	173	147
79	32:01~35:01~04:01~16:01	0,00174	0,00170	0.0003	3881	2904
80	02:01~18:01~07:01~11:01	0,00174	0,00142	<0.0001	168	113
81	02:01~35:03~04:01~11:01	0,00173	0,00156	0.1430	584	419
82	02:01~39:01~12:03~16:01	0,00166	0,00157	0.0004	309	289
83	11:01~52:01~12:02~15:02	0,00165	0,00165	<0.0001	80	66
84	68:02~53:01~04:01~13:02	0,00165	0,00165	<0.0001	117	117
85	01:01~07:02~07:02~15:01	0,00164	0,00157	<0.0001	18	19
86	02:01~38:01~12:03~11:04	0,00161	0,00147	0.1412	1251	1125
87	02:01~38:01~12:03~04:02	0,00160	0,00156	<0.0001	1494	1275
88	02:01~51:01~15:02~01:01	0,00159	0,00148	0.0239	443	533
89	24:02~07:02~07:02~01:01	0,00158	0,00152	0.3584	144	109
90	24:02~51:01~01:02~11:01	0,00158	0,00153	<0.0001	479	341
91	02:01~44:02:01G~05:01~15:01 <sup>a</sup>	0,00158	0,00152	0.0014	20	24
92	26:01~07:02~07:02~15:01	0,00158	0,00155	<0.0001	147	127
93	11:01~35:01~04:01~14:01:01G	0,00157	0,00154	0.3531	81	76
94	02:01~51:01~15:02~13:01	0,00156	0,00148	0.7657	355	309
95	03:01~44:02:01G~07:04~16:01 <sup>a</sup>	0,00156	0,00154	<0.0001	461	337
96	24:02~15:01~03:03~13:01	0,00156	0,00154	<0.0001	52	41
97	03:01~07:02~07:02~16:01	0,00155	0,00149	<0.0001	383	320
98	01:01~08:01~07:01~15:01	0,00150	0,00135	<0.0001	23	25
99	33:03~58:01~03:02~13:02	0,00150	0,00150	<0.0001	310	256
100	26:01~27:05~01:02~01:01	0,00149	0,00148	<0.0001	113	132

*f* - frekvencija haplotipa; *LD* - neravnoteža udruživanja; *p* - statistička značajnost; crveno osjenčano - bez statističke značajnosti; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54); #CAU – haplotipovi generirani iz baze s približno 1,8 mil uzoraka davatelja s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike; \*EUR CAU - haplotipovi generirani iz baze s približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe; plavo osjenčano – rank >500 mjesta

#### 4.2. RAZNOVRSNOST I UČESTALOST ALELA I HAPLOTIPOVA HLA U PROGRAMU TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA S NESRODNIM DAVATELJEM

U ovom djelu istraživanja analizirana je raznovrsnost i učestalost alela i haplotipova HLA u skupini 261 bolesnika koji su transplantirani u programu TKMS s nesrodnim davateljem te podudarnost alela i haplotipova HLA s pripadajućim nesrodnim davateljem. Prosječna dob bolesnika bila je 38 godina, a omjer spolova bio je 1,4:1 u korist muškaraca. Omjer spolova u skupini davatelja bio je 1,2:1 u korist muškaraca. Više od 50% bolesnika bolovalo je od akutne leukemije. Sveopće karakteristike bolesnika liječenih TKMS od nesrodnog davatelja prikazane su u tablici 23.

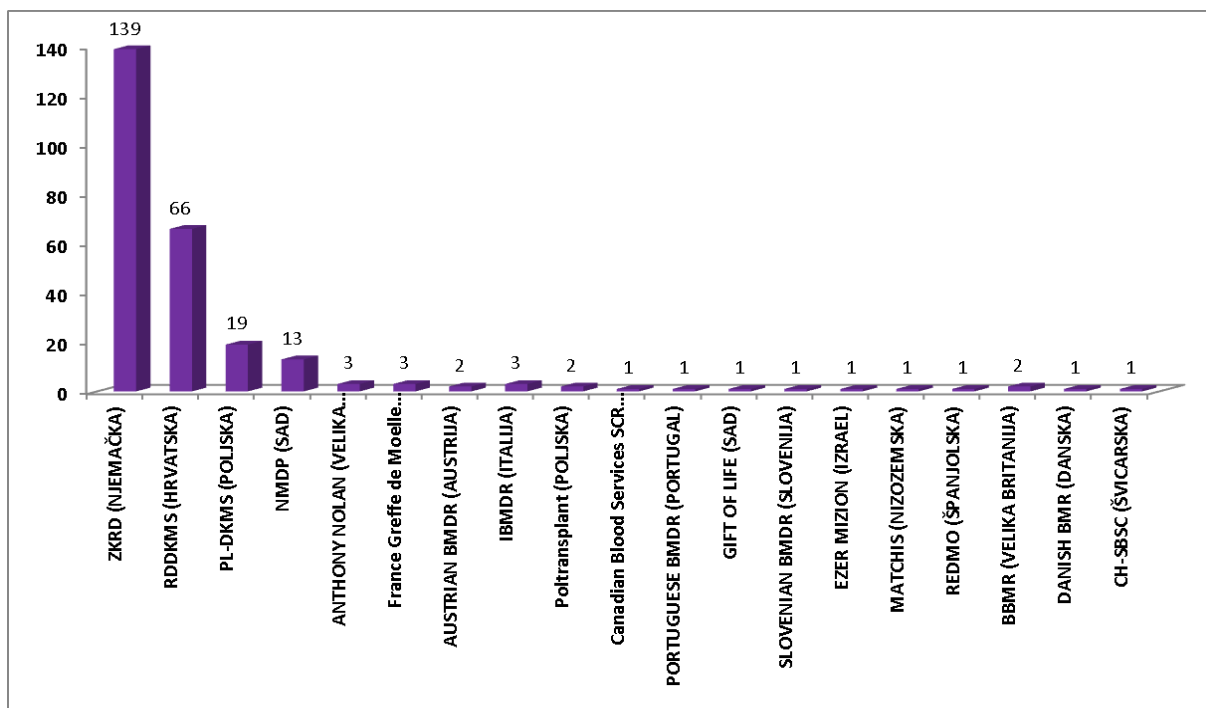
Tablica 23. Raspodjela bolesnika (N=261) prema dobi, dijagnozi i podudarnosti po spolu između ispitanika i nesrodnog davatelja krvotvornih matičnih stanica; bolesnici liječeni u KBC Zagreb u razdoblju od 2012.-2017. g.

<b>Bolesnici u programu TKMS (N=261)</b>	
Dob ispitanika (godine)	
Medijan (raspon)	38 (0,5-70)
Spol (Ž/M)	110/151
Dijagnoza	N (%)
AML	86 (32,95)
ALL	63 (24,14)
CML	17 (6,51)
CLL	6 (2,30)
NHL	14 (5,36)
HL	8 (3,07)
AA	5 (1,92)
MDS	29 (11,11)
SCID	6 (2,30)
ostalo	27 (10,34)
Odnos spola bolesnik/davatelj	N (%)
M/M	87 (33,34)
M/Ž	64 (24,52)
Ž/M	55 (21,07)
Ž/Ž	55 (21,07)

*TKMS – transplantacija krvotvornih matičnih stanica; M - muškarac; Ž - žena; AML - akutna mijeloična leukemija; ALL - akutna limfocitna leukemija; CML - kronična mijeloična leukemija; CLL - kronična limfatička leukemija; NHL - non-Hodgkinov limfom; AA - aplastična anemija; MDS - mijelodisplastični sindrom; SCID – sindrom teške stečene imunodeficijencije*



Ukupno je za 66 (25,3%) bolesnika davatelj pronađen u RDDKMS-u, dok je za preostalih 195 (74,7%) bolesnika nesrodni davatelj pronađen u nekom od svjetskih registara. Najveći broj nesrodnih davatelja iz inozemstva bio je iz njemačkog registra, njih 139 (71,3%), slijedili su registri iz Poljske s 19 davatelja (7,3%) i SAD-a s 13 davatelja (5,0%), dok je preostalih 24 davatelja (9,2%) bilo iz 15 različitih svjetskih registara davatelja krvotvornih matičnih stanica (slika 81).



Slika 81. Raspodjela davatelja s obzirom na registar krvotvornih matičnih stanica iz kojeg potječu

#### 4.2.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Učestalost alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini bolesnika prikazana je u tablici 24. Na lokusu HLA-A uočeno je 25 različitih alela, na lokusu HLA-B 43 različita alela, na lokusu HLA-C 26 alela, te 32 različita alela na lokusu HLA-DRB1. Usporedba raspodjele alela između bolesnika i kontrolne skupine 10 000 nesrodnih davatelja iz prvog dijela istraživanja nije pokazala statistički značajne razlike, osim za alele HLA-B\*08:01 ( $p=0,0001$ ), -C\*07:01 ( $p=0,0001$ ) i DRB1\*03:01 ( $p=0,0003$ ) koji su bili statistički značajno češći u skupini bolesnika u odnosu na zdravu populaciju. HLA-A\*02:09 i -DRB1\*11:28 su jedina dva alela koji su uočeni u skupini bolesnika, a nisu bili prisutni u kontrolnoj skupini.

Tablica 24. Učestalost alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini bolesnika u programu TKMS s nesrodnog davatelja (N=261)

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
02:01	29,12	08:01	12,84	07:01	22,03	03:01	15,71
01:01	15,33	51:01	11,11	04:01	12,64	01:01	11,88
03:01	12,26	18:01	10,92	12:03	11,11	11:04	9,96
24:02	12,07	07:02	7,28	02:02	9,77	07:01	9,20
11:01	4,98	35:01	5,75	07:02	8,05	16:01	8,81
32:01	4,41	44:02	4,21	06:02	7,85	11:01	7,85
25:01	4,02	35:03	4,02	01:02	4,41	15:01	7,47
26:01	3,83	27:02	3,45	05:01	3,64	13:01	4,21
68:01	3,64	27:05	3,45	15:02	3,45	13:02	3,83
23:01	2,68	57:01	3,26	14:02	3,07	08:01	2,68
33:01	1,92	38:01	3,07	08:02	2,87	04:01	2,11
31:01	1,53	13:02	2,87	03:03	2,49	01:02	1,92
29:02	0,96	14:02	2,68	07:04	2,11	04:02	1,72
02:05	0,77	15:01	2,49	12:02	1,72	04:04	1,53
33:03	0,38	39:01	2,49	17:03	0,96	14:54	1,53
69:01	0,38	40:02	2,11	03:02	0,77	15:02	1,53
02:06	0,19	44:03	2,11	16:01	0,77	12:01	1,15
02:09	0,19	49:01	1,72	03:04	0,57	13:03	1,15
03:02	0,19	52:01	1,72	16:02	0,38	10:01	0,96
24:03	0,19	44:27	1,53	07:18	0,19	14:01	0,96
24:07	0,19	44:05	1,15	15:04	0,19	04:03	0,77
29:01	0,19	56:01	1,15	15:05	0,19	04:07	0,38
30:01	0,19	35:08	0,96	15:06	0,19	04:08	0,38
30:04	0,19	41:02	0,96	16:04	0,19	08:04	0,38
68:02	0,19	58:01	0,96	17:01	0,19	09:01	0,38
		35:02	0,77	18:02	0,19	11:03	0,38
		50:01	0,77			01:03	0,19
		55:01	0,77			04:15	0,19

*f* – frekvencija alela HLA

Tablica 24. – nastavak. Učestalost alela HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini bolesnika u programu TKMS s nesrodnog davatelja (N=261)

HLA-A*	f (%)	HLA-B*	f (%)	HLA-C*	f (%)	HLA-DRB1*	f (%)
		40:01	0,57			11:02	0,19
		18:03	0,38			11:11	0,19
		07:04	0,19			11:28	0,19
		07:05	0,19			13:15	0,19
		07:10	0,19				
		14:01	0,19				
		15:17	0,19				
		15:24	0,19				
		37:01	0,19				
		39:06	0,19				
		41:01	0,19				
		45:01	0,19				
		47:01	0,19				
		53:01	0,19				
		57:02	0,19				

*f* – frekvencija alela HLA

#### 4.2.2. Učestalost haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u skupini bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Analiza učestalosti haplotipova HLA-A~C~B~DRB1 među bolesnicima pokazala je prisustvo 344 različita haplotipa, pri čemu su 282 (81,98%) uočena samo jednom. Haplotipovi koji su među bolesnicima uočeni tri i više puta, odnosno s učestalošću >0,5% (N=26) prikazani su u tablici 25. Pet haplotipova imalo je statistički veću učestalost u bolesnika nego u kontrolnoj skupini, uključujući HLA-A\*32:01~B\*15:01~C\*03:03~DRB1\*01:01 i HLA-A\*25:01~B\*18:01~C\*12:03~DRB1\*03:01, jedina dva haplotipa koja se u kontrolnoj skupini ne nalaze među 100 najčešćih haplotipova, već su na pozicijama 170 i 212.

U skupini 35 haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 koji su kod bolesnika uočeni dva puta, čak je devet haplotipova imalo statistički značajno veću učestalost među bolesnicima u usporedbi s kontrolnom skupinom (tablica 26).

Tablica 25. Lista haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 uočenih tri i više puta među bolesnicima u programu TKMS (N=261); usporedba haplotipova između bolesnika i zdravih ispitanika: <sup>a</sup>p<0,0001; <sup>b</sup>p=0,0123; <sup>c</sup>p=0,0256; <sup>d</sup>p=0,0047; <sup>e</sup>p=0,0112

HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)
01:01~08:01~07:01~03:01 <sup>a</sup>	9,195	03:01~07:02~07:02~11:01	0,766
02:01~18:01~07:01~11:04 <sup>b</sup>	3,065	03:01~27:02~02:02~16:01 <sup>c</sup>	0,766
02:01~13:02~06:02~07:01	1,341	11:01~18:01~07:01~11:04	0,766
02:01~27:05~02:02~01:01	1,341	23:01~44:03~04:01~07:01	0,766
01:01~57:01~06:02~07:01	1,149	02:01~07:02~07:02~15:01	0,575
02:01~27:02~02:02~16:01	1,149	02:01~08:01~07:01~03:01	0,575
02:01~44:27~07:04~16:01	1,149	02:01~41:02~17:03~13:03	0,575
33:01~14:02~08:02~01:02	1,149	02:01~44:02~05:01~15:01	0,575
01:01~52:01~12:02~15:02	0,958	02:01~51:01~14:02~16:01	0,575
02:01~44:02~05:01~04:01	0,958	03:01~07:02~07:02~15:01	0,575
02:01~51:01~14:02~01:01	0,958	25:01~18:01~12:03~03:01 <sup>d</sup>	0,575
03:01~18:01~07:01~11:04	0,958	25:01~18:01~12:03~15:01	0,575
11:01~35:01~04:01~01:01	0,958	32:01~15:01~03:03~01:01 <sup>e</sup>	0,575

*f* – frekvencija haplotipa

Tablica 26. Lista haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 uočenih dva puta (0,383%) među bolesnicima u programu TKMS (N=261);

a) haplotipovi bez razlike u učestalosti između bolesnika i kontrolne skupine 10 000 nesrodnih dobrovoljnih davatelja;

HLA-A*~B*~C*~DRB1*
01:01~08:01~07:01~11:01
01:01~08:01~07:01~15:01
02:01~15:01~04:01~01:01
02:01~27:05~02:02~15:01
02:01~38:01~12:03~11:04
02:01~49:01~07:01~13:02
02:01~51:01~14:02~13:01
02:01~56:01~01:02~15:01
02:01~57:01~06:02~07:01
02:01~57:01~06:02~16:01
03:01~07:02~07:02~13:02
03:01~14:02~08:02~01:02
03:01~18:01~07:01~01:01

HLA-A*~B*~C*~DRB1*
03:01~35:01~04:01~01:01
03:01~35:01~04:01~11:04
03:01~35:03~04:01~01:01
11:01~35:01~04:01~13:01
24:02~07:02~07:02~15:01
24:02~44:05~02:02~01:01
24:02~51:01~15:02~11:01
25:01~08:01~07:01~03:01
29:02~44:03~16:01~07:01
32:01~40:02~02:02~16:01
33:03~58:01~03:02~03:01
68:01~35:03~04:01~08:01
68:01~39:01~12:03~16:01

b) haplotipovi sa statistički značajnom razlikom u učestalosti između bolesnika i kontrolne skupine 10 000 nesrodnih dobrovoljnih davatelja: <sup>a</sup>p<0,0001; <sup>b</sup>p=0,0015; <sup>c</sup>p=0,0036; <sup>d</sup>p=0,0123

HLA-A*~B*~C*~DRB1*
02:01~15:01~03:03~11:04 <sup>a</sup>
02:01~27:02~02:02~04:01 <sup>a</sup>
24:02~07:02~07:02~03:01 <sup>b</sup>
24:02~35:01~04:01~08:01 <sup>b</sup>
24:02~51:01~01:02~01:01 <sup>a</sup>

HLA-A*~B*~C*~DRB1*
24:02~51:01~14:02~01:01 <sup>a</sup>
26:01~13:02~06:02~07:01 <sup>c</sup>
32:01~07:02~07:02~15:01 <sup>d</sup>
68:01~58:01~03:02~13:02 <sup>a</sup>

### 4.2.3. Analiza podudarnosti alela HLA bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Ukupno je 186 (71,3%) bolesnika bilo potpuno podudarno s nesrodnim davateljem za alele lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1, a 75 bolesnika (28,7%) imalo je jednu ili dvije nepodudarnosti na ova četiri analizirana lokusa (tablica 27). Nepodudarnost na razini genske skupine (niska razina razlučivanja) najčešće je bila na lokusu HLA-A (n=20) te na lokusu HLA-C (n=17), dok je najveći broj nepodudarnosti na razini alela (visoka razina razlučivanja) bio na lokusu HLA-DRB1 (n=17).

Tablica 27. Karakteristike bolesnika i njihovih davatelja s obzirom na podudarnost HLA

	<b>BROJ BOLESNIKA n (%)</b>	<b>RAZINA ALELA</b>	<b>RAZINA GENSKJE SKUPINE</b>
<b>Podudarnost HLA 8/8</b>	<b>186 (71,26)</b>		
<b>Podudarnost HLA 7/8</b>	<b>71 (27,20)</b>		
<b>HLA-A</b>	<b>25 (35,21)</b>	6	19
<b>HLA-B</b>	<b>14 (19,72)</b>	10	4
<b>HLA-C</b>	<b>18 (25,35)</b>	2	16
<b>HLA-DRB1</b>	<b>14 (19,72)</b>	14	0
<b>Podudarnost HLA 6/8</b>	<b>4 (1,53)</b>		
<b>HLA-A i -B</b>	<b>1</b>	HLA-A, -B	
<b>HLA-A i -DRB1</b>	<b>1</b>	HLA-DRB1	HLA-A
<b>HLA-B i -DRB1</b>	<b>1</b>	HLA-B, -DRB1	
<b>HLA-C i -DRB1</b>	<b>1</b>	HLA-DRB1	HLA-C

Analiza nepodudarnosti na razini genskih skupina pojedinih lokusa pokazala je da je kod najvećeg broja bolesnika alel nepodudarne genske skupine pripadao skupini vrlo čestih alela. Na lokusu HLA-A to je bio slučaj u 19 od 20 bolesnika, na lokusu HLA-B u 3 od 4 bolesnika, a na lokusu HLA-C kod 16 od 17 bolesnika. Dodatno, preostala tri bolesnika s nepodudarnošću na razini genske skupine imala su alel iz skupine čestih alela; HLA-A\*02:05, -B\*39:06 i -C\*15:06.

Tablica 28. Lista nepodudarnosti alela HLA između bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja na razini genskih skupina

Lokus HLA-A	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
A*01:01	A*03:01
A*01:01	A*23:01
A*02:01	A*01:01
A*02:01	A*03:01
A*02:01	A*24:02
A*02:05	A*25:01
A*03:01	A*02:01
A*03:01	A*29:02
A*11:01	A*02:01
A*11:01	A*68:01
A*23:01	A*03:01
A*24:02	A*01:01
A*24:02	A*03:01
A*24:02	A*23:01
A*24:02	A*30:01
A*26:01	A*01:01
A*26:01	A*02:01
A*31:01	A*24:02
A*31:01	A*25:01
A*32:01	A*24:02

Lokus HLA-C	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
C*01:02	C*03:04
C*01:02	C*05:01
C*01:02	C*12:03
C*02:02 (2x)	C*01:02
C*02:02	C*15:02
C*03:03	C*04:01
C*04:01	C*03:04
C*04:01	C*16:01
C*07:01	C*05:01
C*07:04	C*05:01
C*12:02	C*07:01
C*12:03 (2x)	C*04:01
C*12:03	C*06:02
C*14:02	C*01:02
C*15:06	C*04:01

Lokus HLA-B	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
B*18:01	B*57:01
B*39:01	B*38:01
B*39:06	B*56:01
B*40:02	B*51:01

Nepodudarnosti na razini alela HLA na lokusu HLA-A najčešće su uključivale alele genskih skupina HLA-A\*02 i -A\*24. Šest od sedam bolesnika imalo je alele iz skupine čestih ili vrlo čestih alela. Na lokusu HLA-B od 10 nepodudarnosti na razini alela, jedan bolesnik

imao je rijetki alel dok je preostalih devet bolesnika imalo neki od alela genskih skupina HLA -B\*27, -B\*35 ili -B\*39 koji pripadaju skupini vrlo čestih ili čestih alela. Obje nepodudarnosti na lokusu HLA-C uključivale su česte alele kod bolesnika dok su na lokusu HLA-DRB1 sve nepodudarnosti između bolesnika i njihovih davatelja bile su za neke od vrlo čestih ili čestih alela genskih skupina HLA-DRB1\*04, -DRB1\*11 i -DRB1\*14.

Tablica 29. Lista nepodudarnosti HLA između bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja na razini alela

a) vrlo česti aleli

Lokus HLA-A	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
A*02:01	A*02:02
A*24:02	A*24:03
Lokus HLA-B	
B*27:02 (3x)	B*27:05
B*35:01 (2x)	B*35:03
B*35:03	B*35:08
B*39:01	B*39:06

Lokus HLA-DRB1	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
DRB1*04:01	DRB1*04:04
DRB1*04:02	DRB1*04:04
DRB1*04:03	DRB1*04:01
DRB1*04:03	DRB1*04:08
DRB1*04:04	DRB1*04:01
DRB1*04:04	DRB1*04:05
DRB1*11:01	DRB1*11:04
DRB1*11:04 (4x)	DRB1*11:01
DRB1*11:04	DRB1*11:03
DRB1*14:01	DRB1*14:54
DRB1*14:54	DRB1*14:01

b) česti aleli

Lokus HLA-A	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
A*02:05	A*02:01
A*02:06	A*02:17
A*03:02	A*03:01
A*30:04	A*30:02
Lokus HLA-B	
B*15:24	B*15:01
B*18:03	B*18:01

Lokus HLA-C	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
C*15:04	C*15:02
C*16:02	C*16:01
Lokus HLA-DRB1	
DRB1*04:15	DRB1*04:02
DRB1*11:03	DRB1*11:01
DRB1*11:11	DRB1*11:01
DRB1*11:28	DRB1*11:01

c) rijetki aleli

Lokus HLA-A	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
A*24:07	A*24:02

Lokus HLA-B	
Bolesnik	Nesrodni davatelj
B*07:10	B*07:02



#### 4.2.4. Analiza haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 kod bolesnika u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Za potrebe ovog istraživanja haplotipovi HLA-A~B~C~DRB1 podijeljeni su u skupine prema učestalosti definiranoj kao pozicija u haplotipovima HLA u Hrvatskoj:

- A. **vrlo česti** haplotip HLA – pozicija 1-100;
- B. **česti** haplotipom HLA – pozicija 101-1000 ;
- C. **rijedak** haplotip HLA – pozicija >1000.

Temeljem ove podjele svaki pojedini bolesnik je na temelju učestalosti svojih haplotipova svrstan u jednu od šest skupina (tablice 30 i 31) te je provedena analiza prema registru u kojem je pronađen nesrodni davatelj (RDDKMS ili međunarodni) te prema podudarnosti HLA bolesnika i nesrodnog davatelja.

Najveći broj bolesnika imao je jedan haplotip iz skupine vrlo čestih i jedan haplotip iz skupine čestih haplotipova (kombinacija A/B; 28,0%), dok je najmanji broj bolesnika imao dva česta haplotipa (kombinacija B/B; 8,1%). Bolesnici s kombinacijom haplotipova A/A su statistički značajno češće pronašli davatelja u nacionalnom registru. Za razliku od njih, sve druge kombinacije haplotipova kod bolesnika dovele su do češćeg pronalaska davatelja u internacionalnom registru, od čega su kombinacije haplotipova A/C i C/C postigle statističku značajnost (tablica 30).

Nadalje, podjelom bolesnika s obzirom na kombinaciju haplotipova HLA i na broj nepodudarnosti HLA između bolesnika i njegovog davatelja uočeno je da bolesnici s A/A ili A/B kombinacijom statistički značajno češće pronalaze 8/8 HLA podudarnog davatelja. Za bolesnike s kombinacijama haplotipova A/C ili B/B nema statistički značajne razlike dok bolesnici s kombinacijama haplotipova B/C ili C/C statistički značajno češće imaju nepodudarnog nesrodnog davatelja.

Tablica 30. Raspodjela bolesnika prema kombinaciji haplotipova HLA i registru porijekla nesrodnog davatelja

Kombinacija haplotipova HLA	Bolesnici u programu nesrodne TKMS (N=261) n (%)	Bolesnici s davateljem iz RDDKMS-a (N=66) n (%)	Bolesnici s davateljem iz inozemnih registara (N=195) n (%)	p#
A/A	47 (18,01)	33 (12,64)	14 (5,37)	<0,0001
A/B	73 (27,97)	17 (6,51)	56 (21,46)	NS
A/C	52 (19,91)	7 (2,68)	45 (17,23)	0,0320
B/B	21 (8,05)	2 (0,77)	19 (7,28)	NS
B/C	37 (14,18)	5 (1,92)	32 (12,26)	NS
C/C	31 (11,88)	2 (0,77)	29 (11,11)	0,0079

A – vrlo česti haplotipovi; haplotipovi unutar prvih 100 u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; B – česti haplotipovi; haplotipovi između 101. i 1000. haplotipa u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; C - rijetki haplotipovi; haplotipovi koji nisu među 1000 najčešćih haplotipova HLA u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; # - statistička značajnost usporedbe skupine bolesnika s davateljem iz RDDKMS-a s bolesnicima s davateljem iz inozemnih registara

Tablica 31. Raspodjela bolesnika prema kombinaciji haplotipova HLA i broju nepodudarnosti HLA s nesrodnim davateljima

Kombinacija haplotipova HLA	Bolesnici u programu nesrodne TKMS (N=261) n (%)	Bolesnici s davateljem podudarnim 8/8 (N=186) n (%)	Bolesnici s davateljem podudarnim 6-7/8 (N=75) n (%)	p#
A/A	47 (18,01)	46 (24,73)	1 (1,33)	<0,0001
A/B	73 (27,97)	68 (36,56)	5 (6,67)	<0,0001
A/C	52 (19,91)	33 (17,74)	19 (25,33)	NS
B/B	21 (8,05)	14 (7,53)	7 (9,33)	NS
B/C	37 (14,18)	15 (8,06)	22 (29,33)	<0,0001
C/C	31 (11,88)	10 (5,38)	21 (28,01)	<0,0001

A – vrlo česti haplotipovi; haplotipovi unutar prvih 100 u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; B – česti haplotipovi; haplotipovi između 101. i 1000. haplotipa u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; C - rijetki haplotipovi; haplotipovi koji nisu među 1000 najčešćih haplotipova HLA u skupini 10 000 nesrodnih davatelja iz RDDKMS-a; # - statistička značajnost usporedbe skupine bolesnika s davateljem podudarnim za alele HLA 8/8 s bolesnicima s davateljem podudarnim 6 ili 7/8

## **5. RASPRAVA**

Istraživanje raznolikosti i učestalosti alela i haplotipova lokusa HLA-A, -B, -C i DRB1 u hrvatskoj populaciji u uzorku od 10 000 nesrodnih davatelja iz Registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica, RDDKMS-a bio je prvi cilj ovoga rada. Poznato je da su upravo registri s velikim brojem nesrodnih davatelja jedan od predmeta brojnih populacijskih istraživanja, a time i podataka o polimorfizmu HLA unutar pojedine populacije. Za brojne nacionalne registre postoje takve analize koje su važne, ne samo za dobivanje uvida u polimorfizam HLA unutar pojedine populacije, već i za strategiju razvoja pojedinih registara [87, 88]. Iz tog razloga su i u najvećoj bazi podataka o polimorfizmu sustava HLA u svijetu, bazi Allele Frequency Net Database (AFND) uključeni vrlo vrijedni podatci iz velikog broja registara [7].

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su registri kao takvi, nezaobilazan izvor populacijskih podataka o genima HLA što je u svojim radovima pokazao velik broj autora [89, 90]. Svoje zaključke su potkrijepili činjenicama da se upravo na tako velikim brojevima uključenih osoba, a s obzirom na veliki polimorfizam HLA, može dobiti pravi uvid u raznovrsnost alela i haplotipova HLA unutar pojedine populacije. S druge strane, jedna je od zamjerki protivnika takvih populacijskih istraživanja da se u tako velikom broju ispitanika mogu potkrasti srodne osobe, što može dovesti do nekih krivih pretpostavki, odnosno zaključaka [91]. Međutim, zagovornici korištenja podataka iz registara za populacijska istraživanja smatraju da je to neosnovano jer je na velikim brojevima obrađenih uzoraka taj broj neznan i ne može značajno utjecati na dobivene rezultate, a time i zaključke. Kako bi se takve greške svele na minimum, u ovo su istraživanje u svakom gradu/mjestu uključene samo osobe s različitim prezimenima, odnosno u slučaju dvije ili više osoba s istim prezimenom iz istog mjesta, u analizu je uključena samo jedna. Nadalje, u slučaju prisustva rijetkih alela HLA kod dva ili više ispitanika potvrđeno je da ne potječu iz istog grada, odnosno mjesta.

Populacijska istraživanja sustava HLA neprekidno se nadopunjavaju kako primjenom novih metoda, tako i istraživanjima novih lokusa HLA. Tako je i ovaj rad ne samo nastavak prethodnih istraživanja koja su pratila raspodjelu genskih skupina, alela i haplotipova HLA u Hrvatskoj, već predstavlja istraživanje na najvećem broju ispitanika do sada, te uključuje lokus HLA-C za koji do danas nije bilo podataka za našu populaciju.

Jedno od osnovnih pitanja je zašto je potreban veliki broj uzoraka za analizu polimorfizma HLA u pojedinoj populaciji? Odgovor leži u činjenici da se danas, s obzirom na više od 20 000 poznatih alela HLA i neprestano otkrivanje novih alela, sustav HLA smatra hiperpolimorfnim genskim sustavom, čije istraživanje je stalno potrebno proširivati kako bi se utvrdilo u kojim su populacijama prisutni novo otkriveni polimorfizmi.

Isto tako se može postaviti pitanje zašto je do danas lokus HLA-C bio „zapostavljen“? Jedan od odgovora je što su molekule HLA-C približno 10x manje prisutne na staničnim membranama u usporedbi s drugim molekulama razreda I (HLA-A i -B), a posljedično tome bilo ga je znatno teže određivati testovima mikrolimfocitotoksičnosti [92] koji su uz to pokazivali veliki broj homozigotnih rezultata. No to je posljedica nemogućnosti određivanja specifičnosti koje nemaju serološki ekvivalent (HLA-C\*12, -C\*14, -C\*15, -C\*16, -C\*17 i -C\*18), a čine gotovo 20% ukupnog broja poznatih alela lokusa HLA-C. Dodatan problem je predstavljao i nedostatak specifičnih reagenasa za antigene HLA-C, zbog snažne neravnoteže udruživanja između genskih skupina lokusa HLA-B i HLA-C [93]. Primjerice, na 10. IHW-u 1987. jedan od definiranih podtipova skupine HLA-Cw3, uz Cw9 i Cw10 bio je i Cw11. U tadašnjoj nomenklaturi, iza oznake lokusa HLA-C dodavala se oznaka „w“ od engleske riječi workshop da bi se geni sustava HLA razlikovali od gena komponenti komplekta, C3 ili C4. Specifičnost HLA-Cw11, za koju se smatralo se da je u jakoj neravnoteži udruživanja s antigenom HLA-B46 reagirala je s anti-serumima HLA-Cw3 [94]. Kasnija istraživanja potvrdila su da je reaktivnost bila posljedica križne reaktivnosti sa samom molekulom HLA-B46. Nakon toga, HLA-Cw11 izbačen je iz nomenklature lokusa HLA-C [3].

U posljednje vrijeme, određivanje genskih skupina i alela HLA-C privuklo je veliki interes i zanimanje imunogenetičara i zbog shvaćanja njihove uloge u ishodu TKMS. Veliki broj kliničkih studija pokazale su da nepodudarnosti u genskim skupinama ili alelima lokusa HLA-C dovode do porasta rizika za razvoj akutne reakcije presatka protiv primatelja (engl. Graft vs. Host Disease, GvHD) za 20% do 100% [74, 95-97]. Istovremeno analize ukupnog preživljenja pokazuju povećanje smrtnosti nakon TKMS 20-90% u slučajevima nepodudarnosti primatelja i davatelja KMS za alele lokusa HLA-C [75, 98, 99].

Analiza istraživanih uzorka pokazala je da su uočene i očekivane homozigotnosti, odnosno heterozigotnosti za sve ispitivane lokuse HLA bile u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom, bez statistički značajnih razlika (tablica 12). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja provedenim u drugim populacijama europskog porijekla [100].

Među 19 različitih genskih skupina HLA-A, najpolimorfija je bila HLA-A\*02 s devet različitih alela od kojih je najčešći alel, ne samo unutar te genske skupine, već unutar svih alela lokusa HLA-A, bio alel HLA-A\*02:01 s učestalošću od gotovo 30%. Slični rezultati su objavljeni za većinu populacija u Europi, kao i za populacije europskog porijekla u svijetu [7]. Raspodjela alela HLA-A\*02:01 u Europi pokazala je pad učestalosti od sjevera prema jugu kontinenta pa je tako najviša učestalost uočena u Finskoj (>40%) dok podatci za Italiju i Portugal govore o učestalosti od približno 25% [7, 43].

Raspodjela genskih skupina HLA-B u Hrvatskoj pokazala je da je najčešća bila HLA-B\*35 (13,4%) što je u skladu s dostupnim podacima za druge populacije u ovom dijelu Europe. Naime, učestalost genske skupine HLA-B\*35 veća je na jugu Europe i pada prema sjeveru pa tako iznosi približno 20% u Grčkoj i Italiji dok u Irskoj i Švedskoj iznosi svega 5% [7, 43].

Za razliku od lokusa HLA-A gdje je najčešća genska skupina ujedno i najpolimorfnije, na lokusu HLA-B najpolimorfnije genska skupina, koja je prema učestalosti bila na osmom mjestu, bila je HLA-B\*15 s 12 različitih alela, čije su se učestalosti kretale od 4,1% za alel HLA-B\*15:01 do 0,01% za alele HLA-B\*15:23 i -B\*15:39, dok je alel HLA-B\*15:16 bio prisutan samo kod jednog ispitanika. Dobiveni podatci ne odstupaju od podataka za druge populacije u Europi [3, 7]. Zanimljivo je spomenuti da je alel HLA-DRB1\*15:16 uočen u 16 različitih populacija europskog porijekla (s frekvencijama od 0,01% do 1,61%), ali isključivo na jugu Europe [7].

Među genskim skupinama lokusa HLA-C u Hrvatskoj najzastupljenija je bila HLA-C\*07 (25,7%) što se uklapa u zastupljenost diljem Europe s učestalošću od 15,5% (Španjolska) do 41,9% (Poljska) [7]. Genske skupine HLA-C\*07, kao i -C\*15 su među našim ispitanicima pokazale najveći polimorfizam (pet različitih alela) od svih genskih skupina ovog lokusa, a alel HLA-C\*07:01 je bio i najčešći alel (15,8%).

Od 13 genskih skupina na lokusu HLA-DRB1 najpolimorfnije i najčešća bila je HLA-DRB1\*11 s frekvencijom od 17,4% i s deset uočenih alela. Njezina frekvencija u populacijama europskog porijekla varira od približno 4% na sjeveru Europe, u Finskoj i Norveškoj, do 30% na jugu Europe, u Italiji i Grčkoj [7].

Usporedba naših rezultata s katalogom Europske federacije za imunogenetiku (EFI) u kojem su prikazani podatci o čestim, kao i dobro opisanim alelima u Europi pokazala je sličnosti, ali i brojne razlike [101]. Naime, EFI katalog je po prvi put iznio podatke za populacije europskog porijekla kako bi se olakšao svakodnevni rad u laboratorijima, ali i dobio uvid koji su to česti, dobro definirani odnosno rijetki aleli u Europi. Kriterij razvrstavanja alela HLA u katalogu temeljio se na broju pojavljivanja u jednoj ili više različitih populacija, odnosno subregija. Pojavljivanje više od tri puta u tri različite populacije, svrstava alel u skupinu čestih alela (engl. common, COM), dok pojavljivanje najmanje pet puta u istoj ili različitim populacijama, svrstava alel u kategoriju dobro opisanih alela (engl. well documented, WD). Kao izvori podataka za katalog korištene su tri velike europske baze alela HLA; baza GENE[VA] koja postoji pri Sveučilištu u Genevi [102], baza AFND održavana pri Sveučilištu u Liverpoolu i baza DKMS, najveća baza dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica

u Njemačkoj. Podatci su u katalog prijavljeni za 120 populacija s gotovo 4 000 000 testiranih uzoraka, koje su zadovoljile uvjet da tipizaciju na razini alela prijavljuju najmanje za jedan lokus. Za potrebe EFI kataloga Europa je bila podijeljena na pet subregija; sjevernu, sjevero-istočnu, jugo-istočnu, jugo-zapadnu i centralno-zapadnu. Kao granice subregija korištene su prirodne granice u Europi kao što su Pirineji, Alpe, Karpati, Baltičko more i kanal La Manche. Uspostavljanje EFI kataloga bilo je od izuzetnog značaja budući su se prije njegovog objavljivanja za istraživanja populacija europskog porijekla koristili podatci Američkog društva za histokompatibilnost i imunogenetiku (engl. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, ASHI), a čija se manjkavost očitovala u činjenici da su analize obuhvaćale samo mali broj uzoraka (<1%) iz Europe, točnije iz Nizozemske i Francuske [103, 104].

Raspodjela alela na lokusu HLA-A pokazuje da 49 različitih alela (tablica 13, 14, 15 i 16) koji su podijeljeni u četiri skupine s obzirom na njihovu zastupljenost u našoj populaciji. Skupini vrlo čestih ili čestih alela pripadalo je ukupno 30 alela (61,2%). Usporedba rezultata dobivenih ovim radom s EFI katalogom pokazala je da je 26 od 30 vrlo čestih i čestih alela lokusa HLA-A u Hrvatskoj u skupini čestih i u EFI katalogu, tri alela HLA-A (HLA-A\*02:06, -A\*02:17 i -A\*80:01) su u skupini dobro opisanih alela, dok alel HLA-A\*66:02 koji je u Hrvatskoj uočen kod šest ispitanika u EFI katalogu nije spomenut [101]. Ovaj alel uočen je u samo tri populacije u Europi (Portugal, Španjolska, Njemačka) ali s izrazito niskom učestalošću te stoga nije u katalogu. Među rijetkim alelima lokusa HLA-A (prisutni 2-5 puta) tri alela (HLA-A\*01:02, -A\*01:03 i -A\*34:02) su u katalogu u skupini čestih alela, 2 alela (HLA-A\*02:11 i -A\*74:01) su u skupini dobro opisanih, a za 3 alela (HLA-A\*02:22, -A\*02:35 i -A\*68:23) nema takvih podataka. Zanimljivo je istaknuti da iako je od objavljivanja kataloga prošlo već gotovo tri godine, alel HLA-A\*68:23 još uvijek nije prijavljen niti u jednoj populaciji u Europi, dok je samo u AFND-u prijavljen u populacijama Kolumbije, Čilea i Meksika [7]. Unutar skupine vrlo rijetkih alela (N=11) u našoj populaciji dva alela (HLA-A\*24:07 i -A\*31:08) su u europskom katalogu definirani kao česti, dok je alel HLA-A\*02:03 svrstan u skupinu dobro definiranih. Među osam preostalih vrlo rijetkih alela (uočenih samo jednom u Hrvatskoj), njih sedam i u Europi spada u skupinu rijetkih alela, a jedan je novo otkriveni alel HLA, alel HLA-A\*01:200. Naime, ovim istraživanjem je po prvi puta otkrivena sasvim nova sekvenca genske skupine HLA-A\*01, koja se od najbližijeg poznatog alela, -A\*01:12, razlikovala u čak četiri nukleotida u egzonu 3. To je dovelo do promjena u tri aminokiseline u kodonima 65, 75 i 76, a alel je službeno imenovan od Odbora za nomenklaturu pri Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji u prosincu, 2015. godine [105].

Od 57 vrlo čestih i čestih alela na lokusu HLA-B, 47 alela pripada skupini čestih alela i prema EFI katalogu. U kategoriji dobro opisanih alela nalaze se četiri alela (HLA-B\*15:03, -B\*15:09, -B\*15:24 i -B\*48:01), dok čak šest alela (HLA-B\*15:08, -B\*27:14, -B\*39:03, -B\*39:31, -B\*44:21 i -B\*54:01) prema EFI katalogu nije u kategoriji čestih i dobro opisanih alela [100]. U skupini rijetkih alela lokusa HLA-B u našoj populaciji, nalazi se 18 alela. Od toga njih 5 (HLA-B\*07:10, -B\*18:05, -B\*39:05, -B\*39:10 i -B\*51:05) i prema EFI katalogu pripada skupini čestih alela u Europi. Još četiri alela nalaze se u skupini dobro opisanih alela (HLA-B\*15:07, -B\*35:04, -B\*39:24 i -B\*27:07), a preostalih 9 alela (HLA-B\*27:09, -B\*27:30, -B\*40:03, -B\*15:23, -B\*15:39, -B\*37:09, -B\*39:04, -B\*44:06 i -B\*53:05) su rijetki kako u našem uzorku tako i prema katalogu EFI-a. Još 15 alela lokusa HLA-B uočeno je u našoj populaciji samo jednom. Od toga, samo jedan alel, HLA-B\*27:03 je čest prema katalogu EFI-a, a šest alela (HLA-B\*15:16, -B\*39:15, -B\*44:04, -B\*46:01, -B\*51:09 i -B\*55:02) su dobro opisani aleli. Preostalih osam alela (HLA-B\*07:02:03, -B\*08:04, -B\*13:10, -B\*18:37:02, -B\*27:12, -B\*38:08, -B\*44:29 i -B\*51:03) su rijetki i prema EFI katalogu [101]. Među njima treba istaknuti alel HLA-B\*18:37:02 koji je također novo otkriveni alel. Ovaj alel se razlikuje od alela -B\*18:37:01 u jednom nukleotidu u egzonu 2, gdje se u kodonu 54 na trećoj poziciji gvanin zamijenjen adeninom [106].

Lokus HLA-C, s uočenih 36 različitih alela, pokazao je najmanji polimorfizam u ovom istraživanju. Ukupno je 27 alela svrstano u skupine vrlo čestih i čestih alela, od kojih tri alela (HLA -C\*08:03, -C\*15:04 i -C\*18:02), nisu bila u skupini čestih alela prema EFI katalogu. Aleli HLA-C\*15:04 i -C\*18:02 bili su u skupini dobro opisanih alela, dok alel HLA-C\*08:03 nije pripadao niti jednoj od skupina alela prema EFI katalogu [101]. Ovaj alel prisutan je s velikom učestalošću u Kini, Japanu i Koreji gdje mu se frekvencija kreće od 2 do 6%, dok je u Europi njegova prisutnost prijavljena samo u Španjolskoj, Njemačkoj i Švicarskoj, ali s učestalostima nižim od 0,1% [7]. Od četiri rijetka alela lokusa HLA-C, dva su prema EFI katalogu definirani kao česti, HLA-C\*07:07 i -C\*15:09, a dva nisu u skupinama čestih i dobro opisanih alela (HLA-C\*02:05 i -C\*05:08). Alel HLA-C\*02:05 do danas je prijavljen samo u dvije populacije, u Saudijskoj Arabiji i Južnoafričkoj Republici, a alel HLA-C\*05:08, u Njemačkoj, Češkoj i Poljskoj, ali s vrlo niskom učestalošću (<0,01%). Još pet alela (HLA -C\*03:13, -C\*06:32, -C\*07:17, -C\*12:05 i -C\*14:25) uočeno je u našem uzorku samo jednom, dok se u EFI katalogu ne spominju ni kao česti, a ni kao dobro opisani [7, 101].

Na lokusu HLA-DRB1 u uzorku od 10 000 davatelja uočeno je ukupno 53 alela od kojih je 41 u skupini vrlo čestih i čestih alela. U usporedbi s EFI katalogom među čestim alelima nalazi se njih 35. Tri alela, HLA-DRB1\*11:06, -DRB1\*11:11 i -DRB1\*14:05 nalaze se u



skupini dobro opisanih alela, a za tri alela (HLA-DRB1\*04:15, -DRB1\*11:12 i -DRB1\*11:28) nema nikakvih podataka u navedenom katalogu [100]. Treba spomenuti da su ti aleli prisutni u brojnim populacijama u Europi, ali s niskom učestalosti. Tako je za alel HLA-DRB1\*04:15 raspon učestalosti od 0,0002% u Poljskoj do 0,3% u Makedoniji, za alel -DRB1\*11:28 od 0,006% u Njemačkoj do 0,05% u Bosni i Hercegovini, dok je učestalost alela HLA-DRB1\*11:12 najniža u Njemačkoj (0,004%), a najviša u Bosni i Hercegovini (0,15%). Od sedam rijetkih alela lokusa HLA-DRB1, dva (HLA-DRB1\*12:02 i -DRB1\*13:15) su prema EFI katalogu u skupini čestih alela u Europi. Alel HLA-DRB1\*12:02 pokazao je najveću zastupljenost u Grčkoj i Italiji (>1%), dok je alel HLA-DRB1\*13:15 s najvišom učestalošću uočen u Bugarskoj (0,9%) [7]. Dva alela (HLA-DRB1\*11:15 i -DRB1\*14:07) prema EFI katalogu nalaze se u skupini dobro opisanih alela, a tri alela (HLA-DRB1\*11:58, -DRB1\*13:32 i -DRB1\*15:07) pripadaju skupini rijetkih alela i prema katalogu EFI-a [101]. Osim navedenih alela još je pet alela lokusa HLA-DRB1 u hrvatskoj populaciji uočeno samo jednom. Među njima, alel HLA-DRB1\*14:02 prema EFI katalogu pripada skupini čestih alela, jer je u bazi AFND prijavljen s niskom učestalošću u više od 20 europskih populacija. Preostala četiri alela (HLA-DRB1\*01:31, -DRB1\*03:05, -DRB1\*03:06 i -DRB1\*12:39) nisu prisutna niti u skupini čestih ni u skupini dobro opisanih alela u navedenom EFI katalogu [101].

Osim što se u bazi AFND-a mogu pratiti učestalosti, tj. raspodjele alela i haplotipova HLA, kao zasebna aplikacija razvijen je program RAD (engl. Rare Allele Detector), za praćenje prijave alela i usporedbu njihovih učestalosti s bazama HLA AFND i NMDP, kao i individualne prijave alela [7]. Aleli se programom RAD dijele na česte, rijetke i vrlo rijetke, ovisno o tome koliko su se puta pojavili u nekoj od navedenih baza podataka, izuzev inicijalne prijave u bazu alela IPD-IMGT/HLA. Alel je opisan kao čest ako se je pojavio više od četiri puta, rijedak ako je uočen jedan do tri puta, a vrlo rijedak ako nije uočen nigdje izuzev prijave u bazi IPD-IMGT/HLA. Kada smo svih 36 vrlo rijetkih alela analizirali programom RAD, samo se dva novo otkrivena alela (HLA-A\*01:200 i -B\*18:37:02) nisu nalazila ni u jednoj od kategorija, jer izuzev njihove prijave u bazi podataka IPD-IMGT/HLA ne postoji drugih prijave ovih alela. Alel HLA-DRB1\*12:39 je na temelju ove analize pripadao skupini vrlo rijetkih alela jer za njega nema podataka osim onih u bazi IPD-IMGT/HLA iz 2013. godine kada je otkriven i prijavljen u Kini [3]. Međutim, čak 6 alela (HLA-A\*01:08, -A\*24:41, -A\*68:06, -B\*38:08, -C\*14:25 i -DRB1\*01:31) i u svijetu spada u skupinu rijetkih alela jer su do sad uočeni, odnosno prijavljeni, jedan do tri puta.

Populacijskim istraživanjima moguće je pratiti razlike u učestalosti pojedinih alela iste genske skupine HLA, od sjevera prema jugu, odnosno od istoka ka zapadu Europe. Primjer

takvih razlika s obzirom na geografsku širinu, odnosno dužinu su najčešći aleli genske skupine HLA-B\*27, -B\*40 i -DRB1\*11 [107].

Analiza dva najčešća alela genske skupine HLA-B\*27 pokazuje veću učestalost HLA-B\*27:02 u našoj populaciji negoli u populacijama na sjeveru, odnosno zapadu Europe, dok suprotno tome učestalost -B\*27:05 pokazuje pad učestalosti od sjevera prema jugu Evrope. Ova razlika se očituje i različitim omjerima njihovih učestalosti. U našoj populaciji omjer učestalosti -B\*27:02 i -B\*27:05 iznosi 1:1,8, dok je u populacijama sjeverne i zapadne Europe omjer njihovih učestalosti znatno veći i iznosi 1:5. Rezultati su sukladni rezultatima koji su dobiveni istraživanjem provedenim 2014. godine na 4000 nesrodnih dobrovoljnih davatelja iz Hrvatske [50].

Nadalje, potvrđena je podjednaka raspodjela alela HLA-B\*40:02 (2,1%) i alela -B\*40:01 (1,6%) u našoj populaciji, što je bio i rezultat istraživanja 2014. na manjem uzorku ispitanika [50]. Dobiveni rezultat statistički značajno ( $p < 0,05$ ) odstupa od rezultata za brojne druge europske populacije (Austrijanci, Belgijanci, Britanci, Česi, Nijemci, Poljaci, Rumunji, Talijani) gdje je uočena dominacija alela -B\*40:01 u odnosu na alel -B\*40:02 [7, 108-110]. Sličan odnos ova dva alela do sada je nađen među ispitanicima iz Grčke i Srbije [7]. Potvrdu ovi rezultata mogli bismo dobiti ukoliko bi se slična istraživanja provela i u drugim susjednim zemljama (npr. Slovenija i Mađarska).

I za gensku skupinu -DRB1\*11, pokazana je razlika u učestalosti dva najčešća alela s obzirom na geografski položaj. Tako je u ovom radu utvrđeno da su aleli HLA-DRB1\*11:01 i -DRB1\*11:04 prisutni s gotovo istom učestalošću (tablica 13), za razliku od centralne i sjeverne Europe (Austrija, Belgija, Češka, Njemačka, Nizozemska, Poljska) u kojima je alel -DRB1\*11:01 puno češći nego alel -DRB1\*11:04, dok je na jugu Europe (Grčka, Italija) upravo obrnuta situacija, tj. -DRB1\*11:04 češći je nego -DRB1\*11:01 [7, 43].

Za razliku genskih skupina u kojima imamo predominaciju dva česta alela, unutar nekih genskih skupina postoji veći broj čestih alela. Tako su primjerice u genskoj skupini HLA-B\*35 prisutna četiri alela iz skupina vrlo čestih i čestih alela. Uspoređujući njihove učestalosti s učestalostima u još nekim europskim populacijama vidljivo je da aleli HLA-B\*35:01, -B\*35:02 i -B\*35:08 imaju podjednake učestalosti u Hrvatskoj kao npr. u Austriji, Bugarskoj, Češkoj, Italiji i Njemačkoj dok je za alel HLA-B\*35:03 zastupljenost gotovo dvostruko veća nego u prethodno navedenim populacijama. Podjednako visoka učestalost prijavljena je još samo u populaciji Srbije (5,9%) [7, 111, 112]. Sličan primjer je i genska skupina HLA-DRB1\*04 koja je u Hrvatskoj jedna od najpolimorfnijih s 9 različitih alela s učestalošću od 0,03% do 2,9%. Najčešći među njima bio je HLA-DRB1\*04:01 (2,9%), a drugi najčešći bio je -DRB1\*04:02

(2,4%). U drugim europskim populacijama također je najčešći alel -DRB1\*04:01, ali se na drugom mjestu po učestalosti nalazi HLA-DRB1\*04:04, a u Hrvatskoj je na trećem mjestu [7].

Sljedeći cilj ove doktorske disertacije je bio analizirati raznovrsnost i raspodjelu haplotipova HLA, i to HLA-A~B, HLA-B~C, HLA-B~DRB1, HLA-A~B~C, HLA-A~B~DRB1 te HLA-A~B~C~DRB1. Poznato je da su haplotipske analize dva i više lokusa vrijedan doprinos populacijskim istraživanjima. Prva analiza obuhvatila je praćenje učestalosti i LD-a za haplotipove HLA-A~B jer unatoč tome što se lokusi HLA-A i -B dugo istražuju i uključeni su u populacijske studije, na molekularnoj razini podatci su nedostadni. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da među 50 najčešćih haplotipova samo njih 12 ima negativnu vrijednost LD-a, što pokazuje da je učestalost haplotipova niža nego što bi to bilo za očekivati na temelju učestalosti pojedinih alela (npr. HLA-A\*02:01~B\*08:01, HLA-A\*02:01~B\*40:02). Zanimljivo je istaknuti da dok su pojedini aleli (HLA-A\*02:01, -A\*01:01, -A\*24:02 i -A\*03:01) u snažnom LD-u s brojnim alelima lokusa HLA-B i te su vrijednosti statistički vrlo značajne, četiri alela HLA-A (HLA-A\*23:01, -A\*25:01, -A\*30:01 i -A\*33:01) su pokazala statistički značajan LD samo s jednim alelom lokusa HLA-B (tablica 17).

Najučestaliji haplotip, HLA-A\*01:01~B\*08:01, jedini je bio prisutan s učestalošću višom od 5% što je u skladu s rezultatima i za mnoge druge populacije u Europi. I preostali haplotipovi koji su bili među 50 najčešćih u našem ispitivanju, pokazali su sličnu zastupljenost kao u populacijama europskog porijekla, ali važno je istaknuti da ipak postoje neke razlike. Tako se među najčešćim haplotipovima HLA-A~B za našu populaciju ne nalazi haplotip HLA-A\*24:02~B\*44:03 koji je čest haplotip na jugu Europe s učestalošću višom od 1% (Portugal) do 0,2% (Italija i Španjolska) [7].

Već je prije spomenuto da je ovo istraživanje po prvi put dalo uvid u polimorfizam lokusa HLA-C u Hrvatskoj stoga je sljedeći cilj bio analizirati haplotipove HLA-B~C. Općepoznato je da su ova dva lokusa HLA na kromosomu 6 smještena vrlo blizu, udaljenost im je samo 0,2 centimorgana što u ljudskom genomu iznosi oko 200 000 parova baza. Iz ovog proizlazi da je i učestalost rekombinacije između njih rijetka [113]. Također su već istraživanja sustava HLA na razini antigena ukazala na postojanje LD-a između pojedinih antigena ova dva lokusa, međutim tek su molekularna istraživanja na velikom broju ispitanika pokazala pravu snagu neravnoteže udruživanja, ali i postojanje rijetkih kombinacija HLA-B~C. Stoga su ovakve studije važne ne samo zbog populacijskih podataka već su i temelj za izračunavanje vjerojatnosti pronalaska podudarnog nesrodnog davatelja [114, 115].

Raspodjela haplotipova HLA-B~C i njihove vrijednosti LD-a otkrile su da je između 50 najčešćih haplotipova samo pet imalo statistički značajnu negativnu vrijednost LD-a. Međutim,

za razliku od haplotipova HLA-A~B kod ovih haplotipova četiri su bila prisutna s učestalošću višom od 5% (tablica 18). Opet je na prvom mjestu bio alel HLA-B\*08:01 u kombinaciji s alelom -C\*07:01, a slijedili su ga haplotipovi HLA-B\*07:02~C\*07:02, HLA-B\*35:01~C\*04:01 i HLA-B\*18:01~C\*07:01. Dobiveni rezultati u skladu su s dostupnim rezultatima drugih populacija europskog porijekla [7].

Osim istraživanja učestalosti najčešćih haplotipova HLA-B~C, u radu smo pratili i međusobno usporedili i razlike u haplotipovima pojedinih alela najčešćih genskih skupina lokusa HLA-B s ciljem analiziranja sličnosti i razlika između alela iste genske skupine lokusa HLA-B u formiranju haplotipova HLA-B~C. Prva skupina alela analizirana na ovaj način bili su aleli genske skupine HLA-B\*35. Naime, dosadašnja istraživanja nesumnjivo su ukazala da su aleli HLA-B\*35 u snažnom LD-u s alelom HLA-C\*04:01 u svim populacijama u svijetu pa tako i našoj, gdje su svi vrlo česti i česti aleli (HLA-B\*35:01, -B\*35:02, -B\*35:03 i -B\*35:08) u više od 75,0% haplotipova bili u kombinaciji s alelom -C\*04:01 [7]. S druge strane alel HLA-B\*35:01 statistički značajno češće u usporedbi sa svim drugim alelima genske skupine B\*35 nalazio se u haplotipu s alelom -C\*03:03. Haplotip B\*35:01~C\*03:03 bio je na drugom mjestu po učestalosti među haplotipovima HLA-B\*35:01~C. Prateći učestalost tog haplotipa u svijetu, najčešće se pojavljivao među populacijama azijskog porijekla (Japan, Kina, Hong Kong) gdje mu frekvencija iznosi od 0,1% do čak 6,3% [116]. U populacijama europskog podrijetla, haplotip je do sada prijavljen u populaciji Italije, ali tek kao četvrti po učestalosti haplotipova koje tvori alel HLA-B\*35:01. Istovremeno alel HLA-B\*35:02 statistički je značajno češće bio prisutan u kombinaciji s alelom -C\*06:02 nego preostala tri alela genske skupine HLA-B\*35. Ovdje je razlika između naše i talijanske populacije još više izražena jer je u Italiji ova kombinacija tek na 10. mjestu po učestalosti među haplotipovima HLA-B\*35:02~C [7]. Nažalost, podatci za druge populacije u Europi nisu dostupni iako bi bili izuzetno korisni ne samo u populacijskim istraživanjima već i u programu nesrodne TKMS osobito u slučaju pronalaska potencijalnog davatelja koji nije tipiziran za alele genske skupine HLA-B\*35 ili mu nedostaje tipizacija lokusa HLA-C. U svijetu, haplotip HLA-B\*35:02~C\*06:02 prijavljen je još za populaciju Meksika, Ujedinjenih Arapskih Emirata, Rusije i Poljske s učestalostima nižim od 1%. Preostala dva alela genske skupine HLA-B\*35 također su statistički značajno češće tvorili haplotipove s različitim alelima HLA-C. U 94,1% haplotipova HLA-B\*35~C\*12:03 alel lokusa B bio je -B\*35:03. Ova kombinacija je česta, ne samo u populacijama azijskog porijekla, već i u Europi (Italija, Poljska, Portugal) [7]. Za alel HLA-B\*35:08 (slika 36) specifično je da statistički značajno češće tvori haplotip s alelom HLA

-C\*15:02 u odnosu na ostale alele HLA-B\*35 što je dosadašnjim istraživanjima prijavljeno još samo u Italiji i Poljskoj, te u Kolumbiji i Ujedinjenim Arapskim Emiratima [7].

Genska skupina HLA-B\*51, odnosno njezin najčešći alel B\*51:01 (98,5%) u ovom je istraživanju pokazao najveći polimorfizam haplotipova HLA-B~C jer je tvorio haplotipove s čak 20 različitih alela HLA-C. Kod približno dvije trećine haplotipova na lokusu HLA-C bio je prisutan neki od alela HLA-C\*15:02, -C\*14:02 ili -C\*01:02, dok je trećinu haplotipova činio neki od preostalih 17 alela lokusa HLA-C (slika 39). Dobiveni rezultati za najčešće haplotipove HLA-B\*51:01~C djelomično su u skladu s podacima drugih europskih populacija [117]. HLA-B\*51:01~C\*15:02 bila je u našoj, kao i u većini drugih europskih populacija, najčešća kombinacija, osim u Francuskoj gdje je najčešća kombinacija HLA-B\*51:01~C\*14:02. Međutim, zastupljenost haplotipa HLA-B\*51:01~C\*01:02 veća je u Hrvatskoj u odnosu na druge populacije u Europi. Istovremeno podatci za Italiju i Grčku govore o čestoj kombinaciji s alelima -C\*04:01 i -C\*07:02 koji se kod nas pojavljuju tek sporadično. Rezultati pokazuju da se u odabiru nesrodnog davatelja za bolesnika nositelja alela HLA-B\*51:01 uvijek mora imati u vidu mogućnost nepodudarnosti za alele lokusa HLA-C te sukladno tome treba prilagoditi i strategiju odabira.

U alelnoj skupini HLA-B\*44:02:01G, najčešći haplotipovi bili su s alelima HLA-C\*05:01 i -C\*07:04. Iako ovim istraživanjem nismo mogli potvrditi koji od dva alela predominantno tvori haplotip s kojim alelom na lokusu HLA-C, prethodnim istraživanjima ovog polimorfizma u našoj populaciji, dobiveni su rezultati kako alel HLA-B\*44:02 predominantno dolazi u haplotipu s alelom HLA-C\*05:01, dok alel HLA-B\*44:27 najčešće tvori haplotip s alelom HLA-C\*07:04 [54]. Preostala dva vrlo česta alela, HLA-B\*44:03 i -B\*44:05, najčešće dolaze u haplotipu s alelima HLA-C\*04:01, odnosno s -C\*02:02. Oba ova haplotipa, najčešća su i u drugim populacijama europskog porijekla (Italija, Njemačka, Poljska, Velika Britanija) [7, 118, 119]. Također, važno je istaknuti da se još neki aleli HLA-C specifično pojavljuju u haplotipovima s alelima HLA-B\*44. Tako se alel HLA-C\*16:04 predominantno, odnosno statistički značajno češće javlja u haplotipovima s alelom HLA-B\*44:02:01G, a alel HLA-C\*16:01, drugi je najčešći alel s kojim se u haplotipu pojavljuje alel HLA-B\*44:03. I na kraju, alel HLA-C\*16:02 vrlo rijetko tvori haplotipove s bilo kojim od istraživanih alela HLA-B\*44, ali kad je prisutan, onda je to isključivo u haplotipu s alelom HLA-B\*44:03. Naši nalazi u skladu su s rezultatima dobivenim u istraživanjima provedenim u Grčkoj, Italiji, Poljskoj i Turskoj koje su također prijavile alel HLA-C\*16:02 isključivo u haplotipu s alelom HLA-B\*44:03 [7].

Raspodjela najčešćeg haplotipa alela HLA-B\*18:01, haplotipa HLA-B\*18:01~C\*07:01 u Hrvatskoj (slika 46) pokazala je djelomičnu podudarnost s drugim europskim populacijama [7]. Isti rezultati su dobiveni istraživanjima provedenim u Grčkoj i Italiji, dok je za velik broj drugih populacija pokazana obrnuta raspodjela za naša dva najčešća haplotipa. Tako su najčešći haplotip HLA-B\*18:01~C\*12:03 prijavile Engleska, Irska i Poljska. Naš treći haplotip po učestalosti, HLA-B\*18:01~C\*05:01 je kao najčešći prijavljen u Španjolskoj, a učestalost mu je vrlo visoka i među populacijama afričkog porijekla odakle je vjerojatno započelo i njegovo širenje [7, 43].

Genska skupina HLA-B\*08, odnosno alel HLA-B\*08:01, pokazao je jedan od najjačih LD-a jer je u preko 99% haplotipova bio u kombinaciji s nekim od alela genske skupine HLA-C\*07 i to predominantno s alelom HLA-C\*07:01 (94,7%). Haplotip HLA-B\*08:01~C\*07:01 vrlo je čest u mnogim populacijama u Europi i smatra se europskim haplotipom dok je primjerice u Kini njegova učestalost niža od 0,2% [7]. Drugi po učestalosti, alel HLA-C\*07:02, uočen s alelom HLA-B\*08:01 kod 74 ispitanika (4,6%), nađen je još i u Grčkoj, Italiji, Portugalu, Rumunjskoj i Turskoj, ali s vrlo niskom učestalošću (0,01-0,55%) [7]. Međutim, novija istraživanja temeljena na podacima dobivenim sekvenciranjem novije generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS) pokazala su da česti alel HLA-B\*08:01:01:01 dolazi u haplotipu s HLA-C\*07:01, a manje zastupljen alel HLA-B\*08:01:01:02 s alelom HLA-C\*07:02. Razlika između ova dva alela HLA-B\*08:01 nalazi se u netranslatirajućoj regiji 3' i ne smatra se nepodudarnošću u TKMS, ali rezultira razlikom u alelima HLA-C. Ovaj rezultat od izuzetne je važnosti za algoritam traženja nesrodnog davatelja pogotovo jer je haplotip HLA-B\*08~C\*07 najčešći haplotip u Hrvatskoj, ali i u većini zemalja Europe.

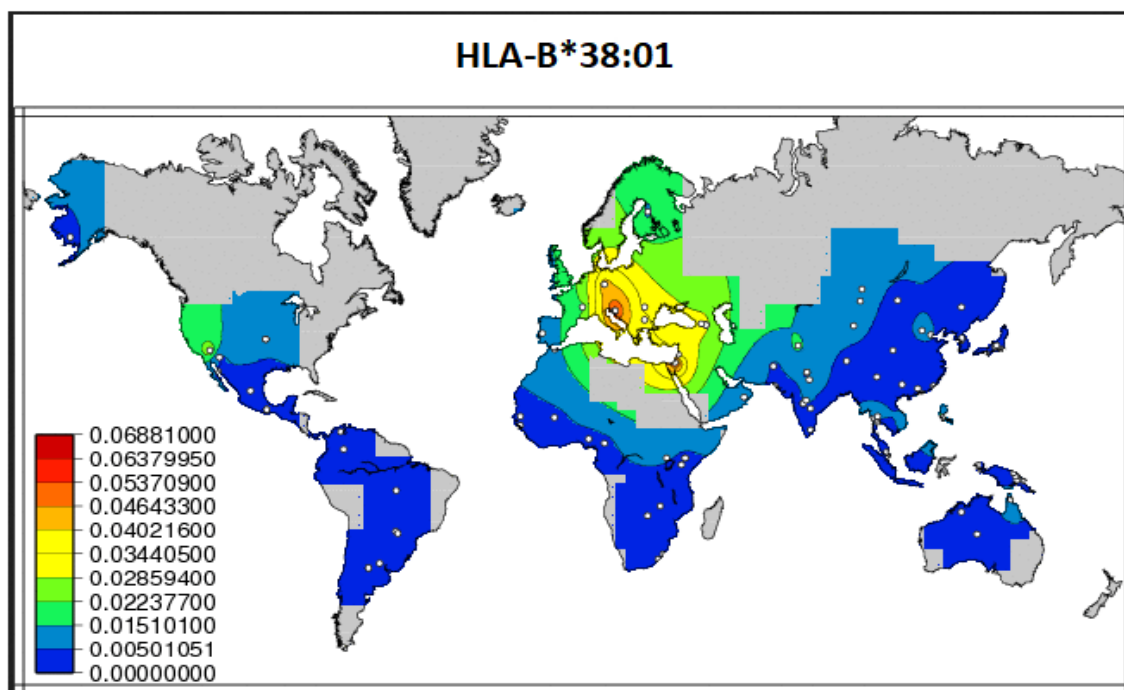
Haplotip HLA-B\*07:02~C\*07:02 najčešći je haplotip HLA-B\*07:02~C u Hrvatskoj (6,5%), ali zanimljivo je da je znatno niža negoli li na sjeveru Europe (Irska) gdje iznosi čak 17% [7].

Osim razlika u učestalosti od sjevera prema jugu za dva najčešća alela genske skupine HLA-B\*27 (HLA-B\*27:02 i -B\*27:05), uočena je razlika i u alelima HLA-C s kojima se najčešće pojavljuju u haplotipu. Oba navedena alela HLA-B\*27 najučestalije tvore haplotip s alelom HLA-C\*02:02, ali alel HLA-B\*27:05 kod približno četvrtine ispitanika formira haplotip i s alelom HLA-C\*01:02, dok se alel HLA-B\*27:02 pojavljuje statistički značajno češće ( $p < 0,0001$ ) u haplotipu s alelom HLA-C\*05:01. Navedeni haplotip uočen je na jugu europskog kontinenta (Francuska, Italija, Portugal, Španjolska) [7].

Za alele genske skupine HLA-B\*15 analiza haplotipova HLA-B~C je pokazala sličan rezultat ispitivanja kao i za alele genske skupine HLA-B\*44, tj. da se svaki pojedini alel

najčešće pojavljuje u haplotipu s drugim alelom lokusa HLA-C. Međutim, za razliku od genske skupine HLA-B\*44 gdje se na razini antigena radi o jednoj specifičnosti, ovdje sva tri najčešća alela, HLA-B\*15:01, -B\*15:17 i -B\*15:18 na razini antigena imaju različite specifičnosti, HLA-B\*62, -B\*63 i -B\*71. Razlog za to leži u činjenici da se aleli HLA-B\*15:01 i -B\*15:17, odnosno -B\*15:18, međusobno razlikuju u čak 15, odnosno 6 aminokiselina koje kodiraju pukotinu za vezanje stranih peptida, tj. građa njihovih antigena/molekula je različita [120]. Alel HLA-B\*15:01 pojavljuje se u haplotipu s čak tri različita alela HLA-C (slika 55) dok -B\*15:17 i -B\*15:18 predominantno tvore haplotipove samo s jednim alelom lokusa HLA-C. Slični rezultati mogu se uočiti za većinu populacija europskog porijekla, ali ne i u svijetu gdje su najčešći haplotipovi HLA-B\*15:01~C s alelima HLA-C\*01:02 i -C\*12:03. Za razliku od alela HLA-B\*15:01, alel -B\*15:17 u cijelom svijetu, pa tako i u Europi najčešće tvori haplotip s alelom HLA-C\*07:01. Za alel HLA-B\*15:18 postoji vrlo malo dostupnih podataka, ali u populacijama europskog porijekla, kao i kod nas, najčešća je kombinacija HLA-B\*15:18~C\*07:04, dok u populacijama azijskog porijekla najčešća je kombinacija HLA-B\*15:18~C\*08:01 koja nije uočena u našoj populaciji [7].

Haplotipovi alela HLA-B\*38:01 s alelima lokusa HLA-C pokazali su jedan od najsnažnijih uočenih LD-a. Alel HLA-B\*38:01 je u ovom istraživanju uočen 930 puta i od toga je kod 913 osoba (98,2%) tvorilo haplotip s alelom HLA-C\*12:03. Istovremeno je zanimljivo istaknuti da je danas poznato 165 alela genske skupine HLA-B\*38 [3], a u našem istraživanju je osim predominantnog alela HLA-B\*38:01 još samo jedan put uočen alel HLA -B\*38:08. Rezultati raspodjele ovog alela upućuju na jugoistočnu Europu kao ishodište širenja po Europi, odnosno svijetu (slika 82) [43]. Svi preostali dobro opisani aleli, HLA-B\*38:02, -B\*38:03, -B\*38:04, -B\*38:05 i -B\*38:06, najčešće su prijavljivani u populacijama azijskog porijekla dok podatci za Europu jedino pokazuju prisutnost alela HLA-B\*38:02 i to u rasponu učestalosti od 0,002% u Poljskoj do 0,2% u Makedoniji [7].



Slika 82. Raspodjela alela HLA-B\*38:01 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA

Unutar genske skupine HLA-B\*40, tri najčešća alela bila su HLA-B\*40:01, -B\*40:02 i -B\*40:06. Alel HLA-B\*40:01 je u 97,4% haplotipova u kombinaciji s alelom HLA-C\*03:04. Slična učestalost ovog haplotipa prijavljena je u gotovo cijeloj Europi s tim da su najviše frekvencije uočene na sjeveru Europe (Irska) [7]. Druga dva alela ove genske skupine, aleli HLA -B\*40:02 i -B\*40:06 unatoč tome što su po svojoj građi vrlo slični i razlikuju se međusobno samo u dvije aminokiseline kodirane u egzonu 2 [3], najčešće haplotipove tvore s različitim alelima HLA-C. Alel HLA-B\*40:02 bio je u približno 90% ispitanika u haplotipu s alelom HLA-C\*02:02 dok je alel HLA-B\*40:06 u 86,7% ispitanika uočeno u haplotipu s alelom HLA-C\*15:02. Usporedba naših rezultata s rezultatima drugih populacija nije pokazala nikakva odstupanja za navedene alele.

U genskoj skupini HLA-B\*13 u Hrvatskoj su otkrivena samo dva alela, alel HLA -B\*13:02 i -B\*13:10 koji se je pojavio samo jednom. Haplotipovi alela HLA-B\*13:02 u gotovo 97% slučajeva uključivali su alel HLA-C\*06:02 što je slučaj u svim populacijama europskog porijekla [7].

Posljednja analizirana genska skupina bila je HLA-B\*39, odnosno njezina dva najčešća alela, HLA-B\*39:01 i -B\*39:06. Alel HLA-B\*39:01 predominantno tvori haplotipove s alelima HLA-C\*12:03, te -C\*07:02 i -C\*07:01, što je uočeno i u drugim populacijama europskog



porijekla. Tako su u Poljskoj i Engleskoj učestalosti haplotipova HLA-B\*39:01~C vrlo slične našim rezultatima, a Austrija i Italija kao drugi najčešći haplotip prijavljuju HLA-B\*39:01~C\*15:02 koji je kod nas na četvrtom mjestu. Istovremeno, alel HLA-B\*39:06 najčešće dolazi u haplotipu s alelom HLA-C\*07:02 (49,2%), a na drugom je mjestu alel HLA-C\*12:03. Za razliku od naših rezultata, u Italiji je jedna od najčešćih kombinacija HLA-B\*39:06~C\*04:01 [7]. Treba naglasiti da unatoč velikom broju radova o raznovrsnosti genskih skupina/alela HLA, postoje brojne populacije za koje nema dostupnih podataka ili su ti podatci manjkavi. U ovom trenutku nema podataka za većinu populacija jugoistočne Europe, u kojima su možda prisutni takvi haplotipovi.

Analizom 50 najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 prikazanih u tablici 19 pokazano je da čak njih 10 ima negativnu vrijednost LD-a. Kao i za haplotipove HLA-B~C i ovim istraživanjem htjeli smo utvrditi razlike u haplotipovima između pojedinih alela iste genske skupine lokusa HLA-B. Takvom analizom obuhvaćeno je 6 najpolimorfnijih genskih skupina HLA-B. Genska skupina HLA-B\*35 najčešće je tvorila haplotipove s genskim skupinama HLA-DRB1\*01 i -DRB1\*11. Gledajući na razini alela, HLA-B\*35:01 je u najvećem postotku uočen u kombinaciji s alelom HLA-DRB1\*01:01, alel HLA-B\*35:02 s alelom -DRB1\*11:04, alel -B\*35:03 s alelom -DRB1\*11:01, a alel HLA-B\*35:08 s alelom -DRB1\*16:01. U usporedbi s drugim populacijama, rezultati su slični za Italiju, Španjolsku i Tursku dok je u Portugalu najčešći haplotip HLA-B\*35:02 s alelom HLA-DRB1\*03:01 te HLA-B\*35:03 s alelom -DRB1\*04:03. Zanimljivo je uočiti i odsutnost nekih haplotipova, primjerice HLA-B\*35:01~DRB1\*04:03 koji je prijavljen u Austriji i Italiji, a kod nas nije pronađen [7].

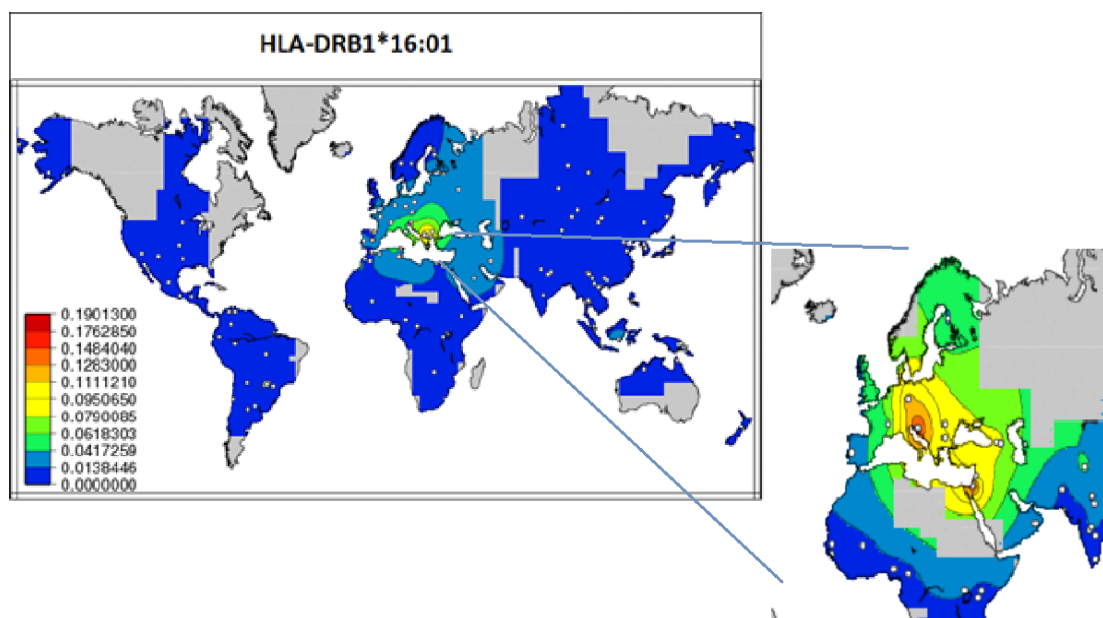
Aleli genske skupine HLA-B\*44 predominantno su uočeni u haplotipu s alelima HLA-DRB1\*07:01 i -DRB1\*16:01. Alel -B\*44:03 prvenstveno dolazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*07:01 i čine jednu od najjačih neravnoteža udruživanja haplotipova HLA-B~DRB1. Za alel HLA-B\*44:02:01G dostupni podatci pokazuju da je na sjeveru Europe najčešći haplotip HLA-B\*44:02:01G~DRB1\*04:01 koji je kod nas drugi po učestalosti [7].

I aleli HLA-B\*27:02 i -B\*27:05 razlikuju se s obzirom na najčešći alel lokusa HLA-DRB1 s kojim se pojavljuju u haplotipu. Alel HLA-B\*27:02 gotovo isključivo dolazi u haplotipu s alelom HLA-DRB1\*16:01, dok alel HLA-B\*27:05 najčešće tvori haplotip s alelom -DRB1\*01:01. Za razliku od haplotipova HLA-B\*27:02~DRB1\*16:01 čija je neravnoteža udruživanja približno jednaka posvuda u Europi, za haplotip HLA-B\*27:05~DRB1\*01:01 naši rezultati nisu u potpunosti u skladu s objavljenim podacima. Primjerice, u Švedskoj ovaj se haplotip nalazi tek na šestom mjestu haplotipova HLA-B\*27:05~DRB1, a u Italiji na četvrtom i ne pokazuje tako visoku vrijednost LD-a [7].

Dobiveni rezultati za haplotipove HLA-B~DRB1 pojedinih alela genske skupine HLA-B\*15 ukazali su na postojanje razlika između naše i većine europskih populacija. Za najčešći alel ove genske skupine, HLA-B\*15:01, ne postoji dominantni alel HLA-DRB1 s kojim formira haplotip, već se čak pet alela statistički značajno češće pojavljuje s njim nego s alelom -B\*15:17. Svi ti haplotipovi nalaze se među najčešćim haplotipovima i u ostatku Europe, s manjim razlikama u poretку učestalosti [7]. Istovremeno, najčešći haplotip koji tvori alel HLA-B\*15:17, haplotip HLA-B\*15:17~DRB1\*13:02 prisutan je diljem Europe sa sličnom učestalošću kao u Hrvatskoj. Alel HLA-B\*15:18 kod najvećeg se broja ispitanika pojavio u haplotipu HLA-B\*15:18~DRB1\*08:04 koji je u Hrvatskoj puno češći nego u nekim drugim europskim zemljama (Francuska, Grčka, Portugal i Turska).

Među haplotipovima HLA-B\*40~DRB1, haplotip HLA-B\*40:01~DRB1\*13:02 najčešće je bio prisutan u Hrvatskoj, ali i u Austriji, Francuskoj, Grčkoj i Italiji, iako s različitim učestalostima, što je i očekivano s obzirom na razlike u raspodjeli alela HLA-B\*40:01 među navedenim populacijama. Učestalost haplotipa je niža na jugu Europe (0,1-0,2%) nego u središnjoj i sjevernoj Europi (0,7-0,8%). Među haplotipovima koji uključuju alel HLA-B\*40:02, u većini europskih populacija najčešći je HLA-B\*40:02~DRB1\*11:01 dok je haplotip HLA-B\*40:02~DRB1\*16:02 prijavljen samo u populacijama jugoistočne Europe (Bosni i Hercegovini, Grčkoj, Rumunjskoj i Turskoj) [7].

Raspodjela haplotipova najčešćih alela genske skupine HLA-B\*39 u skladu je s podacima ostalih europskih populacija. Među haplotipovima koje tvori alel HLA-B\*39:06 statistički se značajno ističu kombinacije s alelima HLA-DRB1\*08:01 i -DRB1\*16:01 što je u skladu s objavljenim podacima za Austriju, Grčku, Italiju i Portugal) [7]. Također, alel HLA-DRB1\*16:01 prisutan je i u haplotipu s alelom HLA-B\*39:01 što odgovara učestalostima ovog haplotipa na jugu, ali ne i na sjeveru Europe. Ovaj rezultat posljedica je gradijenta učestalosti samog alela HLA-DRB1\*16:01 u Europi čija zastupljenost je najveća na jugu te postupno pada prema sjeveru Europe (slika 83). I druga istraživanja utvrdila su da je alel HLA-DRB1\*16:01 nastao na jugu Europe od kuda se proširio prema sjeveru [43].



Slika 83. Raspodjela alela HLA-DRB1\*16:01 u svijetu (preuzeto iz reference 43). Brojevi uz boje predstavljaju učestalost alela HLA

Zadnji dio ovog rada obuhvatio je analizu produženih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1. U tablici 32 prikazana je usporedba deset naših najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 s podacima o učestalosti haplotipova u bazi HaploStats te s 13 europskih populacija za koje postoje objavljeni podatci [86, 121]. Haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01, najučestaliji je haplotip u svim populacijama osim populaciji Turske gdje se nalazi na četvrtom mjestu. Slični rezultati dobiveni su i usporedbom trećeg najčešćeg haplotipa HLA-A\*03:01~B\*07:02~C\*07:02~DRB1\*15:01 koji je u svim populacijama također bio drugi ili treći izuzev Turske gdje je bio trinaesti. Drugi najčešći haplotip u Hrvatskoj, HLA-A\*02:01~B\*18:01~C\*07:01~DRB1\*11:04, bio je među prvih deset haplotipova u Grčkoj, Italiji, Rumunjskoj i Turskoj dok se u ostalim populacijama nalazio između 14. i 35. mjesta. Naime, haplotip je pokazao veću učestalost na jugu negoli na sjeveru Europe. Pretpostavka je da se alel HLA-DRB1\*11:04 (a time i navedeni haplotip) širio iz Male Azije prema Europi, iz čega proizlaze i opisane regionalne razlike.

Četvrti haplotip prema učestalosti, s frekvencijom od 1,1%, HLA-A\*02:01~B\*27:02~C\*02:02~DRB1\*16:01 prvi je haplotip za koji su uočena značajnija odstupanja između naše i drugih populacija. Među prvih deset haplotipova, ovaj se haplotip pojavio samo u Grčkoj i Poljskoj, u šest su populacija nalazio među prvih 100 haplotipova, dok se u Francuskoj, Italiji, Portugalu, Španjolskoj i Turskoj nalazio između 126. i 820. mjesta.

Uočeni rezultati u skladu su s učestalošću samog alela HLA-B\*27:02 koja je niska na sjeveru Europe i raste prema jugu. Najveća razlika uočena je za naš deveti najčešći haplotip (HLA-A\*02:01~B\*44:02:01G~C\*07:04~DRB1\*16:01) koji je najveću zastupljenost pokazao u Poljskoj gdje je bio na 18. poziciji, dok je u Nizozemskoj bio tek na 912. mjestu, a u Velikoj Britaniji nije ni referirana njegova prisutnost. Također, zanimljivo je uočiti da je alel HLA-B\*35:01 jedini alel lokusa HLA-B koji se pojavljuje u dva od deset najčešćih haplotipova u Hrvatskoj, koji se povrhu toga razlikuju samo za gensku skupinu lokusa HLA-A, dok su aleli lokusa -C i -DRB1 isti (HLA-A\*03:01~B\*35:01~C\*04:01~DRB1\*01:01 i HLA-A\*11:01~B\*35:01~C\*04:01~DRB1\*01:01, pozicije 6 i 8) [121].

S druge strane, analizom najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u 13 europskih populacija, a koji nisu bili među deset najčešćih haplotipova u Hrvatskoj, otkriveno je 13 haplotipova koji su u našoj populaciji, prema učestalosti, bili između 11. i 117. mjesta. Najveću razliku, prema učestalosti, pokazao je haplotip HLA-A\*02:01~B\*44:03~C\*04:01~DRB1\*07:01 koji je kod nas imao frekvenciju od samo 0,1%, dok je u Portugalu bio na četvrtom mjestu s čak deset puta većom učestalošću (1,2%) [121]. Najveća razlika uočena je u usporedbi s rezultatima iz Turske, budući se prva tri haplotipa prema učestalosti u Turskoj kod nas nalaze na pozicijama 21, 22 i 13. Haplotip HLA-A\*02:01~B\*07:02~C\*07:02~DRB1\*15:01 koji je u Hrvatskoj bio na 14. mjestu, u čak osam populacija bio je među prvih pet haplotipova (tablica 33).

**Tablica 32.** Poredek deset najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u Hrvatskoj i njihova pozicija u dijelu populacija Europe i SAD-u<sup>#</sup>

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	EUR CAU <sup>1</sup>	CAU <sup>2</sup>	At	Es	Fr	GB	Gr	It	Nl	Pl	Pt	Ro	Ru	Tr	US
1	01:01~08:01~07:01~03:01	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
2	02:01~18:01~07:01~11:04	33	27	14	26	28	30	2	4	22	21	30	2	18	9	35
3	03:01~07:02~07:02~15:01	2	2	2	3	2	2	6	2	2	2	2	3	2	13	2
4	02:01~27:02~02:02~16:01	130	77	41	469	820	76	9	126	81	9	156	17	36	233	37
5	02:01~13:02~06:02~07:01	16	15	4	24	32	12	93	13	21	4	5	8	5	18	31
6	03:01~35:01~04:01~01:01	7	6	9	8	11	10	10	9	4	6	16	4	4	16	4
7	23:01~44:03~04:01~07:01	14	14	6	7	12	23	33	14	10	14	6	16	15	23	12
8	11:01~35:01~04:01~01:01	15	16	15	14	9	21	23	16	18	7	15	13	14	17	57
9	02:01~44:02:01G~07:04~16:01	213	133	102	569	333	/	244	304	912	18	42	39	32	133	246
10	02:01~27:05~02:02~01:01	99	64	88	162	392	/	114	69	383	20	102	20	33	293	164

<sup>1</sup>EUR CAU – pozicije haplotipova u bazi s približno 400 000 uzoraka davatelja s područja Europe; <sup>2</sup>CAU – pozicije haplotipova u bazi s približno 1,8 mil uzoraka davatelja s područja Europe, zapadne, središnje i južne Azije i sjeverne Afrike; At – Austrija; Es – Španjolska; Fr – Francuska; GB – Ujedinjeno Kraljevstvo; Gr – Grčka; It – Italija; Nl – Nizozemska; Pl – Poljska; Pt – Portugal; Ro – Rumunjska; Ru – Rusija; Tr – Turska; US – Sjedinjene Američke Države, # - podatci preuzeti iz referenci 86 i 121

**Tablica 33.** Najčešći haplotipovi HLA-A~B~C~DRB1 u populacijama Europe i SAD-u<sup>#</sup> koji nisu bili među prvih deset haplotipova prema učestalosti u Hrvatskoj

	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	Hr	At	Es	Fr	GB	Gr	It	Nl	Pl	Pt	Ro	Ru	Tr	US
1	02:01~07:02~07:02~15:01	14	3	5	4	4			3	3			3		3
2	01:01~57:01~06:02~07:01	29	5												
3	29:02~44:03~16:01~07:01	46		2	3	5					3				
4	02:01~44:02~05:01~04:01	28			5	3									
5	24:02~35:02~04:01~11:04	21					3	5						1	
6	02:01~35:01~04:01~14:01	78					4								
7	33:01~14:02~08:02~01:02	13					5							3	
8	30:01~13:02~06:02~07:01	22						3						2	
9	02:01~15:01~03:04~04:01	20							5						
10	25:01~18:01~12:03~15:01	11								5					
11	02:01~44:03~04:01~07:01	117									4				
12	02:01~38:01~12:03~13:01	30										5			
13	02:01~08:01~07:01~03:01	15													5

At – Austrija; Es – Španjolska; Fr – Francuska; GB – Ujedinjeno Kraljevstvo; Gr – Grčka; It – Italija; Nl – Nizozemska; Pl – Poljska; Pt – Portugal; Ro – Rumunjska; Ru – Rusija; Tr – Turska; US – Sjedinjene Američke Države, <sup>#</sup> - podatci preuzeti iz referenci 86 i 121

Podudarnost bolesnika i nesrodnog davatelja u TKMS izražava se kao broj podudarnosti u alelima HLA, no podudarnost u svim alelima HLA ne podrazumijeva nužno i podudarnost cijelog haplotipa HLA, jer iste kombinacije alela HLA mogu potjecati s različitih haplotipova. Stoga su istraživanja raspodjele alela i haplotipova HLA u nesrodnih davatelja i u bolesnika u programu nesrodne TKMS vrijedan i neophodan izvor podataka potrebnih kako za brzinu i uspjeh pronalaska HLA najpodobnijeg nesrodnog davatelja tako i za uspješan ishod TKMS. U brojnim radovima pokazano je da osim uključivanja što većeg broja dobrovoljnih davatelja u nacionalni i svjetski registar, pronalasku HLA podudarnog nesrodnog davatelja pridonosi i raznovrsnost alela i haplotipova HLA te analize njihovih raspodjela unutar pojedinih populacija [114, 122-125]. Tako je istraživanje Jörisa i sur. u skupini 348 bolesnika transplantiranih u programu TKMS od nesrodnog davatelja pokazalo da su bolesnici s čestim haplotipom HLA visoke vrijednosti LD imali statistički značajno manju vjerojatnost razvoja aGvHD-a bez porasta učestalosti relapsa nego bolesnici koji su imali haplotipove niske vrijednosti LD [126]. Važnost poznavanja učestalosti i strukture haplotipova HLA dokumentirana je i u radovima koji su pratili ishode TKMS kod bolesnika koji su se s davateljem podudarali za cjelokupan haplotip HLA, a ne samo za pojedinačne alele HLA koji su poticali s različitih haplotipova [125, 127]. Ova istraživanja također su ukazala i na moguću ulogu polimorfizama non-HLA unutar regije HLA i time potaknula brojna istraživanja o njihovoj važnosti u ishodu TKMS [128].

Zbog svega navedenog, nakon populacijskog dijela istraživanja, sljedeći cilj ovog rada bio je analizirati raspodjelu alela i haplotipova HLA u skupini od 261 nesrodnog bolesnika u programu nesrodne TKMS u Hrvatskoj te odrediti čimbenike HLA koji su utjecali na pronalazak nesrodnog davatelja.

Rezultati su pokazali učestalost genskih skupina i alela HLA bez statistički značajnih razlika između bolesnika i kontrolne skupine. Dodatno, bez obzira što je u populacijskom istraživanju broj zdravih ispitanika bio skoro 40 puta veći, među bolesnicima su uočena dva alela (HLA-A\*02:09 i -C\*07:18) koja nismo uočili među nesrodnim davateljima i za koje kod nas nije bilo populacijskih podataka. Analizom haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u ispitivanoj skupini bolesnika utvrđeno je da su dva najučestalija haplotipa (HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01 i -A\*02:01~B\*18:01~C\*07:01~DRB1\*11:04) bila statistički značajno češća među bolesnicima nego u kontroli. Još je 12 haplotipova pokazalo veću učestalost u skupini bolesnika, dok su preostali haplotipovi u skupini bolesnika pokazali slične zastupljenosti kao i u kontroli (tablice 25 i 26).

Analiza nesrodnih davatelja prema porijeklu registra, pokazala je da je za približno četvrtinu bolesnika davatelj pronađen u RDDKMS-u tj. u nacionalnom registru, dok je čak za 75% bolesnika davatelj dolazio iz međunarodnog registra, u najvećem broju slučajeva iz njemačkog Deutsche Knochenmarkspenderdatei (DKMS). DKMS je u ovom trenutku najveći svjetski registar s preko devet milijuna tipiziranih davatelja [132] koji uključuju veliki broj davatelja iz različitih zemalja širom svijeta što doprinosi velikoj raznovrsnosti alela i haplotipova HLA [121].

HLA podudarnog davatelja, za sva četiri lokusa koja su istraživana u ovom radu, pronašlo je više od 70% bolesnika što je u skladu s istraživanjima provedenim u SAD-u za bolesnike europskog porijekla [133], kao i s istraživanjima provedenim u Švicarskoj [115]. Međutim, u navedenim istraživanjima postotci su značajno niži za bolesnike azijskog ili afričkog porijekla, jer u svjetskom registru prevladavaju davatelji europskog porijekla dok su oni afričkog, odnosno azijskog puno manje zastupljeni. Naime, najveći registri uključeni u rad WMDA-a su njemački, američki i brazilski registri koji okupljaju više od 70% davatelja [4]. S druge strane, najmnogoljudnije azijske zemlje kao što su Kina, Indija i Indonezija imaju nacionalne registre uključene u rad WMDA-a, ali koji nisu brojem davatelja proporcionalni veličini spomenutih zemalja. Situacija je još lošija za afrički kontinent gdje u ovom trenutku postoje dva veća registra, onaj u Južnoafričkoj Republici i u Nigeriji s manje od 100 000 nesrodnih davatelja [4, 134, 135].

Podjelom davatelja prema učestalosti haplotipa HLA u populaciji (vrlo čest/čest/rijedak) najveći broj bolesnika (28,0%) imao je kombinaciju vrlo čestog i čestog haplotipa, a najmanji broj bolesnika (8,1%) imao je kombinaciju dva česta haplotipa. Analiza porijekla davatelja prema registru pokazala je da isključivo bolesnici s kombinacijom dva vrlo česta haplotipa češće pronalaze davatelja u nacionalnom registru (RDDKMS), dok bolesnici sa svim drugim haplotipskim kombinacijama davatelja češće pronalaze u međunarodnim registrima.

U slučajevima bolesnika kojem nije pronađen HLA podudarni nesrodni davatelj, odabir se mora usmjeriti prema odabiru HLA nepodudarnog davatelja koji donosi primarnu dilemu u odluci o razini prihvatljive HLA nepodudarnosti, uzimajući u obzir sva znanja o utjecaju na uspješan ishod TKMS [136-138]. Velik broj radova analizirao je utjecaj nepodudarnosti HLA na ishod TKMS, ali vrlo često s kontradiktornim rezultatima. Dok dio istraživača pokazuje podjednak utjecaj svake nepodudarnosti [139] uz akumulaciju negativnog utjecaja s povećanjem broja nepodudarnosti, druga istraživanja ističu nepodudarnosti na lokusima HLA -A i -B kao one koje imaju najveći utjecaj na ishod TKMS [96]. Nasuprot tome, rezultati



istraživanja Tiercya i sur. iz 2014. god. ističu najveći utjecaj HLA-DRB1 nepodudarnosti na ishod TKMS [20].

Utjecaj nepodudarnosti na ishod TKMS značajno ovisi i o tome radi li se o nepodudarnosti na razini genske skupine ili na razini alela. Naime, većina uočenih nepodudarnosti na lokusima HLA-A i -C među našim bolesnicima bila je na razini genskih skupina, dok su bolesnici s nepodudarnošću na lokusima HLA-B i -DRB1 u većini slučajeva bili transplantirani s davateljem nepodudarnim na razini alela HLA. Jedno od objašnjenja ovih rezultata je da lokusi HLA-B i -C kao i HLA-DRB1 i -DQB1 pokazuju najsnažniju neravnotežu udruživanja pa bi nepodudarnost na razini genske skupine lokusa HLA-B i -DRB1 dovela do nepodudarnosti na razini gena i na lokusu HLA-C, odnosno -DQB1, što najčešće nije opcija u odabiru nesrodnog davatelja. Također, novija istraživanja nepodudarnosti dijele u skupine dozvoljenih i nedozvoljenih. U istraživanju Fernandez-Vine i suradnika iz 2015. godine, pokazano je da nepodudarnost HLA-C\*03:03/03:04 nema utjecaja na ishod TKMS [140]. Međutim, istraživanja su usuglašena u zaključku da, kada god je to moguće, treba izbjegavati TKMS s nepodudarnosti na razini genskih skupina HLA [141]. Dosadašnji radovi iznijeli su rezultate da upravo nepodudarnosti na lokusu HLA-C često predstavljaju jedinu mogućnost za bolesnike koji traže podudarnog davatelja. Rezultati tih studija pokazali su da 15-30% od ukupnog broja nepodudarnosti predstavljaju upravo nepodudarnosti na lokusu HLA-C [20]. Naši rezultati koji su pokazali da je 25% bolesnika bilo nepodudarno za lokus HLA-C u skladu su s navedenim podacima [20].

Analiza nepodudarnosti u lokusu HLA-C pokazala je da je u većine bolesnika uzrok tome bio alel lokusa HLA-B koji je u populacijskom istraživanju pokazao veliku raznolikost haplotipova HLA-B~C, kao što su aleli HLA-B\*51:01, -B\*44:02 i -B\*35:03. Tako, nakon što smo ovim istraživanjem odredili učestalost haplotipova HLA-B\*51:01-C, znamo da bolesnik s haplotipom HLA-B\*51:01~C\*01:02 ima tek oko 30% vjerojatnosti podudarnosti s nesrodnim davateljem, odnosno manje od 1% ako je nositelj haplotipa HLA-B\*51:01~C\*07:01. U slučaju haplotipa HLA-B\*35:03~C, nepodudarnost je kod 3 bolesnika bila u alelu HLA-C\*12:03, budući haplotip HLA-B\*35:03~C\*12:03 čini gotovo 20% haplotipova alela HLA-B\*35:03, a predominantni haplotip je s alelom -C\*04:01. Dobiveni rezultati su također u skladu i s istraživanjem provedenim među švicarskim bolesnicima u kojem su autori došli do sličnih zaključaka [142]. Haplotipovi HLA-B\*44:02~C\*04:01 i HLA-B\*44:02~C\*07:04, uočeni kod dva bolesnika, također predstavljaju rizičan čimbenik u pronalaženju HLA podudarnog davatelja jer alel HLA-B\*44:02 najčešće dolazi u kombinaciji s alelom -C\*05:01 (>70% haplotipova) dok se alel -C\*04:01 pojavljuje češće u kombinaciji s alelom -B\*44:03. Od

preostalih nepodudarnosti, problem u pronalasku HLA podudarnog davatelja predstavljali su još aleli HLA-B\*15:01, -B\*18:01 i -B\*27:05.

Analiza podudarnosti bolesnika i nesrodnog davatelja (podudaranost 8/8; podudarnost 6-7/8) pokazala je da je sveukupno 95% bolesnika s kombinacijom dva vrlo česta haplotipa ili s kombinacijom vrlo čestog i čestog haplotipa pronašlo potpuno podudarnog davatelja. S druge strane, bolesnici sa svim ostalim haplotipskim kombinacijama češće su pronalazili davatelja s jednom ili dvije nepodudarnosti i tek ih je sveukupno 50% pronašlo podudarnog davatelja. Ovi rezultati, u skladu su s rezultatima istraživanja u Francuskoj, na više od 2000 bolesnika, koji su pokazali da je kod gotovo 30% bolesnika koji nisu uspjeli naći HLA podudarnog davatelja, uzrok bio haplotip koji si pojavio samo jednom među bolesnicima i nije bio poznat iz populacijskih studija [131].

U ovom istraživanju, populacijski podatci o učestalosti alela i haplotipova lokusa HLA-A, -B, -C i -DRB1 istraženi su na velikom uzorku nesrodnih ispitanika što je omogućilo stvaranje baze podataka i začetak nacionalnog kataloga polimorfizama HLA. Značaj ovih podataka analiziran je na primjeru odabira imunološki podudarnog davatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica s nesrodnog davatelja, ali uz to, podatci će biti temelj znanstvenim i primjenjenim istraživanjima u svim područjima u kojima polimorfizam sustava HLA ima nezaobilaznu ulogu.

## **6. ZAKLJUČAK**

Istraživanjem alela i haplotipova HLA-A, B, C, DRB1 u Hrvatskoj dobiveni su podatci o njihovoj raznolikosti i učestalostima temeljem čega je provedeno razvrstavanje u skupine čestih, rijetkih i vrlo rijetkih alela i haplotipa HLA u našoj populaciji. Sve to zajedno predstavlja doprinos projektu stvaranja baze podataka o polimorfizmu HLA u populacijama Europe i svijeta kao osnovu za antropološka istraživanja o migracijama populacija i nastanka pojedinih alela i haplotipa HLA, ali i doprinos daljnjim znanstvenim i kliničkim istraživanjima u Hrvatskoj.

Najpolimorfiji je lokus, s 29 genskih skupina i 92 alela bio lokus HLA-B. Lokus HLA-DRB1 bio je najmanje raznolik lokus s 13 genskih skupina, no s 56 alela bio je drugi najpolimorfiji lokus. Na lokusu HLA-A ukupno je uočeno 19 genskih skupina i 49 alela, a na lokusu HLA-C 14 genskih skupina i 36 alela.

Najčešći aleli lokusa HLA-A bili su HLA-A\*02:01 (29,1%), -A\*01:01 (13,1%), -A\*24:02 (11,5%) i -A\*03:01 (11,0%). Na lokusu HLA-B, najčešći su bili HLA-B\*51:01 (10,5%), -B\*18:01 (8,6%), -B\*08:01 (8,1%) i -B\*07:02 (7,1%). Najčešći aleli lokusa HLA-C u Hrvatskoj su HLA-C\*07:01 (15,8%), -C\*04:01 (14,9%), -C\*12:03 (12,1%) i -C\*02:02 (9,2%), te na lokusu HLA-DRB1 aleli HLA-DRB1\*03:01 (10,6%), -DRB1\*16:01 (10,0%), -DRB1\*01:01 (9,6%) i -DRB1\*07:01 (9,0%). Usporedbom dobivenih rezultata s podacima drugih europskih populacija utvrđene su sličnosti, ali i neke specifičnosti naše populacije.

Tijekom istraživanja otkrivena su dva nova alela, HLA-A\*01:200 i -B\*18:37:02 te potvrđena odlukom Odbora za nomenklaturu čimbenika sustava HLA (engl. The Nomenclature Committee for factors of the HLA System) pri Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. World Health Organization, WHO).

Analizom haplotipova dvaju lokusa HLA određeno je ukupno 781 haplotipa HLA-A~B u ispitivanom uzorku, od kojih je najčešći bio HLA-A\*01:01~B\*08:01 (6,2%). Haplotip HLA-B\*08:01~C\*07:01 je s učestalošću 7,6% bio najčešći među 356 uočenih haplotipa HLA-B~C, dok je među 998 haplotipa HLA-B~DRB1, najčešći bio HLA-B\*08:01~DRB1\*03:01 s učestalošću 6,8%. Analiza učestalosti haplotipova triju lokusa HLA utvrdila je da je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01 najzastupljeniji (6,1%) među 1414 kombinacija HLA-A~B~C, dok je haplotip HLA-A\*01:01~B\*08:01~DRB1\*03:01 bio prisutan u najvećem postotku (5,3%) među haplotipovima HLA-A~B~DRB1 (N=3490).

Istraživanjem haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 otkriven je ukupno 4261 haplotip od kojih je najčešći bio HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01 (5,2%).

Tri haplotipa HLA-A~B~C~DRB1 (HLA-A\*02:01~B\*27:02~C\*02:02~DRB1\*16:01, -A\*02:01~B\*44:02:01G~C\*07:04~DRB1\*16:01, -A\*02:01~B\*27:05~C\*02:02~DRB1\*01:01) pripadali su skupini 10 najčešćih haplotipa HLA-A~B~C~DRB1 u Hrvatskoj, no u populacijama europskog porijekla ne nalaze se niti u skupini 100 najčešćih haplotipa te se temeljem toga ističu kao specifičnost naše populacije.

Analizom raspodjele alela i haplotipova HLA u skupini parova primatelj/nesrodni davatelj utvrđen je broj i vrsta nepodudarnosti HLA te ograničavajući čimbenici HLA u traženju HLA podudarnog davatelja. Ograničavajući čimbenici HLA neuobičajene su ili vrlo rijetke kombinacije haplotipova HLA-B~C koje su uključivale alele HLA-B\*51:01, -B\*35:03, -B\*15:01 i -B\*44:02:01G te prisustvo rijetkih alela HLA kao što su aleli HLA-A\*02:09, -A\*24:07 te -B\*15:24.

Rezultati istraživanja potvrđuju i naglašavaju važnost osnivanja i razvoja manjih i srednje velikih registara dobrovoljnih davatelja KMS. Ovim istraživanjem dokazane su specifičnosti u raspodjeli alela i haplotipa HLA za hrvatsku populaciju pa time i naš, srednje velik registar, doprinosi raznolikosti fenotipova HLA u svjetskom registru i povećava mogućnost pronalaska davatelja svim bolesnicima u svijetu, posebno onima s rijetkim ili vrlo rijetkim alelima i haplotipovima HLA unutar njihovih populacija.

Dobiveni rezultati temelj su za uspostavu algoritma traženja nesrodnog davatelja čime će se značajno unaprijediti cjelokupni postupak pronalaska i odabira HLA optimalnog nesrodnog davatelja za svakog pojedinog bolesnika u programu nesrodne TKMS.

## **7. POPIS LITERATURE**

- [1] Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J* 2014;5(4):e0028.
- [2] Mehra NK (2010): *The HLA Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi.
- [3] Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research* 2020;48:D948-55.
- [4] World Marrow Donor Association (WMDA) Stem Cell Registries Annual Report 2019. 2019. [www.wmda.info/about-us/publications/30-annual-reports](http://www.wmda.info/about-us/publications/30-annual-reports) (last accessed February 10, 2020).
- [5] Eberhard HP, Feldmann U, Bochtler W, Baier D, Rutt C, Schmidt AH, Müller CR. Estimating unbiased haplotype frequencies from stem cell donor samples typed at heterogeneous resolutions: a practical study based on over 1 million German donors. *Tissue Antigens* 2010;76(5):352-61.
- [6] Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens* 2014;83:307-323.
- [7] Gonzalez-Galarza FF, Takeshita LY, Santos EJ, Kempson F, Maia MH, Silva AL, Silva AL, Ghataoraya GS, Alfirevic A, Jones AR and Middleton D. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acid Research* 2015;28:D784-8.
- [8] Grubic Z, Zunec R, Naipal A, Kastelan A, Giphart MJ. Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croatians. *Tissue Antigens* 1995;46(4):293-8.
- [9] Grubic Z, Zunec R, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Kastelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2000;27(1):47-51.
- [10] Grubić Z, Zunec R, Stingl K, Svilicić D, Kerhin-Brkljacić V. Haplotypic associations of the two most common HLA-B\*27 alleles in the Croatian population. *Reumatizam*. 2008;55(1):5-9. Croatian.
- [11] Grubic Z, Stingl K, Zunec R. Heterogeneity of HLA-DRB1\*04 alleles and haplotypes in the Croatian population. *Tissue Antigens* 2012;80(3):219-23.
- [12] Calusic M, Grubic Z, Stingl K, Kamenaric MB, Zunec R. Diversity of HLA-B\*35 Alleles and Haplotypes among Croatians, *Immunological Investigations* 2012;41(8):856-863.

- [13] Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Mrcic M, Grubic Z, Bojanic I, Stingl K, Labar B. Allogeneic stem cell transplantation from matched unrelated donor. *Medicina fluminensis* 2011;47(4):381-8.
- [14] Tiercy JM, Bujan-Lose M, Chapuis B, Gratwohl A, Gmür J, Seger R, Kern M, Morell A, Roosnek E. Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1-matched donor? *Bone Marrow Transplant* 2000;26(4):437-41.
- [15] Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(2):207-14.
- [16] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331(6013):44-9.
- [17] Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, Storer B, Mickelson E, Smith A, Anasetti C. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2001;345(25):1794-800.
- [18] Osoegawa K, Mack SJ, Prestegard M, Fernández-Viña MA. Tools for building, analyzing and evaluating HLA haplotypes from families. *Hum Immunol* 2019;80(9):633-643.
- [19] Jöris MM, Lankester AC, von dem Borne PA, Kuball J, Bierings M, Cornelissen JJ, Groenendijk-Sijnke ME, van der Holt B, Haasnoot GW, van der Zanden HG, van Walraven SM, van Rood JJ, Claas FH, Oudshoorn M. The impact of frequent HLA haplotypes in high linkage disequilibrium on donor search and clinical outcome after unrelated haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(4):483-90.
- [20] Tiercy JM. HLA-C Incompatibilities in Allogeneic Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2014;5:216.
- [21] Oudshoorn M, Cornelissen JJ, Fibbe WE, de Graeff-Meeder ER, Lie JL, Schreuder GM, Sintnicolaas K, Willemze R, Vossen JM, van Rood JJ. Problems and possible solutions in finding an unrelated bone marrow donor. Results of consecutive searches for 240 Dutch patients. *Bone Marrow Transplant* 1997;20(12):1011-7.
- [22] Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
- [23] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Inc., Philadelphia 2015.



- [24] Foroni I, Rita A, Filipe B, Santos M, Lima M, Bruges-Armas J. HLA-E, HLA-F and HLA-G — The Non-Classical Side of the MHC Cluster. *HLA and Associated Important Diseases* 2014.
- [25] Kubly J. Major histocompatibility complex. U: Kubly J. (ur.) *Immunology*. Freeman W.H.and Company, New York 1997, str. 223-248.
- [26] Koskela S, Ritari J, Hyvärinen K, Kwan T, Niittyvuopio R, Itälä-Remes M, Pastinen T, Partanen J. Hidden genomic MHC disparity between HLA-matched sibling pairs in hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Rep* 2018;8(1):5396.
- [27] Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue antigens* 2009;74(2):101-116.
- [28] Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007;48(1):11-23.
- [29] Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 1997;90(11):4252-65.
- [30] Begovich AB, McClure GR, Suraj VC i sur. Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 1992;148(1):249-258.
- [31] Amos DB. HLA – A Mouser’s Recollections. In: *History of HLA: Ten Recollections*. Terasaki PI (ed.), Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory 1990:61-97.
- [32] Meyer D, C Aguiar VR, Bitarello BD, C Brandt DY, Nunes K. A genomic perspective on HLA evolution. *Immunogenetics* 2018;70(1):5-27.
- [33] Amos DB. HLA – A Mouser’s Recollections. In: *History of HLA: Ten Recollections*. Terasaki PI (ed.), Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1990: 61-97.
- [34] Amos DB. Summary. In: Amos DB, ed. *Histocompatibility Testing*, Publication 1229. Washington DC: National Academy of Science – National Research Council, 1965, 187–9.
- [35] Dausset J, Ivanyi P, Ivanyi D. Tissue alloantigens in humans: identification of a complex system (Hu-1). In: Amos DB, van Rood JJ, eds. *Histocompatibility Testing* 1965. Copenhagen: Munksgaard, 1965, 51–62.
- [36] Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM. The workshop data and nomenclature: HLA. In: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM, eds. *Histocompatibility Testing* 1967. Copenhagen: Munksgaard 1967;435–49.
- [37] Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F. The HL-A system: evidence of a third sub-locus. *Scand J Haematol* 1970;7:195–200.
- [38] Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1977; 53:1–11.

- [39] Dupont B, ed. Immunobiology of HLA. Histocompatibility Testing 1987, Vol. I, and Immunogenetics and Histocompatibility, Vol II. Springer-Verlag, New York, 1988.
- [40] Albert ED, Baur MP, Mayr WR, eds. Histocompatibility Testing 1984. Heidelberg: Springer-Verlag, 1984.
- [41] Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. HLA 1991. New York: Oxford University Press, 1992.
- [42] Charron, D, ed. Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications. France: EDK, 1996.
- [43] <http://www.pypop.org/popdata/index.html>
- [44] Kastelan A, Kerhin-Brkljacic V, Hors J, Brkljacic LJ, Macaskovic P. The Distribution of HL-A Antigens and Genes in the Yugoslav Population. *Tissue Antigens* 1974;4(1): 69–75.
- [45] Jajić I, Kastelan A, Brkljacić L, Kerhin-Brkljacić V, Cecuk L. Histocompatibility antigens in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Reumatizam* 1975;22(2):43-50.
- [46] Jajić I, Kastelan A. HLA-B27 antigen in ankylosing spondylitis and its role in the etiopathogenesis of the disease. *Reumatizam* 1977;24(6):195-200.
- [47] Grubić Z, Zunec R, Cecuk-Jelčić E, Kerhin-Brkljacić V, Kastelan D, Barać L, Janićijević B, Martinović I, Perićić M, Bennett LA, Rudan P, Kastelan A. HLA class II gene and haplotype diversity in the population of the island of Hvar, Croatia. *Coll Antropol* 1998; 22(1):157-68.
- [48] Martinovic I, Bakran M, Chaventré A, Janicijevic B, Jovanovic V, Smolej-Narancic N, Kastelan A, Grubic Z, Zunec R, Roberts DF, Rudan P. Application of HLA class II polymorphism analysis to the study of the population structure of the Island of Krk, Croatia. *Hum Biol* 1997;69(6):819-29.
- [49] Grubic Z, Zunec R, Kastelan A. Polymorphism of DR52-associated haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 1999;26(6):385-7.
- [50] Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics* 2014;41:211–221.
- [51] Grubic Z, Maskalan M, Svilicic D, Stingl Jankovic K, Zunec R. Determination of HLA-A, -B, and -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies in the Croatian Population Based on a Family Study. *Arch Immunol Ther Exp* 10.1007/s00005-016-0445-3.

- [52] Stingl Jankovic K, Grubic Z, Jakupic J, Burek Kamenaric M, Maskalan M, Zunec R. The distribution of HLA-DRB3 alleles among HLA-DRB1\*03:01-positive haplotypes. *HLA*. 2018;92(3):160-163.
- [53] Grubic Z, Maskalan M, Radmanic L, Stingl Jankovic K, Burek Kamenaric M, Zunec R. The distribution of the DRB4\*01:03:01:02N null allele in HLA-DRB1~DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA* 2018;91(1):23-28.
- [54] Stingl Jankovic K, Spoljaric N, Maskalan M, Burek Kamenaric M, Zunec R, Grubic Z. The study of HLA-B\*44~C haplotype polymorphism in the Croatian population. *Molecular and Experimental Biology in Medicine* 2017;1:42-46.
- [55] Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. *Ann Intern Med* 1939;13:357-67.
- [56] Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-16.
- [57] Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull* 2006;77(78):23-36.
- [58] Ringdén O, le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS* 2005;113:813-30.
- [59] Kuba A, Raida L. Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. *Mediators Inflamm* 2018;2018:9451950.
- [60] Schlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev* 2007;7:340-52.
- [61] Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80.
- [62] Roncarolo M, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007;7:585-98.
- [63] Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev* 2003;73:108-22.
- [64] Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002;23:438-44.
- [65] Shaw BE, Logan BR, Spellman SR, Marsh SGE, Robinson J, Pidala J, Hurley C, Barker J, Maiers M, Dehn J, Wang H, Haagenson M, Porter D, Petersdorf EW, Woolfrey A, Horowitz MM, Verneris M, Hsu KC, Fleischhauer K, Lee SJ. Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24(5):1049-56.

- [66] Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Rev* 2019;33(1):43-50.
- [67] Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood* 2014;124(3):334-43.
- [68] Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, Kuball J, Lankester A, Montoto S, de Latour RP, Snowden JA, Styczynski J, Yakoub-Agha I, Arat M, Mohty M, Kröger N, for the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. *Bone Marrow Transplant* 2019;54:1575–1585.
- [69] Kollman C, Spellman SR, Zhang MJ, Hassebroek A, Anasetti C, Antin JH, Champlin RE, Confer DL, DiPersio JF, Fernandez-Viña M, Hartzman RJ, Horowitz MM, Hurley CK, Karanes C, Maiers M, Mueller CR, Perales MA, Setterholm M, Woolfrey AE, Yu N, Eapen M. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor transplantation for hematologic malignancy. *Blood* 2016;127(2):260-7.
- [70] Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol* 2019;9:1217.
- [71] Greiner J, Götz M, Bunjes D, Hofmann S, Wais V. Immunological and Clinical Impact of Manipulated and Unmanipulated DLI after Allogeneic Stem Cell Transplantation of AML Patients. *J Clin Med* 2019;9(1).
- [72] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110:4576-4583.
- [73] Olson JA, Gibbens Y, Tram K, Kempenich J, Novakovich J, Buck K, Dehn J. Identification of a 10/10 matched donor for patients with an uncommon haplotype is unlikely. *HLA* 2017;89(2):77-81.
- [74] Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:885-892.
- [75] Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation:

- HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104:1923-1930.
- [76] Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica* 2016;101(6):680-7.
- [77] Evseeva I, Foeken L, Madrigal A. The Role of Unrelated Donor Registries in HSCT. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *Source The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 3.
- [78] Soper DS (2014) A-priori Sample Size Calculator for Student t-Tests [Software]. <http://www.danielsoper.com/statcalc>.
- [79] European Federation for Immunogenetics. Standards for histocompatibility & immunogenetics testing. Version 8.0.
- [80] Dalva K, Beksac M. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex™ technology. *Methods Mol Med* 2007;134:61–69.
- [81] Olerup O, Zettequist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- [82] Gourraud PA, Barnetche T, Vidan-Jeras B, Cambon-Thomsen A. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transpl Immunol* 2005;4:245-53.
- [83] Gutierrez JP, Royo LJ, Alvarez I, Goyache F. MolKin v2.0: A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information. *Journal of Heredity* 2005;96(6):718–721.
- [84] Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Single RM, Thomson G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput* 2003:514-25.
- [85] Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. U: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, ur. *HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Vol 1*. Oxford: Oxford University Press; 1992, p 76-9.
- [86] HaploStats - a web application provided by the National Marrow Donor Program (NMDP) Bioinformatics group (<http://www.haplostats.org>)
- [87] Nicoloso G, Kürsteiner O, Bussmann F, Marbacher M, Tiercy JM. A study of selected hematopoietic stem cell donors provided by an intermediate size registry. *Eur J Haematol* 2019;103(4):426-432.

- [88] Kwok J, Guo M, Yang W, Ip P, Chan GCF, Ho J, Lee CK, Middleton D, Lu L. Estimation of optimal donor number in Bone Marrow Donor Registry: Hong Kong's experience. *Hum Immunol* 2017;78(10):610-613.
- [89] Nestorowicz K, Bogacz A, Bukowska A, Chraplak M, Czerwiński J, Góralski M, Gronkowski M, Jopek K, Knizewski L, Kolasiński M, Kowalski ML, Nowak J, Sowiński M, Wróblewska-Kabba S, Tymoniuk B, Dudkiewicz M. High-resolution allele frequencies for NGS based HLA-A, B, C, DQB1 and DRB1 typing of 23 595 bone marrow donors recruited for the polish central potential unrelated bone marrow donor registry. *Hum Immunol* 2020;81(2-3):49-51.
- [90] Eberhard HP, Schmidt AH, Mytilineos J, Fleischhauer K, Müller CR. Common and well-documented HLA alleles of German stem cell donors by haplotype frequency estimation. *HLA* 2018;92:206–214.
- [91] Schmidt AH, Sauter J, Baier DM, Daiss J, Keller A, Klussmeier A, Mengling T, Rall G, Riethmüller T, Schöfl G, Solloch UV, Torosian T, Means D, Kelly H, Jagannathan L, Paul P, Giani AS, Hildebrand S, Schumacher S, Markert J, Füssel M, Hofmann JA, Schäfer T, Pingel J, Lange V, Schetelig J. Immunogenetics in stem cell donor registry work: The DKMS example (Part 1). *Int J Immunogenet* 2020;47(1):13-23.
- [92] Mytilineos J, Christ U, Lempert M, Opelz G. Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* 1997;50:395-400.
- [93] Dorak MT, Shao W, Machulla HK, Lobashevsky ES, Tang J, Park MH et al. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. *Genes Immun* 2006;7:450-467.
- [94] Zemmour J, Gumperz J, Hildebrand WH, Marsh S, Ward FE, Williams R, Parham P. HLA-Cw11 is a combination of Cw1 and a public epitope of HLA-Cw3 and HLA-B46 molecules. 1992.
- [95] Dubois V, Giannoli C, Balère ML, Rey S, Raffoux C, Rigal D. Does high resolution donor typing of HLA-C or other loci upon registration confer advantages to patients? *Hum Immunol* 2011;72:1033–8.
- [96] Eberhard HP, Muller CR. The impact of HLA-C matching on donor identification rates in a European-Caucasian population. *Front Immunol* 2014;5:1-6.
- [97] Fernandez-Viña MA, Wang T, Lee SJ, Haagenson M, Aljurf M, Askar M, Battiwalla M, Baxter-Lowe LA, Gajewski J, Jakubowski AA, Marino S, Oudshoorn M, Marsh SG, Petersdorf EW, Schultz K, Turner EV, Waller EK, Woolfrey A, Umejiego J, Spellman

- SR, Setterholm M Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014;123(8):1270–8.
- [98] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Mickelson EM, McKinney SK, Smith AG, et al. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 1997;89:1818–23.
- [99] Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(8):965–74.
- [100] Alter I, Gragert L, Fingerson S, Maiers M, Louzoun Y. HLA class I haplotype diversity is consistent with selection for frequent existing haplotypes. *PLoS Comput Biol* 2017; 13(8):e1005693.
- [101] Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Middleton D, Sauter J, Buhler S, McCabe A, Hofmann J, Baier DM, Schmidt AH, Nicoloso G, Andreani M, Grubic Z, Tiercy JM, Fleischhauer K. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA* 2017;89(2):104–113.
- [102] Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, Buhler S, Buus S, Claas FH, Dormoy A, Dubois V, Eglite E, Eliaou JF, Gonzalez-Galarza F, Grubic Z, Ivanova M, Lie B, Ligeiro D, Lokki ML, da Silva BM, Martorell J, Mendonça D, Middleton D, Voniatis DP, Papasteriades C, Poli F, Riccio ME, Vlachou MS, Sulcebe G, Tonks S, Nevessignsky MT, Vangenot C, van Walraven AM, Tiercy JM. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *International Journal of Immunogenetics* 2012;39:459.
- [103] Cano P, Klitz W, Mack SJ, Maiers M, Marsh SG, Noreen H, Reed EF, Senitzer D, Setterholm M, Smith A, Fernández-Viña M. Common and well-documented HLA alleles: report of the ad-hoc committee of the american society for histocompatibility and immunogenetics. *Hum Immunol* 2007;68:392–417.
- [104] Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, He J, Hurley CK, Middleton D, Moraes ME, Pereira SE, Kempenich JH, Reed EF, Setterholm M, Smith AG, Tilanus MG, Torres M, Varney MD, Voorter CE, Fischer GF, Fleischhauer K, Goodridge D, Klitz W, Little AM, Maiers M, Marsh SG, Müller CR, Noreen H, Rozemuller EH, Sanchez-Mazas A,

- Senitzer D, Trachtenberg E, Fernandez-Vina M. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens* 2013;81:194–203.
- [105] Maskalan M, Grubic Z, Jankovic KS, Cepulic BG, Zunec R. Identification of the novel HLA-A\*01:200 allele by sequence-based typing in a Croatian individual. *HLA* 2016;87(5):381-2.
- [106] Burek Kamenaric M, Maskalan M, Drabbels J, Golubic Cepulic B, Grubic Z. Identification of the novel HLA-B\*18:37:02 allele in a Croatian individual. *HLA* 2018;91(4):299-300.
- [107] Sanchez-Mazas A, Buhler S, Nunes JM. A New HLA Map of Europe: Regional Genetic Variation and Its Implication for Peopling History, Disease-Association Studies and Tissue Transplantation. *Hum Hered* 2013;76:162-177.
- [108] Schmidt AH, Solloch UV, Baier D, Stahr A, Wassmuth R, Ehniger G, Rutt C. Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens* 2010;76:362-79.
- [109] Testi M, Andreani M, Locatelli F, Arcese W, Troiano M, Battarra M, Gaziev J, Lucarelli G. Influence of the HLA characteristics of Italian patients on donor search outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2014;84:198–205.
- [110] Sacchi N, Castagnetta M, Miotti V, Garbarino L, Gallina A. High-resolution analysis of the HLA-A, -B, -C and -DRB1 alleles and national and regional haplotype frequencies based on 120 926 volunteers from the Italian Bone Marrow Donor Registry. *HLA* 2019;94(3):285-295.
- [111] Ivanova M, Rozemuller E, Tyufekchiev N, Michailova A, Tilanus M, Naumova E. HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations. *Tissue Antigens* 2002;60:496.
- [112] Andric Z, Simonovic R, Dukic T. HLA alleles in Serbian population. In: Abstracts for the 21st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Barcelona, Spain, May 5–8, 2007. *Tissue Antigens* 2007;69:425.
- [113] Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 2009;54(1):15-39.
- [114] Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, Hartzman R, Rizzo JD, Horowitz M, Confer D, Maiers M. HLA Match Likelihoods for



- Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N Engl J Med* 2014;371(4):339-48.
- [115] Tiercy JM. Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Matching Probability and Search Algorithm. *Bone Marrow Res* 2012;695018.
- [116] Li XF, Zhang X, Chen Y, Zhang KL, Liu XJ, Li JP. An Analysis of HLA-A, -B, and -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies of 21,918 Residents Living in Liaoning, China. *PLoS One* 2014;9(4):e93082.
- [117] Bettens F, Nicoloso de Faveri G, Tiercy JM. HLA-B51 and haplotypic diversity of B-Cw associations: implications for matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2009;73:316-25
- [118] Vidan-Jeras B, Buhler S, Dubois V, Grubic Z, Ivanova M, Jaatinen T, Ligeiro D, Lokki ML, Papasteriades C, Poli F, Spyropoulou-Vlachou M, Tordai A, Viken MK, Wenda S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM. Resolution of HLA-B\*44:02:01G,-DRB1\*14:01:01G and -DQB1\*03:01:01G reveals a high allelic variability among 12 European populations. *Tissue Antigens* 2014;84:459-64.
- [119] Riccio ME, Buhler S, Nunes JM et al. 16(th) IHIW: analysis of HLA population data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). *Int J Immunogenet* 2013;40:21–30.
- [120] van Deutekom HW, Keşmir C. Zooming into the binding groove of HLA molecules: which positions and which substitutions change peptide binding most? *Immunogenetics* 2015;67:425-36.
- [121] Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: How can they be used to improve unrelated donor searches? *Human Immunology* 2013;74:330–40.
- [122] Buhler S, Baldomero H, Ferrari-Lacraz S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Massouridi-Levrat S, Heim D, Halter J, Nair G, Chalandon Y, Schanz U, Güngör T, Nicoloso G, Tiercy JM, Passweg J, Villard J. High-resolution HLA phased haplotype frequencies to predict the success of unrelated donor searches and clinical outcome following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2019;54:1701-9.
- [123] Creary LE, Gangavarapu S, Mallempati KC, Montero-Martín G, Caillier SJ, Santaniello A, Hollenbach JA, Oksenberg JR, Fernández-Viña MA. Next-generation

- sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population. *Hum Immunol* 2019;80:807-822.
- [124] Osoegawa K, Mallempati KC, Gangavarapu S, Oki A, Gendzekhadze K, Marino SR, Brown NK, Bettinotti MP, Weimer ET, Montero-Martín G, Creary LE, Vayntrub TA, Chang CJ, Askar M, Mack SJ, Fernández-Viña MA. HLA alleles and haplotypes observed in 263 US families. *Hum Immunol* 2019;80(9):644-60.
- [125] Petersdorf EW. Optimal HLA Matching in Haematopoietic Cell Transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20(5):588-93.
- [126] Joris MM, Lankester AC, von dem Borne PA, Kuball J, Bierings M, Cornelissen JJ, Groenendijk-Sijnke ME, van der Holt B, Haasnoot GW, van der Zanden HGM, van Walraven SM, van Rood JJ, Claas FHJ, Oudshoorn M. The impact of frequent HLA haplotypes in high linkage disequilibrium on donor search and clinical outcome after unrelated haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:483-90.
- [127] Zhang H. Impact of donor and recipient characteristics on graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2020;28:102743.
- [128] Ayuk F, Beelen DW, Bornhäuser M, Stelljes M, Zabelina T, Finke J, Kobbe G, Wolff D, Wagner EM, Christopeit M, Schmid C, Ottinger H, Groth C, Faul C, Bertz H, Rachlis E, Wolschke C, Schetelig J, Horn PA, Mytilineos J, Guellstorf M, Kelsch R, Fleischhauer K, Kröger N, Bethge W. Relative Impact of HLA Matching and Non-HLA Donor Characteristics on Outcomes of Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24(12):2558-2567.
- [129] Dickinson AM, Norden J. Non-HLA genomics: does it have a role in predicting haematopoietic stem cell transplantation outcome? *Int J Immunogenet* 2015;42(4):229-38.
- [130] Wadsworth K, Albrecht M, Fonstad R, Spellman S, Maiers M, Dehn J. Unrelated donor search prognostic score to support early HLA consultation and clinical decisions. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:1476-81.
- [131] Gourraud PA, Balère ML, Faucher C, Loiseau P, Dormoy A, Marry E, Garnier F. HLA phenotypes of candidates for HSCT: comparing transplanted versus non-transplanted candidates, resulting in the predictive estimation of the probability to find a 10/10 HLA matched donor. *Tissue Antigens* 2014;83:17-26.

- [132] Foeken LM, Green A, Hurley CK, Marry E, Wiegand T, Oudshoorn M, on behalf of the Donor Registries Working Group of the World Marrow Donor Association (WMDA). Monitoring the international use of unrelated donors for transplantation: the WMDA annual reports. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:811-18.
- [133] Dehn J, Buck K, Maiers M, Confer D, Hartzman R, Kollman C, Schmidt AH, Yang SY, Setterholm M. 8/8 and 10/10 High-Resolution Match Rate for the Be The Match Unrelated Donor Registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:137-41.
- [134] Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, Gratwohl M, Bouzas LF, Confer D, Frauendorfer K, Gluckman E, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Madrigal A, Mohty M, Noel L, Novitzky N, Nunez J, Oudshoorn M, Passweg J, van Rood J, Szer J, Blume K, Appelbaum FR, Kodera Y, Niederwieser D; Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol* 2015;2(3):e91-100.
- [135] Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y, Bouzas LF, Confer D, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Mohty M, Novitzky N, Nunez J, Passweg J, Pasquini MC, Kodera Y, Apperley J, Seber A, Gratwohl A. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(6):778-85.
- [136] Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 2013;98:300-8.
- [137] Bettens F, Buhler S, Tiercy JM. Allorecognition of HLA-C Mismatches by CD8+ T Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation is a Complex Interplay between Mismatched Peptide-Binding Region Residues, HLA-C Expression, and HLA-DPB1 Disparities. *Front Immunol* 2016;7:584.
- [138] Kanda J, Ichinohe T, Fuji S, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iwato K, Eto T, Nakamae H, Kobayashi N, Mori T, Mori S, Morishima Y, Atsuta Y, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of HLA mismatch direction on the outcome of unrelated bone marrow transplantation: a retrospective analysis from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(2):305-11.
- [139] Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K,

Mytilineos J. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood* 2013;122(18):3220-9.

[140] Fernandez-Viña MA, Wang T, Lee SJ, Haagenson M, Aljurf M, Askar M, Battiwalla M, Baxter-Lowe LA, Gajewski J, Jakubowski AA, Marino S, Oudshoorn M, Marsh SG, Petersdorf EW, Schultz K, Turner EV, Waller EK, Woolfrey A, Umejiego J, Spellman SR, Setterholm M. Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014;123(8):1270-8.

[141] Fürst D, Neuchel C, Tsamadou C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. HLA Matching in Unrelated Stem Cell Transplantation up to Date. *Transfus Med Hemother* 2019;46:326-36.

[142] Chalandon Y, Tiercy JM, Schanz U, Gungor T, Seger R, Halter J, et al. Impact of high-resolution matching in allogeneic unrelated donor stem cell transplantation in Switzerland. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(10):909-16.

## **8. ŽIVOTOPIS**

## ŽIVOTOPIS AUTORICE

Marija Maskalan (r. Čalušić) rođena je 14. svibnja 1987. godine u Bjelovaru. Završila je Opću gimnaziju u Bjelovaru, a diplomirala je 2011. na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu s diplomskim radom pod nazivom „Polimorfizam gena za serotoninški receptor 1A (5HT-1A) u osoba oboljelih od epilepsije temporalnog režnja“ izrađenim na Institutu Ruđer Bošković. Od 2013. pohađa poslijediplomski doktorski studij Biologije pri Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Od 2011. djelatnica je Odjela za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju u KBC Zagreb. U 2015., u sklopu stipendije Europske federacije za imunogenetiku bila je na međunarodnom usavršavanju na Institutu za imunologiju Sveučilišta u Heidelbergu u Njemačkoj, a 2016. dobila je stipendiju British Scholarship Trusta u sklopu koje je bila na Institutu „NHS Blood and Transplant“ u Newcastleu u Velikoj Britaniji. Objavila je kao autorica ili koautorica 16 znanstvenih radova indeksiranih u CC časopisima. Aktivno je sudjelovala na 15 znanstvenih skupova te na njima održala 4 pozvana predavanja i prikazala više od 20 kongresnih priopćenja. Sudjeluje od 2015. u provedbi dodiplomske nastave na Biološkom odsjeku PMF-u kao naslovna asistentica kolegija “Transplantacijska imunologija”. Članica je 6 stručnih međunarodnih i domaćih društava.

### Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

1. **Calusic M**, Grubic Z, Stingl K, Burek Kamenaric M, Zunec R. Diversity of HLA-B\*35 alleles and haplotypes among Croatians. *Immunological Investigations*, 2012; 41(8): 856-863.
2. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, **Maskalan M**, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, 2014; 41:211-221.
3. Grubic Z, Stingl Jankovic K, **Maskalan M**, Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Burek Kamenaric M, Nemet D, Zunec R. HLA allele and haplotype polymorphisms among Croatian patients in an unrelated hematopoietic stem cell donor search program. *Transplant Immunology*, 2014; 31: 119-124.
4. Grubic Z, Burek Kamenaric M, **Maskalan M**, Stingl Jankovic K, Zunec R. Nonfrequent but well-documented, rare and very rare HLA alleles observed in the Croatian population. *Tissue Antigens*, 2014; 84: 560-564.

5. **Maskalan M**, Grubic Z, Stingl Jankovic K, Golubic Cepulic B, Zunec R. Identification of the novel HLA-A\*01:200 allele by sequence-based typing in a Croatian individual. *HLA (Immune Response Genetics)*. 2016; 87: 381-381.
6. Grubic Z, **Maskalan M**, Stingl Jankovic K, Zvecic S, Dumic Kubat K, Krnic N, Zunec R, Ille J, Kusec V, Dumic M. Association of HLA alleles and haplotypes with CYP21A2 gene p.V282L mutation in the Croatian population. *HLA (Immune Response Genetics)*, 2016; 88: 239-244.
7. Grubic Z, Stingl Jankovic K, **Maskalan M**, Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Nemet D, Burek Kamenaric M, Labar B, Zunec R. The effect of HLA allele and haplotype polymorphisms on donor matching in hematopoietic stem cell transplantation – Croatian experience. *Human Immunology*. 2016; 77(12):1120-1127.
8. Burek Kamenaric M, Stingl Jankovic K, Grubic Z, Serventi Seiwerth R, **Maskalan M**, Nemet D, Mikulic M, Zunec R. The impact of KIR2DS4 gene on clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Human Immunology*, 2017; 78(2):95-102.
9. Grubic Z, **Maskalan M**, Svilicic D, Stingl Jankovic K, Zunec R. Determination of HLA-A, -B, and -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies in the Croatian Population Based on a Family Study. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; doi: 10.1007/s00005-016-0445-3. [Epub ahead of print].
10. Burek Kamenaric M, **Maskalan M**, Grubic Z, Mikulic M, Serventi Seiwerth R, Durakovic N, Vrhovac R, Stingl Jankovic K, Zunec R. HLA-DPB1 matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation program contributes to a higher incidence of disease relapse. *Human Immunology*. 2017; 78: 665–671.
11. Grubic Z, Rojnic Putarek N, **Maskalan M**, Zunec R, Stingl Jankovic K, Burek Kamenaric M, Knezevic-Cuca J, Spehar Uroic A, Dumic M. Human Leukocyte Antigen class II polymorphisms among Croatian patients with type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant. *Gene*. 2018; 674: 93–97.
12. Burek Kamenaric M, **Maskalan M**, Drabbels J, Golubic Cepulic B, Grubic Z. Identification of the novel HLA-B\*18:37:02 allele in a Croatian individual. *HLA*. 2018; 91: 299–300.
13. Grubic Z, **Maskalan M**, Radmanic L, Stingl Jankovic K, Burek Kamenaric M, Zunec R. The distribution of the DRB4\*01:03:01:02N null allele in HLA-DRB1~DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA*. 2018; 91: 23–28.
14. Stingl Jankovic K, **Maskalan M**, Burek Kamenaric M, Zunec R, Durakovic N, Serventi-Seiwerth R, Vrhovac R, Grubic Z. Quantitative PCR Technology in Chimerism Monitoring After Hsct - One Centre Experience. *HLA*. 2019; 94.

15. **Maskalan M**, Grubic Z, Serventi Seiwert R, Vrhovac R, Mikulic M, Burek Kamenaric M, Stingl Jankovic K, Durakovic N, Zunec R. The MHC gamma block matching: Impact on unrelated hematopoietic stem cell transplantation outcome. *Human Immunology*. 2019; S0198-8859(19)31086-9.
16. Burek Kamenaric M, **Maskalan M**, Grubic Z, Stingl Jankovic K, Zunec R. Detection of Novel and Confirmation of Very Rare and Rare HLA Alleles by Next Generation Sequencing in Croatia. *HLA*. 2020; doi: 10.1111/tan.13905.



## **9. PRILOZI**

Prilog S1. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)
11:01~07:02	0,463	02:01~49:01	0,294	24:02~40:02	0,208
02:05~50:01	0,459	26:01~27:05	0,290	31:01~35:03	0,208
24:02~38:01	0,454	31:01~51:01	0,290	11:01~39:01	0,201
01:01~52:01	0,445	01:01~35:01	0,287	33:01~58:01	0,200
01:01~18:01	0,438	24:02~08:01	0,287	32:01~39:01	0,196
02:01~44:03	0,425	26:01~55:01	0,281	32:01~38:01	0,195
03:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,423	02:01~41:02	0,280	03:02~35:03	0,194
01:01~49:01	0,418	32:01~18:01	0,269	24:02~56:01	0,194
68:01~18:01	0,417	11:01~27:05	0,267	68:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,193
01:01~51:01	0,393	02:01~56:01	0,267	38:01~08:01	0,191
01:01~35:02	0,377	03:01~14:02	0,267	11:01~40:02	0,191
01:01~07:02	0,376	03:01~38:01	0,259	66:01~41:02	0,190
32:01~15:01	0,375	23:01~49:01	0,257	24:02~39:01	0,186
03:01~15:01	0,371	32:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,252	32:01~35:03	0,185
68:01~39:01	0,368	01:01~35:03	0,247	68:01~38:01	0,184
11:01~55:01	0,360	03:01~27:02	0,243	01:01~38:01	0,182
24:02~55:01	0,359	68:02~53:01	0,240	11:01~56:01	0,179
03:01~27:05	0,335	11:01~38:01	0,238	25:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,175
24:02~44:05	0,327	30:04~14:01	0,230	32:01~08:01	0,174
11:01~35:03	0,326	03:01~39:01	0,229	11:01~40:01	0,174
01:01~27:05	0,321	02:01~58:01	0,227	68:01~27:02	0,172
29:02~44:03	0,313	23:01~50:01	0,225	26:01~39:01	0,170
26:01~07:02	0,311	24:02~35:08	0,224	24:02~44:03	0,170
01:01~13:02	0,310	02:01~50:01	0,211	31:01~07:02	0,169
01:01~58:01	0,306	02:01~52:01	0,208	02:01~35:08	0,169

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S1 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)
02:01~39:06	0,163	02:01~14:02	0,122	02:05~49:01	0,097
03:01~40:02	0,163	01:01~44:03	0,121	03:02~51:01	0,097
32:01~27:05	0,162	02:01~35:02	0,121	32:01~41:01	0,097
31:01~39:01	0,161	02:01~41:01	0,120	25:01~51:01	0,097
68:01~40:01	0,160	31:01~27:05	0,117	32:01~07:02	0,096
68:01~35:01	0,160	26:01~56:01	0,116	31:01~35:01	0,094
26:01~18:01	0,157	33:03~58:01	0,115	01:01~56:01	0,094
31:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,157	03:01~44:03	0,114	01:01~15:01	0,093
01:01~27:02	0,154	11:01~49:01	0,112	31:01~15:01	0,092
26:01~35:03	0,154	25:01~57:01	0,111	01:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,091
26:01~57:01	0,153	25:01~08:01	0,110	30:02~18:01	0,091
11:01~15:01	0,147	01:01~35:08	0,109	03:01~49:01	0,091
03:01~13:02	0,144	03:01~56:01	0,109	02:01~45:01	0,090
24:02~40:01	0,144	25:01~27:05	0,107	02:01~14:01	0,089
24:02~39:06	0,141	23:01~07:02	0,107	25:01~13:02	0,088
25:01~15:01	0,141	26:01~13:02	0,107	24:03~07:02	0,087
01:01~40:02	0,140	31:01~35:08	0,104	26:01~27:02	0,087
03:01~40:01	0,139	24:02~27:02	0,102	11:01~13:02	0,086
68:01~07:02	0,139	68:01~15:01	0,101	25:01~40:02	0,086
24:02~50:01	0,138	24:02~57:01	0,101	68:01~08:01	0,085
26:01~49:01	0,134	31:01~15:17	0,101	03:01~55:01	0,084
31:01~40:01	0,131	02:01~37:01	0,101	25:01~07:02	0,084
02:01~39:04	0,127	68:02~14:02	0,100	03:01~35:08	0,082
24:02~49:01	0,127	03:01~44:05	0,099	31:01~18:01	0,082
01:01~15:17	0,127	11:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,098	03:01~52:01	0,081

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S1 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)
26:01~35:01	0,081	01:01~39:01	0,056	03:01~35:02	0,044
03:01~37:01	0,080	26:01~48:01	0,055	02:05~58:01	0,044
25:01~55:01	0,078	29:01~50:01	0,055	01:01~40:06	0,043
02:01~07:05	0,078	26:01~15:01	0,055	24:02~41:01	0,042
24:02~48:01	0,078	32:01~44:03	0,055	30:01~57:01	0,042
02:01~55:01	0,076	33:01~44:03	0,054	01:01~50:01	0,041
11:01~08:01	0,074	03:02~08:01	0,053	23:01~15:01	0,041
11:01~14:02	0,071	01:01~40:01	0,052	03:01~57:01	0,040
24:02~53:01	0,070	24:02~52:01	0,052	23:01~27:05	0,040
30:02~14:02	0,070	68:01~27:05	0,052	23:01~51:01	0,040
26:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,069	30:01~35:01	0,051	24:03~18:01	0,040
68:01~15:18	0,068	02:02~41:01	0,050	26:01~27:14	0,040
03:01~47:01	0,066	11:01~35:08	0,050	30:04~44:03	0,040
23:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,065	33:01~18:01	0,050	66:01~14:01	0,040
26:01~08:01	0,064	26:01~40:02	0,050	02:01~44:21	0,040
30:01~35:03	0,064	31:01~38:01	0,049	03:02~44:02:01G <sup>a</sup>	0,039
24:02~37:01	0,063	03:01~50:01	0,049	32:01~55:01	0,038
68:01~57:01	0,062	11:01~37:01	0,049	26:01~44:05	0,038
31:01~56:01	0,062	02:01~51:08	0,048	01:01~44:05	0,037
29:01~07:05	0,060	32:01~56:01	0,048	23:01~18:01	0,037
30:01~15:10	0,060	33:01~51:01	0,048	32:01~15:17	0,037
31:01~08:01	0,060	11:01~35:02	0,047	03:01~15:17	0,037
25:01~35:01	0,058	24:02~58:01	0,047	01:01~14:01	0,036
31:01~49:01	0,058	24:02~14:02	0,046	02:01~15:08	0,036
24:03~51:01	0,057	26:01~58:01	0,046	03:01~15:03	0,036

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S1 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)	HLA-A*~B*	f (%)
01:01~41:01	0,035	26:01~35:08	0,027	29:02~15:01	0,021
11:01~44:03	0,035	33:01~39:01	0,027	30:01~44:02:01G <sup>a</sup>	0,021
01:01~39:06	0,034	30:02~08:01	0,026	31:01~40:02	0,021
32:01~14:02	0,034	32:01~41:02	0,026	33:01~13:02	0,021
24:03~27:02	0,034	32:01~49:01	0,026	01:01~41:02	0,021
11:01~44:05	0,033	68:01~58:01	0,026	02:01~15:17	0,021
23:01~57:02	0,033	25:01~14:02	0,026	02:06~18:01	0,021
01:01~55:01	0,032	29:02~57:01	0,026	03:01~58:01	0,021
31:01~14:02	0,032	25:01~40:01	0,025	25:01~52:01	0,021
29:02~58:01	0,032	68:01~40:02	0,025	32:01~35:02	0,021
32:01~37:01	0,032	80:01~45:01	0,025	32:01~51:08	0,021
32:01~40:01	0,031	80:01~58:01	0,025	01:02~49:01	0,020
11:01~18:03	0,030	02:02~49:01	0,025	02:05~15:17	0,020
25:01~39:01	0,030	32:01~57:03	0,025	23:01~44:05	0,020
68:01~49:01	0,030	23:01~08:01	0,024	26:08~35:01	0,020
23:01~40:02	0,030	32:01~52:01	0,024	33:01~50:01	0,020
24:02~15:17	0,029	03:01~41:02	0,023	66:01~57:01	0,020
29:01~35:02	0,029	03:02~18:01	0,023	02:05~39:01	0,020
01:01~14:02	0,029	23:01~39:01	0,023	33:01~35:08	0,020
68:01~44:03	0,029	26:01~35:02	0,023	02:01~39:31	0,019
02:01~73:01	0,029	24:03~38:01	0,022	33:01~14:01	0,019
26:01~41:01	0,029	66:01~07:02	0,022	66:01~58:01	0,019
32:01~57:01	0,028	68:01~35:08	0,022	68:01~45:01	0,019
11:01~57:01	0,027	68:01~35:02	0,022	03:01~07:04	0,018
25:01~49:01	0,027	11:01~50:01	0,021	02:01~39:03	0,018

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S2. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)
51:01~05:01	0,231	57:01~07:01	0,083	44:02:01G~01:02 <sup>a</sup>	0,042
35:02~06:02	0,219	07:02~02:02	0,081	35:08~12:03	0,042
39:06~07:02	0,185	44:02:01G~06:02 <sup>a</sup>	0,080	44:05~07:04	0,040
51:01~03:03	0,166	49:01~04:01	0,080	44:03~07:01	0,040
51:01~04:01	0,163	51:01~07:02	0,079	07:04~07:02	0,040
35:01~03:03	0,157	44:02:01G~02:02 <sup>a</sup>	0,075	45:01~16:01	0,040
39:01~07:02	0,156	51:01~06:02	0,069	27:14~01:02	0,040
39:06~12:03	0,155	15:01~02:02	0,068	73:01~15:02	0,040
18:01~02:02	0,136	40:06~15:02	0,065	18:01~07:02	0,039
47:01~06:02	0,136	15:10~03:04	0,065	39:01~15:02	0,039
39:04~12:03	0,135	13:02~05:01	0,062	44:21~15:02	0,036
15:18~07:04	0,125	55:01~03:04	0,062	39:06~07:01	0,036
45:01~06:02	0,125	48:01~08:01	0,060	27:02~15:02	0,036
51:01~07:01	0,117	07:05~04:01	0,060	15:09~07:04	0,035
44:03~16:02	0,114	51:01~07:04	0,055	41:02~04:01	0,035
55:01~01:02	0,105	39:01~07:01	0,053	18:03~07:01	0,035
15:01~01:02	0,101	18:01~06:02	0,051	57:03~07:01	0,035
48:01~08:03	0,100	27:05~03:04	0,046	40:02~01:02	0,034
27:02~05:01	0,096	15:08~01:02	0,045	27:05~04:01	0,033
44:05~05:01	0,095	53:01~06:02	0,045	40:02~15:02	0,032
07:05~15:02	0,095	44:02:01G~03:03 <sup>a</sup>	0,045	18:01~04:01	0,031
35:01~02:02	0,095	57:02~18:02	0,045	07:02~05:01	0,031
40:02~03:04	0,086	51:01~15:04	0,045	39:03~07:01	0,030
51:08~16:02	0,085	51:01~15:06	0,045	51:01~16:01	0,030
41:01~07:01	0,085	35:08~15:02	0,045	15:03~02:02	0,030

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S2 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)
15:24~03:03	0,030	27:05~05:01	0,018	35:01~06:02	0,011
35:08~05:01	0,030	15:01~05:01	0,018	38:01~08:02	0,011
40:02~04:01	0,030	35:03~15:02	0,018	08:01~06:02	0,011
13:02~01:02	0,030	35:01~07:01	0,018	35:01~12:03	0,011
27:05~03:03	0,029	35:03~14:02	0,018	40:02~03:03	0,011
35:03~06:02	0,029	44:02:01G~04:01 <sup>a</sup>	0,017	27:02~01:02	0,011
15:01~07:04	0,029	44:02:01G~03:04 <sup>a</sup>	0,017	41:02~02:02	0,010
38:01~06:02	0,027	44:02:01G~12:03 <sup>a</sup>	0,017	58:01~03:04	0,010
27:05~12:03	0,026	35:08~06:02	0,015	44:05~16:04	0,010
57:03~06:02	0,025	18:05~12:03	0,015	37:09~06:02	0,010
51:07~14:02	0,025	27:09~01:02	0,015	41:01~12:02	0,010
14:01~07:01	0,025	35:04~04:01	0,015	15:23~07:04	0,010
07:05~15:05	0,025	27:30~02:02	0,015	15:07~07:02	0,010
15:01~07:02	0,025	07:02~03:03	0,015	49:01~07:02	0,010
54:01~01:02	0,025	58:01~15:02	0,015	35:01~03:04	0,010
35:08~15:06	0,025	51:05~04:01	0,015	57:01~04:01	0,010
39:31~12:03	0,024	35:01~01:02	0,015	18:01~08:02	0,010
07:10~07:02	0,020	08:01~07:07	0,015	18:01~07:04	0,010
40:03~02:02	0,020	07:02~07:01	0,015	07:05~07:02	0,010
39:05~12:03	0,020	15:17~01:02	0,015	08:01~12:02	0,010
39:10~12:03	0,020	52:01~07:02	0,015	44:03~05:01	0,010
07:02~01:02	0,020	35:03~05:01	0,014	14:01~15:02	0,010
15:03~12:03	0,020	51:07~16:02	0,014	15:01~12:02	0,010
39:24~07:01	0,020	35:08~07:04	0,012	44:02:01G~05:08 <sup>a</sup>	0,010
40:01~07:02	0,020	08:01~02:02	0,012	35:08~15:04	0,010

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S2 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)
41:01~16:02	0,010	44:05~01:02	0,006	08:01~01:02	0,005
51:01~15:09	0,010	51:01~03:04	0,006	35:02~03:04	0,005
55:01~07:01	0,010	38:01~04:01	0,006	44:05~12:03	0,005
37:01~01:02	0,010	50:01~07:01	0,006	45:01~04:01	0,005
35:01~15:02	0,010	07:02~04:01	0,006	52:01~02:02	0,005
73:01~15:05	0,010	35:03~07:01	0,006	14:02~02:02	0,005
15:03~02:05	0,010	55:01~04:01	0,005	14:02~07:01	0,005
15:39~04:01	0,010	38:01~07:01	0,005	52:01~07:01	0,005
53:05~04:01	0,010	39:01~06:02	0,005	15:17~05:01	0,005
40:02~06:02	0,010	40:02~07:02	0,005	38:01~12:02	0,005
51:07~07:02	0,010	44:03~06:02	0,005	15:17~15:02	0,005
50:01~01:02	0,009	49:01~01:02	0,005	50:01~06:32	0,005
52:01~12:03	0,009	27:02~12:03	0,005	39:15~14:02	0,005
35:02~16:02	0,008	18:01~14:02	0,005	44:03~08:02	0,005
49:01~06:02	0,008	35:03~12:02	0,005	15:17~03:04	0,005
57:01~12:03	0,007	35:03~07:02	0,005	14:02~01:02	0,005
40:01~03:02	0,007	38:01~07:04	0,005	15:01~03:13	0,005
51:07~01:02	0,007	38:01~07:02	0,005	18:37~12:03	0,005
38:01~05:01	0,007	57:01~14:02	0,005	57:03~17:03	0,005
07:02~15:02	0,007	35:02~12:03	0,005	44:04~16:01	0,005
15:01~06:02	0,007	40:02~12:03	0,005	53:01~07:04	0,005
15:01~03:02	0,007	13:02~07:01	0,005	51:09~01:02	0,005
57:01~01:02	0,007	44:03~03:03	0,005	14:01~14:02	0,005
27:07~15:02	0,006	13:02~12:03	0,005	14:01~12:02	0,005
07:02~14:02	0,006	40:06~02:02	0,005	51:03~14:02	0,005

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)



Prilog S2 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)	HLA-B*~C*	f (%)
15:18~03:04	0,005	44:05~15:02	0,005	15:03~07:04	0,005
27:12~02:02	0,005	18:01~15:02	0,005	14:01~04:01	0,005
38:08~04:01	0,005	38:01~01:02	0,005	39:01~16:01	0,005
51:01~14:25	0,005	18:01~03:03	0,005	08:04~07:01	0,005
15:07~03:04	0,005	27:02~07:02	0,005	35:08~17:03	0,005
15:07~07:01	0,005	37:01~12:03	0,005	44:06~05:01	0,005
07:02:03~07:02	0,005	40:01~02:02	0,005	07:02~07:17	0,005
44:06~07:02	0,005	57:01~05:01	0,005	57:02~07:01	0,005
15:16~14:02	0,005	38:01~03:03	0,005	46:01~01:02	0,005
15:03~04:01	0,005	40:02~07:04	0,005	44:29~05:01	0,005
55:02~14:02	0,005	45:01~05:01	0,005	44:03~16:04	0,005
50:01~03:02	0,005	08:01~04:01	0,005	07:02~12:05	0,005
54:01~06:02	0,005	50:01~05:01	0,005	08:01~15:02	0,005
40:06~12:02	0,005	55:01~05:01	0,005	47:01~07:01	0,005
27:03~02:02	0,005	50:01~07:04	0,005	27:07~12:03	0,004
37:01~03:04	0,005	07:02~03:04	0,005	44:21~07:01	0,004
41:01~17:03	0,005	35:01~16:04	0,005	51:01~08:02	0,004
13:10~15:06	0,005	57:01~02:02	0,005	58:01~07:02	0,003
57:01~03:02	0,005	14:02~07:02	0,005	37:01~05:01	0,003
27:05~06:02	0,005	35:08~02:02	0,005	15:01~16:02	0,003
44:02:01G~12:02 <sup>a</sup>	0,005	58:01~06:02	0,005	35:01~05:01	0,003
49:01~12:03	0,005	39:01~12:02	0,005	52:01~03:03	0,002
40:02~07:01	0,005	40:01~12:03	0,005	55:01~03:02	0,002
18:01~01:02	0,005	40:01~05:01	0,005	39:31~05:01	0,001
44:03~14:02	0,005	35:08~15:09	0,005	73:01~02:02	0,001

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S3. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)
44:02:01G~11:01 <sup>a</sup>	0,418	07:02~16:01	0,313	35:01~08:01	0,226
44:02:01G~11:04 <sup>a</sup>	0,411	15:01~11:03	0,299	56:01~08:01	0,226
18:01~03:01	0,407	50:01~03:01	0,292	51:01~04:03	0,224
40:01~13:02	0,399	35:03~16:01	0,284	18:01~04:01	0,223
35:01~13:01	0,396	27:05~11:01	0,283	14:01~04:04	0,222
35:01~11:04	0,394	51:01~03:01	0,283	52:01~01:01	0,220
35:03~13:02	0,388	38:01~13:02	0,272	55:01~15:01	0,217
41:02~13:03	0,385	37:01~15:01	0,268	51:01~12:01	0,215
07:02~13:02	0,380	07:02~13:01	0,267	35:03~07:01	0,211
18:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,378	51:01~04:01	0,266	44:05~01:01	0,209
15:01~11:01	0,378	35:03~11:04	0,264	38:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,202
35:03~04:03	0,377	35:03~03:01	0,261	49:01~07:01	0,200
51:01~13:02	0,373	18:01~13:01	0,261	55:01~16:01	0,198
44:02:01G~15:01 <sup>a</sup>	0,370	27:05~15:01	0,260	40:01~04:04	0,198
27:05~13:01	0,358	39:01~12:01	0,255	35:08~16:01	0,197
35:03~08:01	0,355	07:02~03:01	0,255	40:02~13:01	0,196
40:02~16:02	0,352	53:01~13:02	0,252	51:01~04:07	0,192
35:03~13:01	0,348	35:03~15:01	0,250	44:02:01G~07:01 <sup>a</sup>	0,188
56:01~01:01	0,345	38:01~11:04	0,250	38:01~11:01	0,184
35:01~11:01	0,335	58:01~03:01	0,248	15:01~15:01	0,181
49:01~11:01	0,327	07:02~08:01	0,247	58:01~08:04	0,180
38:01~16:01	0,325	44:02:01G~14:01:01G <sup>a,b</sup>	0,246	35:01~07:01	0,180
07:02~07:01	0,321	44:02:01G~01:01 <sup>a</sup>	0,239	27:05~04:04	0,174
58:01~13:02	0,316	35:01~04:02	0,233	35:03~04:08	0,172
39:01~11:01	0,314	15:17~13:02	0,228	55:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,171

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S3 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)
07:02~11:04	0,171	40:01~15:01	0,137	15:01~16:01	0,105
08:01~15:01	0,168	55:01~13:01	0,135	35:01~04:01	0,105
56:01~15:01	0,168	07:02~04:01	0,135	15:01~13:02	0,105
14:02~11:01	0,168	27:02~11:01	0,133	37:01~16:01	0,105
35:03~12:01	0,167	27:05~03:01	0,131	40:01~01:01	0,104
38:01~07:01	0,165	39:01~13:01	0,131	44:05~11:01	0,104
37:01~10:01	0,165	55:01~11:01	0,128	40:02~01:01	0,103
07:02~14:01:01G <sup>b</sup>	0,163	39:06~08:01	0,128	35:02~11:01	0,100
41:01~03:01	0,163	27:05~07:01	0,127	39:04~12:01	0,100
49:01~03:01	0,158	44:02:01G~03:01 <sup>a</sup>	0,125	08:01~13:01	0,100
35:01~15:01	0,157	37:01~07:01	0,122	44:02:01G~04:03 <sup>a</sup>	0,099
27:05~08:01	0,157	40:01~13:01	0,120	44:03~13:02	0,098
15:01~04:02	0,155	39:06~16:01	0,120	27:05~11:04	0,098
40:02~16:01	0,151	35:08~03:01	0,119	08:01~13:02	0,096
13:02~13:01	0,150	35:01~12:01	0,118	39:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,095
40:01~08:01	0,150	08:01~16:01	0,117	18:01~07:01	0,094
49:01~01:01	0,150	35:01~04:04	0,114	15:01~04:04	0,093
35:03~04:01	0,148	35:03~11:12	0,113	55:01~11:04	0,092
08:01~07:01	0,147	14:01~07:01	0,113	38:01~01:01	0,091
13:02~10:01	0,144	44:03~14:01:01G <sup>b</sup>	0,112	44:02:01G~04:02 <sup>a</sup>	0,090
44:02:01G~12:01 <sup>a</sup>	0,144	35:08~11:01	0,109	58:01~04:04	0,090
15:01~08:01	0,141	13:02~15:01	0,109	57:01~11:01	0,090
27:05~16:01	0,140	44:03~11:01	0,107	38:01~03:01	0,089
49:01~11:04	0,140	38:01~10:01	0,107	57:01~13:01	0,087
39:01~01:01	0,139	35:01~13:02	0,105	57:01~01:01	0,087

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S3 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)
35:08~11:04	0,087	14:02~01:01	0,070	07:02~15:03	0,060
35:08~07:01	0,086	44:02:01G~13:02 <sup>a</sup>	0,070	35:08~14:01:01G <sup>b</sup>	0,060
44:05~11:04	0,086	15:01~04:03	0,068	18:01~08:01	0,060
40:02~11:04	0,086	13:02~03:01	0,068	40:01~11:04	0,059
08:01~11:04	0,086	08:01~11:01	0,068	35:03~04:04	0,059
41:01~11:04	0,084	51:01~13:05	0,068	15:01~11:04	0,058
50:01~11:01	0,084	56:01~11:04	0,068	51:01~15:02	0,058
52:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,083	18:01~10:01	0,068	51:01~16:02	0,058
37:01~11:01	0,082	40:01~11:01	0,066	35:03~11:03	0,058
18:01~04:03	0,082	38:01~11:03	0,064	44:02:01G~11:03 <sup>a</sup>	0,058
57:01~15:01	0,082	27:02~16:02	0,064	27:02~13:05	0,057
13:02~01:01	0,081	27:02~11:04	0,064	51:01~08:03	0,056
14:02~13:03	0,080	57:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,064	55:01~03:01	0,055
35:01~13:03	0,080	55:01~01:01	0,064	44:03~11:04	0,055
13:02~16:01	0,079	08:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,064	44:03~16:01	0,055
44:02:01G~08:01 <sup>a</sup>	0,079	13:02~11:04	0,064	50:01~11:02	0,055
27:05~13:02	0,077	15:17~16:01	0,063	13:02~08:02	0,055
40:01~03:01	0,076	27:05~04:01	0,063	49:01~04:04	0,055
15:01~07:01	0,076	14:02~11:03	0,063	07:05~03:01	0,054
08:01~01:01	0,074	39:01~11:04	0,062	27:02~15:01	0,054
15:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,074	55:01~08:01	0,062	56:01~04:03	0,054
08:01~08:01	0,072	49:01~14:01:01G <sup>b</sup>	0,062	44:03~04:04	0,052
49:01~16:01	0,071	14:02~15:01	0,061	39:01~15:01	0,052
35:01~03:01	0,070	44:03~01:01	0,061	15:01~15:02	0,052
44:03~04:02	0,070	07:02~15:02	0,060	13:02~14:01:01G <sup>b</sup>	0,051

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S3 - nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)	HLA-B*~DRB1*	f (%)
40:01~07:01	0,050	18:01~13:02	0,044	39:01~08:01	0,037
27:02~03:01	0,049	35:08~12:01	0,044	58:01~13:01	0,037
27:05~14:01:01G <sup>b</sup>	0,049	15:01~16:02	0,044	58:01~16:01	0,037
07:05~10:01	0,049	40:01~16:01	0,044	27:02~01:01	0,036
35:01~01:03	0,048	57:01~11:04	0,043	07:02~04:03	0,036
39:01~04:01	0,048	40:02~04:01	0,043	15:18~08:04	0,035
57:01~13:03	0,047	47:01~07:01	0,042	35:02~04:15	0,035
14:02~11:04	0,047	51:01~09:01	0,042	41:01~13:05	0,035
27:02~11:03	0,047	40:02~07:01	0,041	73:01~04:05	0,035
15:01~03:01	0,047	35:01~11:03	0,041	40:01~04:01	0,034
08:01~09:01	0,045	14:02~07:01	0,041	39:01~07:01	0,034
14:02~13:02	0,045	08:01~04:01	0,041	44:02:01G~04:04 <sup>a</sup>	0,034
58:01~01:01	0,045	44:03~15:01	0,040	51:01~11:02	0,034
13:02~11:01	0,045	07:04~15:01	0,040	27:05~12:01	0,034
40:02~03:01	0,045	57:02~01:02	0,040	35:01~04:07	0,034
51:01~10:01	0,045	41:02~15:01	0,040	44:05~15:01	0,034
15:10~13:02	0,045	14:02~15:03	0,040	08:01~10:01	0,034
15:01~12:01	0,045	44:21~16:01	0,040	35:02~11:03	0,034
41:02~01:01	0,045	40:02~14:01:01G <sup>b</sup>	0,039	35:03~08:02	0,033
40:02~08:01	0,045	45:01~13:02	0,039	35:02~03:01	0,033
53:01~15:02	0,045	14:01~11:01	0,039	50:01~13:02	0,033
48:01~12:01	0,045	35:02~13:02	0,038	44:05~13:01	0,033
41:01~04:05	0,045	18:01~04:04	0,038	40:01~12:01	0,033
38:01~04:04	0,045	48:01~04:02	0,038	57:01~04:03	0,033
40:06~14:04	0,045	56:01~11:01	0,037	35:08~13:02	0,033

*f* - frekvencija haplotipa; <sup>a</sup>HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); <sup>b</sup>HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S4. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)
01:01~52:01~12:02	0,446	01:01~35:01~04:01	0,273	33:01~58:01~03:02	0,201
11:01~51:01~15:02	0,439	26:01~55:01~03:03	0,273	03:01~18:01~12:03	0,201
01:01~49:01~07:01	0,431	01:01~58:01~07:01	0,273	68:02~53:01~04:01	0,199
24:02~38:01~12:03	0,423	02:01~41:02~17:03	0,271	11:01~27:05~02:02	0,198
24:02~51:01~01:02	0,423	03:01~14:02~08:02	0,269	26:01~51:01~14:02	0,198
02:01~15:01~04:01	0,414	03:01~38:01~12:03	0,267	02:01~44:03~04:01	0,197
02:01~44:05~02:02	0,386	03:01~44:02:01G~07:04	0,255	32:01~39:01~12:03	0,195
68:01~51:01~15:02	0,380	24:02~18:01~12:03	0,255	03:01~27:02~02:02	0,194
68:01~39:01~12:03	0,363	24:02~08:01~07:01	0,255	31:01~35:03~04:01	0,194
01:01~07:02~07:02	0,360	24:02~51:01~14:02	0,253	24:02~35:03~12:03	0,193
24:02~27:05~02:02	0,359	02:01~51:01~16:02	0,253	32:01~38:01~12:03	0,191
32:01~15:01~03:03	0,343	11:01~38:01~12:03	0,246	32:01~44:02:01G~05:01	0,191
68:01~18:01~07:01	0,335	23:01~49:01~07:01	0,244	66:01~41:02~17:03	0,190
02:01~27:05~01:02	0,327	26:01~07:02~07:02	0,234	03:02~35:03~04:01	0,182
24:02~44:05~02:02	0,322	03:01~27:05~02:02	0,234	03:01~08:01~07:01	0,182
11:01~07:02~07:02	0,321	03:01~39:01~12:03	0,232	11:01~56:01~01:02	0,179
24:02~35:03~04:01	0,317	01:01~35:02~04:01	0,230	03:01~51:01~15:02	0,177
11:01~55:01~03:03	0,316	01:01~27:05~02:02	0,228	26:01~27:05~01:02	0,174
02:01~35:03~12:03	0,315	03:01~51:01~01:02	0,227	01:01~35:03~04:01	0,172
29:02~44:03~16:01	0,310	30:04~14:01~08:02	0,225	32:01~35:03~04:01	0,172
24:02~55:01~03:03	0,293	23:01~50:01~06:02	0,223	03:01~35:03~12:03	0,171
02:01~49:01~07:01	0,287	24:02~35:08~04:01	0,219	24:02~39:01~12:03	0,169
01:01~13:02~06:02	0,284	02:01~52:01~12:02	0,216	68:01~38:01~12:03	0,167
02:01~56:01~01:02	0,277	02:01~50:01~06:02	0,211	68:01~44:02:01G~07:04	0,166
01:01~18:01~07:01	0,277	24:02~56:01~01:02	0,204	11:01~39:01~12:03	0,165

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S4 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)
11:01~35:03~04:01	0,163	24:02~44:03~04:01	0,141	26:01~56:01~01:02	0,119
03:01~51:01~12:03	0,163	03:01~44:02:01G~05:01	0,139	33:03~58:01~03:02	0,115
02:01~58:01~03:02	0,162	32:01~51:01~12:03	0,138	03:01~56:01~01:02	0,114
11:01~40:02~02:02	0,162	11:01~51:01~14:02	0,137	31:01~35:08~04:01	0,113
26:01~39:01~12:03	0,161	03:01~40:02~02:02	0,137	26:01~13:02~06:02	0,112
68:01~27:02~02:02	0,161	01:01~35:02~06:02	0,137	26:01~18:01~12:03	0,110
26:01~35:03~04:01	0,161	24:02~40:02~02:02	0,137	02:01~39:06~12:03	0,110
68:01~40:01~03:04	0,159	24:02~50:01~06:02	0,134	01:01~51:01~15:02	0,109
26:01~51:01~01:02	0,159	03:01~40:01~03:04	0,134	24:02~27:05~01:02	0,108
31:01~39:01~12:03	0,158	31:01~40:01~03:04	0,134	30:02~18:01~05:01	0,105
11:01~40:01~03:04	0,157	01:01~40:02~02:02	0,133	32:01~27:05~02:02	0,104
32:01~18:01~07:01	0,156	03:01~15:01~03:03	0,131	02:01~44:03~16:02	0,103
68:01~51:01~14:02	0,156	32:01~08:01~07:01	0,131	25:01~57:01~06:02	0,102
03:01~13:02~06:02	0,154	31:01~07:02~07:02	0,131	31:01~15:17~07:01	0,101
02:01~35:08~04:01	0,154	01:01~15:17~07:01	0,131	24:02~49:01~07:01	0,101
01:01~38:01~12:03	0,152	32:01~51:01~15:02	0,130	02:01~41:01~17:01	0,100
24:02~51:01~02:02	0,151	03:01~15:01~03:04	0,130	01:01~18:01~12:03	0,100
26:01~57:01~06:02	0,150	31:01~44:02:01G~05:01	0,127	02:05~49:01~07:01	0,100
31:01~51:01~15:02	0,149	24:02~39:06~07:02	0,127	03:01~44:05~02:02	0,100
68:01~35:01~04:01	0,149	11:01~07:02~12:03	0,126	68:02~14:02~08:02	0,100
01:01~27:02~02:02	0,149	26:01~49:01~07:01	0,125	11:01~51:01~03:03	0,099
25:01~44:02:01G~05:01	0,149	02:01~39:04~12:03	0,125	11:01~15:01~03:03	0,098
11:01~35:03~12:03	0,146	01:01~08:01~07:02	0,124	25:01~08:01~07:01	0,096
68:01~07:02~07:02	0,146	02:01~35:01~03:03	0,123	01:01~35:08~04:01	0,096
24:02~40:01~03:04	0,141	25:01~27:05~02:02	0,121	02:01~44:03~16:01	0,095

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S4 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)	HLA-A*~B*~C*	f (%)
25:01~07:02~07:02	0,094	03:01~55:01~03:03	0,078	11:01~08:01~07:01	0,068
24:02~44:02:01G~16:04	0,093	24:02~57:01~06:02	0,078	02:01~35:02~04:01	0,067
02:01~14:02~08:02	0,093	26:01~07:02~12:03	0,078	03:01~47:01~06:02	0,067
03:01~49:01~07:01	0,092	11:01~14:02~08:02	0,077	26:01~27:02~02:02	0,067
32:01~07:02~07:02	0,091	02:01~44:02:01G~16:04	0,077	24:02~27:02~02:02	0,067
03:01~37:01~06:02	0,090	01:01~56:01~01:02	0,076	11:01~51:01~04:01	0,066
32:01~41:01~17:01	0,089	03:01~52:01~12:02	0,075	24:02~53:01~04:01	0,065
01:01~27:05~01:02	0,088	32:01~18:01~12:03	0,075	02:01~18:01~02:02	0,063
02:01~39:01~07:02	0,086	02:01~55:01~03:03	0,074	02:01~44:05~05:01	0,063
25:01~40:02~02:02	0,085	68:01~08:01~07:01	0,074	11:01~49:01~07:01	0,061
31:01~15:01~03:03	0,085	68:01~15:01~03:03	0,074	11:01~13:02~06:02	0,061
02:01~35:01~02:02	0,084	24:03~07:02~07:02	0,074	68:01~57:01~06:02	0,061
26:01~35:01~04:01	0,084	31:01~18:01~07:01	0,073	68:01~51:01~07:04	0,060
31:01~27:05~02:02	0,083	03:01~44:03~04:01	0,073	30:01~15:10~03:04	0,060
03:01~27:05~01:02	0,083	02:01~14:01~08:02	0,072	26:01~51:01~15:02	0,059
01:01~15:01~03:03	0,082	02:01~51:01~07:01	0,071	02:01~15:01~02:02	0,059
26:01~27:05~02:02	0,080	11:01~44:02:01G~05:01	0,071	24:02~40:02~03:04	0,057
23:01~07:02~07:02	0,080	24:02~37:01~06:02	0,071	32:01~08:01~07:02	0,056
01:01~51:01~12:03	0,080	32:01~51:01~02:02	0,070	03:01~57:01~06:02	0,056
25:01~13:02~06:02	0,079	02:01~15:01~01:02	0,070	11:01~27:05~01:02	0,056
01:01~44:03~04:01	0,079	32:01~51:01~01:02	0,070	29:01~50:01~06:02	0,055
02:01~51:01~05:01	0,079	25:01~15:01~03:04	0,070	02:01~51:08~16:02	0,055
02:01~37:01~06:02	0,078	30:02~14:02~08:02	0,070	24:02~48:01~08:01	0,055
02:01~44:02:01G~06:02	0,078	02:01~18:01~05:01	0,069	25:01~15:01~03:03	0,054
31:01~35:01~04:01	0,078	32:01~51:01~14:02	0,068	02:01~58:01~07:01	0,054

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)



Prilog S4 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*	f(%)	HLA-A*~B*~C*	f(%)	HLA-A*~B*~C*	f(%)
02:01~45:01~06:02	0,054	03:01~44:03~16:01	0,046	01:01~50:01~06:02	0,039
31:01~56:01~01:02	0,054	02:01~27:05~03:04	0,045	24:02~51:01~05:01	0,039
32:01~44:03~16:01	0,053	03:02~08:01~07:02	0,045	02:01~44:02:01G~01:02	0,039
02:01~51:01~12:03	0,053	01:01~51:01~14:02	0,044	01:01~51:01~01:02	0,039
68:01~15:18~07:04	0,053	01:01~40:01~03:04	0,044	68:01~49:01~07:01	0,038
31:01~49:01~07:01	0,052	11:01~55:01~01:02	0,044	31:01~07:02~12:03	0,038
11:01~18:01~12:03	0,052	68:01~27:05~01:02	0,043	25:01~35:01~04:01	0,038
01:01~51:01~16:02	0,052	01:01~40:06~15:02	0,043	02:01~57:01~07:01	0,038
26:01~18:01~07:01	0,052	02:05~58:01~07:01	0,043	31:01~51:01~05:01	0,038
31:01~38:01~12:03	0,051	23:01~15:01~03:03	0,043	11:01~44:02:01G~07:04	0,038
29:01~07:05~15:02	0,050	11:01~49:01~04:01	0,043	03:01~50:01~06:02	0,037
26:01~48:01~08:03	0,050	25:01~55:01~03:03	0,043	02:01~39:01~07:01	0,037
02:02~41:01~17:01	0,050	03:02~44:02:01G~16:04	0,043	02:01~44:21~15:02	0,037
01:01~39:01~12:03	0,049	01:01~35:03~12:03	0,042	02:01~15:08~01:02	0,037
24:02~15:01~04:01	0,049	31:01~08:01~07:01	0,042	26:01~08:01~07:01	0,037
24:02~14:02~08:02	0,049	23:01~18:01~12:03	0,042	03:01~35:08~15:02	0,037
30:01~35:03~04:01	0,048	03:02~51:01~16:02	0,042	24:02~15:01~03:04	0,037
02:01~35:02~06:02	0,048	26:01~44:05~02:02	0,042	32:01~27:05~01:02	0,036
25:01~51:01~14:02	0,048	02:01~07:05~04:01	0,042	03:01~51:01~14:02	0,036
68:01~15:01~03:04	0,047	03:02~51:01~15:02	0,041	23:01~40:02~02:02	0,036
32:01~56:01~01:02	0,047	32:01~44:02:01G~07:04	0,041	32:01~14:02~08:02	0,035
24:02~18:01~05:01	0,047	23:01~44:02:01G~05:01	0,040	24:03~18:01~12:03	0,035
30:01~35:01~04:01	0,047	68:02~53:01~06:02	0,040	32:01~15:17~07:01	0,035
11:01~37:01~06:02	0,046	66:01~14:01~08:02	0,040	32:01~49:01~07:01	0,035
03:01~27:02~05:01	0,046	26:01~27:14~01:02	0,040	24:02~51:01~15:06	0,035

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27)

Prilog S5. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)
02:01~44:05~16:01	0,266	02:01~18:01~15:01	0,198	24:02~27:05~13:01	0,165
02:01~18:01~01:01	0,248	02:01~51:01~11:04	0,196	68:02~53:01~13:02	0,165
68:01~35:03~08:01	0,247	03:01~35:03~01:01	0,196	24:02~15:01~13:01	0,160
03:01~07:02~11:01	0,245	32:01~40:02~16:02	0,195	02:01~44:02:01G~15:01	0,160
26:01~07:02~15:01	0,240	01:01~49:01~13:02	0,193	03:01~08:01~03:01	0,156
02:01~18:01~11:01	0,239	01:01~37:01~15:01	0,193	02:01~07:02~08:01	0,156
24:02~51:01~13:01	0,238	02:01~44:02:01G~11:04	0,192	02:01~38:01~11:04	0,151
26:01~27:05~01:01	0,234	02:01~35:03~16:01	0,192	24:02~18:01~03:01	0,151
02:01~39:01~16:01	0,231	03:01~27:02~16:01	0,192	24:02~51:01~11:04	0,149
29:02~44:03~07:01	0,226	30:04~14:01~04:04	0,190	24:02~27:05~01:01	0,148
03:01~44:02:01G~16:01	0,225	24:02~40:02~11:01	0,188	02:01~51:01~13:02	0,147
02:01~40:02~11:01	0,224	03:01~35:03~04:03	0,185	33:01~58:01~13:02	0,145
11:01~35:01~16:01	0,221	03:01~07:02~13:02	0,184	02:01~15:01~15:01	0,145
11:01~52:01~01:01	0,218	02:01~44:02:01G~11:01	0,180	11:01~52:01~15:02	0,145
02:01~38:01~15:01	0,215	02:01~35:03~14:01:01G	0,180	03:01~14:02~01:02	0,144
01:01~13:02~07:01	0,212	02:01~18:01~14:01:01G	0,176	24:02~35:01~01:01	0,142
01:01~35:02~11:04	0,212	24:02~38:01~13:01	0,174	68:01~51:01~11:01	0,140
02:01~40:01~13:02	0,207	01:01~07:02~15:01	0,174	24:02~44:02:01G~16:01	0,139
02:01~52:01~15:02	0,206	02:01~35:01~14:01:01G	0,174	02:01~15:01~11:01	0,134
02:01~35:01~01:01	0,206	02:01~38:01~04:02	0,174	01:01~08:01~15:01	0,134
02:01~41:02~13:03	0,205	24:02~07:02~01:01	0,172	02:01~44:02:01G~14:01:01G	0,133
03:01~07:02~01:01	0,204	02:01~27:05~15:01	0,170	03:01~35:01~11:04	0,131
02:01~35:03~11:04	0,203	68:01~51:01~13:01	0,169	02:01~44:02:01G~01:01	0,131
11:01~51:01~04:04	0,200	11:01~35:01~14:01:01G	0,168	32:01~51:01~01:01	0,131
03:01~51:01~11:01	0,199	32:01~35:01~16:01	0,168	11:01~35:01~13:01	0,130

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S5 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)
68:01~18:01~16:01	0,130	03:01~07:02~07:01	0,115	03:01~07:02~13:01	0,104
11:01~39:01~16:01	0,130	02:01~35:01~08:01	0,115	24:02~51:01~16:01	0,103
32:01~40:02~11:01	0,130	23:01~49:01~11:01	0,115	26:01~38:01~14:01:01G	0,103
11:01~40:02~11:01	0,129	11:01~55:01~15:01	0,115	68:01~18:01~11:04	0,102
02:01~38:01~16:01	0,129	03:01~35:03~14:01:01G	0,114	25:01~18:01~01:01	0,102
11:01~51:01~11:01	0,129	03:01~51:01~11:04	0,114	03:01~51:01~01:01	0,101
24:02~51:01~04:03	0,129	24:02~55:01~16:01	0,113	03:01~35:03~13:02	0,100
01:01~08:01~07:01	0,127	24:02~18:01~11:01	0,113	03:01~44:03~07:01	0,100
02:01~35:03~11:01	0,127	02:01~27:05~04:04	0,112	02:01~50:01~07:01	0,099
03:01~07:02~16:01	0,126	24:02~18:01~15:01	0,111	03:01~38:01~13:01	0,099
11:01~27:05~01:01	0,126	26:01~38:01~13:02	0,111	32:01~15:01~01:01	0,099
03:01~18:01~01:01	0,125	24:02~13:02~10:01	0,110	02:01~27:05~07:01	0,098
66:01~41:02~13:03	0,125	23:01~50:01~03:01	0,110	02:01~40:01~04:04	0,098
24:02~35:03~01:01	0,124	01:01~58:01~08:04	0,110	32:01~39:01~16:01	0,098
02:01~39:01~12:01	0,124	68:01~38:01~15:01	0,110	01:01~08:01~16:01	0,097
02:01~27:05~11:01	0,122	25:01~18:01~16:01	0,109	01:01~37:01~07:01	0,096
68:01~27:02~16:01	0,120	32:01~15:01~11:01	0,108	11:01~56:01~01:01	0,096
02:01~51:01~03:01	0,120	24:02~15:01~11:03	0,108	02:01~35:08~16:01	0,096
25:01~18:01~04:01	0,120	11:01~35:03~04:08	0,108	01:01~44:03~07:01	0,095
26:01~18:01~11:04	0,120	31:01~44:02:01G~11:04	0,106	24:02~44:05~01:01	0,094
02:01~49:01~11:01	0,119	26:01~51:01~11:04	0,106	32:01~35:01~01:01	0,094
32:01~38:01~15:01	0,118	24:02~35:01~13:01	0,106	32:01~40:02~16:01	0,094
03:02~35:03~13:02	0,118	33:03~58:01~03:01	0,106	68:01~35:03~15:01	0,094
31:01~35:03~03:01	0,118	01:01~27:05~01:01	0,105	02:01~49:01~13:02	0,093
24:02~15:01~04:02	0,116	68:01~35:03~11:01	0,104	03:01~35:01~04:01	0,092

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S5 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)
11:01~35:01~11:01	0,092	11:01~38:01~04:02	0,084	24:02~51:01~07:01	0,076
02:01~56:01~01:01	0,091	24:02~44:05~11:01	0,084	03:01~44:05~16:01	0,076
24:02~44:02:01G~15:01	0,091	24:02~35:01~04:02	0,083	02:01~44:02:01G~12:01	0,076
02:01~56:01~08:01	0,091	01:01~35:01~01:01	0,083	11:01~13:02~07:01	0,076
02:05~49:01~07:01	0,090	02:01~51:01~12:01	0,083	02:01~15:01~13:02	0,075
32:01~41:01~03:01	0,090	02:01~38:01~10:01	0,083	03:01~15:01~04:01	0,075
02:01~27:05~13:01	0,090	02:01~35:01~11:04	0,083	01:01~08:01~13:01	0,075
24:02~35:03~11:01	0,089	26:01~49:01~01:01	0,082	32:01~15:01~13:01	0,075
01:01~37:01~10:01	0,089	01:01~51:01~11:01	0,082	24:02~35:01~11:04	0,075
24:02~51:01~04:01	0,089	02:01~15:01~08:01	0,082	24:02~18:01~13:01	0,075
02:01~39:04~12:01	0,089	03:01~13:02~07:01	0,081	02:01~35:01~11:01	0,075
68:01~35:03~11:12	0,089	03:01~35:03~15:01	0,081	68:01~08:01~03:01	0,075
02:01~35:03~13:01	0,088	03:01~14:02~11:01	0,080	02:01~39:01~11:01	0,074
01:01~27:02~16:01	0,088	30:02~18:01~03:01	0,080	02:01~58:01~13:02	0,073
03:01~18:01~16:01	0,087	26:01~08:01~03:01	0,079	03:01~51:01~13:02	0,073
02:01~44:02:01G~07:01	0,086	24:02~56:01~11:04	0,079	31:01~35:08~03:01	0,072
03:01~07:02~04:01	0,086	03:01~35:01~15:01	0,078	01:01~15:17~13:02	0,072
68:01~51:01~13:02	0,086	24:02~39:01~16:01	0,078	26:01~38:01~07:01	0,072
25:01~08:01~03:01	0,086	03:01~07:02~11:04	0,077	24:02~07:02~16:01	0,072
01:01~08:01~11:04	0,086	02:01~35:03~01:01	0,077	26:01~38:01~16:01	0,071
02:01~07:02~07:01	0,085	32:01~40:02~13:01	0,077	32:01~08:01~03:01	0,071
68:01~44:02:01G~11:01	0,085	24:02~51:01~15:01	0,077	01:01~57:01~16:01	0,071
26:01~39:01~16:01	0,084	03:01~07:02~03:01	0,077	24:02~35:01~07:01	0,071
24:02~07:02~11:01	0,084	01:01~08:01~13:02	0,077	32:01~39:01~11:01	0,070
11:01~40:01~13:02	0,084	31:01~07:02~15:01	0,076	68:02~14:02~13:03	0,070

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S5 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~DRB1*	f (%)
24:02~35:03~13:01	0,070	11:01~51:01~01:01	0,065	02:01~18:01~03:01	0,060
25:01~57:01~07:01	0,070	03:01~18:01~14:01:01G	0,065	26:01~56:01~08:01	0,060
03:01~40:01~13:01	0,069	02:01~39:06~08:01	0,065	01:01~27:02~16:02	0,060
03:01~35:03~04:01	0,069	02:01~35:01~13:01	0,065	02:01~15:01~16:01	0,060
01:01~35:01~04:04	0,068	68:01~18:01~13:01	0,065	32:01~51:01~16:01	0,060
02:01~35:03~13:02	0,068	02:01~35:01~07:01	0,064	30:02~14:02~11:03	0,060
32:01~51:01~04:04	0,068	02:01~50:01~03:01	0,064	31:01~27:05~01:01	0,060
03:01~15:01~11:03	0,068	24:02~07:02~13:02	0,063	02:01~07:02~14:01:01G	0,060
25:01~15:01~04:01	0,068	02:01~51:01~15:01	0,063	25:01~13:02~07:01	0,059
24:02~44:02:01G~07:01	0,068	02:01~51:01~04:04	0,063	26:01~55:01~08:01	0,059
02:01~51:01~04:01	0,067	32:01~27:05~15:01	0,063	02:01~35:02~11:04	0,059
24:02~57:01~07:01	0,067	24:02~18:01~14:01:01G	0,063	02:01~27:05~08:01	0,059
01:01~08:01~11:01	0,067	02:01~40:01~08:01	0,063	24:02~44:02:01G~11:01	0,059
11:01~35:01~12:01	0,067	24:02~50:01~07:01	0,063	03:01~18:01~11:01	0,059
03:01~35:08~11:01	0,067	01:01~38:01~16:01	0,063	02:01~07:02~03:01	0,059
01:01~58:01~04:04	0,067	01:01~35:02~11:01	0,062	02:01~35:03~04:03	0,059
02:01~39:06~16:01	0,066	02:01~35:03~08:01	0,062	24:02~15:01~01:01	0,059
68:01~35:01~01:01	0,066	24:02~44:03~07:01	0,062	68:01~07:02~13:01	0,058
32:01~18:01~11:04	0,066	03:01~35:01~13:01	0,062	31:01~40:01~04:04	0,058
03:01~27:05~01:01	0,066	11:01~55:01~16:01	0,061	02:01~15:01~11:03	0,058
11:01~18:01~15:01	0,066	11:01~55:01~14:01:01G	0,061	24:02~51:01~03:01	0,058
03:01~35:03~07:01	0,066	25:01~44:02:01G~14:01:01G	0,061	11:01~08:01~03:01	0,058
02:01~40:02~13:01	0,066	01:01~40:02~16:02	0,061	24:02~55:01~13:01	0,058
30:01~13:02~13:01	0,065	02:01~27:02~11:01	0,061	23:01~44:03~14:01:01G	0,057
25:01~18:01~03:01	0,065	24:02~44:02:01G~13:01	0,061	01:01~58:01~13:02	0,057

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S6. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)
01:01~13:02~06:02~07:01	0,207	02:01~35:03~04:01~11:04	0,179	03:01~35:01~04:01~11:04	0,149
02:01~51:01~02:02~11:01	0,205	02:01~52:01~12:02~15:02	0,178	24:02~51:01~14:02~13:01	0,148
02:01~35:01~04:01~01:01	0,204	02:01~35:01~04:01~14:01:01G	0,176	24:02~18:01~07:01~11:04	0,147
03:01~27:02~02:02~16:01	0,203	32:01~35:01~04:01~16:01	0,174	03:01~14:02~08:02~01:02	0,146
11:01~51:01~15:02~04:04	0,202	02:01~18:01~07:01~11:01	0,174	32:01~40:02~02:02~11:01	0,145
01:01~37:01~06:02~15:01	0,202	02:01~35:03~04:01~11:01	0,173	02:01~44:02:01G~05:01~11:04	0,143
02:01~27:05~01:02~01:01	0,202	02:01~39:01~12:03~16:01	0,166	02:01~15:01~03:03~04:01	0,142
03:01~07:02~07:02~01:01	0,200	11:01~52:01~12:02~15:02	0,165	02:01~44:02:01G~05:01~16:01	0,140
24:02~38:01~12:03~13:01	0,196	68:02~53:01~04:01~13:02	0,165	24:02~27:05~02:02~13:01	0,139
01:01~49:01~07:01~13:02	0,195	01:01~07:02~07:02~15:01	0,164	02:01~27:05~02:02~15:01	0,137
02:01~35:03~04:01~16:01	0,195	02:01~38:01~12:03~11:04	0,161	02:01~51:01~01:02~14:01:01G	0,137
03:01~35:03~04:01~04:03	0,192	02:01~38:01~12:03~04:02	0,160	03:01~07:02~07:02~07:01	0,136
32:01~40:02~02:02~16:02	0,192	02:01~51:01~15:02~01:01	0,159	02:01~51:01~15:02~11:01	0,134
02:01~40:01~03:04~13:02	0,190	24:02~07:02~07:02~01:01	0,158	11:01~35:01~04:01~11:01	0,133
03:01~35:03~04:01~01:01	0,189	24:02~51:01~01:02~11:01	0,158	11:01~39:01~12:03~16:01	0,133
02:01~44:02:01G~05:01~13:01	0,189	02:01~44:02:01G~05:01~15:01	0,158	02:01~44:03~04:01~07:01	0,133
02:01~51:01~15:02~07:01	0,188	26:01~07:02~07:02~15:01	0,158	11:01~35:01~04:01~13:01	0,132
02:01~51:01~14:02~01:01	0,188	11:01~35:01~04:01~14:01:01G	0,157	02:01~18:01~07:01~15:01	0,132
02:01~15:01~04:01~01:01	0,186	02:01~51:01~15:02~13:01	0,156	02:01~07:02~07:02~08:01	0,131
03:01~07:02~07:02~13:02	0,185	03:01~44:02:01G~0704~16:01	0,156	02:01~38:01~12:03~16:01	0,131
30:04~14:01~08:02~04:04	0,185	24:02~15:01~0303~13:01	0,156	02:01~49:01~07:01~11:01	0,131
02:01~35:03~12:03~14:01:01G	0,184	03:01~07:02~07:02~16:01	0,155	24:02~40:02~02:02~11:01	0,131
02:01~18:01~07:01~14:01:01G	0,182	01:01~08:01~07:01~15:01	0,150	68:01~18:01~07:01~16:01	0,129
02:01~18:01~12:03~01:01	0,182	33:01~58:01~0302~13:02	0,150	02:01~44:02:01G~05:01~01:01	0,129
02:01~51:01~01:02~11:01	0,181	26:01~27:05~01:02~01:01	0,149	31:01~35:03~04:01~03:01	0,127

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S6 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)
68:01~51:01~15:02~13:01	0,126	68:01~38:01~12:03~15:01	0,111	11:01~56:01~01:02~01:01	0,098
66:01~41:02~17:03~13:03	0,125	01:01~58:01~07:01~08:04	0,110	24:02~51:01~01:02~04:03	0,098
02:01~39:01~12:03~12:01	0,125	02:01~51:01~14:02~11:01	0,110	03:01~35:03~12:03~14:01:01G	0,098
02:01~51:01~14:02~13:01	0,124	24:02~15:01~03:03~04:02	0,110	02:01~35:01~03:03~08:01	0,097
03:01~08:01~07:01~03:01	0,124	25:01~18:01~12:03~04:01	0,109	25:01~18:01~12:03~01:01	0,097
32:01~38:01~12:03~15:01	0,122	02:01~51:01~15:02~08:01	0,106	26:01~38:01~12:03~16:01	0,096
32:01~51:01~12:03~01:01	0,122	24:02~13:02~06:02~10:01	0,105	01:01~37:01~06:02~07:01	0,096
32:01~35:01~04:01~01:01	0,121	24:02~35:01~04:01~01:01	0,105	03:01~07:02~07:02~03:01	0,096
01:01~08:01~07:02~03:01	0,120	24:02~35:01~04:01~04:02	0,105	32:01~39:01~12:03~16:01	0,096
03:02~35:03~04:01~13:02	0,120	24:02~44:05~02:02~01:01	0,105	24:02~35:03~12:03~01:01	0,095
11:01~07:02~12:03~15:01	0,120	11:01~40:02~02:02~11:01	0,104	01:01~35:02~06:02~11:04	0,094
01:01~08:01~07:01~07:01	0,119	24:02~35:03~04:01~13:01	0,104	24:02~07:02~07:02~11:01	0,094
02:01~27:05~02:02~04:04	0,118	24:02~55:01~03:03~16:01	0,104	02:01~35:08~04:01~16:01	0,093
25:01~18:01~12:03~16:01	0,118	02:01~51:01~15:02~13:02	0,102	24:02~39:01~12:03~16:01	0,092
68:01~27:02~02:02~16:01	0,117	26:01~51:01~01:02~11:04	0,102	68:01~35:03~04:01~11:01	0,092
23:01~49:01~07:01~11:01	0,117	24:02~35:01~04:01~13:01	0,102	01:01~08:01~07:01~13:01	0,092
01:01~35:02~04:01~11:04	0,116	24:02~44:02:01G~05:01~16:01	0,101	02:01~27:05~02:02~11:01	0,092
02:01~50:01~06:02~07:01	0,116	32:01~08:01~07:01~03:01	0,101	02:01~35:01~04:01~13:01	0,092
26:01~38:01~12:03~13:02	0,116	32:01~15:01~03:03~01:01	0,100	03:01~35:03~04:01~15:01	0,091
23:01~50:01~06:02~03:01	0,115	33:03~58:01~03:02~03:01	0,100	02:01~56:01~01:02~08:01	0,091
11:01~55:01~03:03~15:01	0,114	11:01~27:05~02:02~01:01	0,100	02:01~39:04~12:03~12:01	0,090
26:01~38:01~12:03~14:01:01G	0,112	24:02~15:01~03:03~11:03	0,100	02:05~49:01~07:01~07:01	0,090
11:01~35:03~12:03~04:08	0,112	26:01~39:01~12:03~16:01	0,099	32:01~15:01~03:03~11:01	0,090
24:02~18:01~07:01~11:01	0,112	68:01~35:03~04:01~15:01	0,099	68:01~44:02:01G~07:04~11:01	0,090
24:02~18:01~12:03~11:04	0,111	02:01~56:01~01:02~01:01	0,098	02:01~40:01~03:04~04:04	0,090

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)

Prilog S6 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)
68:01~35:03~04:01~11:12	0,090	02:01~15:01~03:03~11:01	0,082	02:01~39:06~12:03~16:01	0,074
03:01~07:02~07:02~13:01	0,089	03:01~14:02~08:02~11:01	0,082	02:01~44:02:01G~05:01~14:01:01G	0,074
11:01~38:01~12:03~04:02	0,089	24:02~44:02:01G~05:01~13:01	0,082	26:01~49:01~07:01~01:01	0,074
24:02~51:01~02:02~11:04	0,088	03:01~18:01~12:03~16:01	0,082	26:01~56:01~01:02~08:01	0,074
01:01~27:02~02:02~16:01	0,087	31:01~07:02~07:02~15:01	0,082	01:01~08:01~07:01~11:01	0,073
03:01~07:02~07:02~04:01	0,087	02:01~38:01~12:03~10:01	0,081	68:01~07:02~07:02~13:01	0,073
31:01~44:02:01G~05:01~11:04	0,087	01:01~44:03~04:01~07:01	0,081	03:01~15:01~03:03~11:03	0,072
32:01~40:02~02:02~16:01	0,087	03:01~51:01~12:03~11:04	0,081	03:01~35:03~04:01~13:02	0,072
02:01~18:01~07:01~16:01	0,087	02:01~39:01~12:03~11:01	0,081	24:02~35:01~04:01~07:01	0,072
02:01~40:02~02:02~13:01	0,087	02:01~35:01~04:01~11:04	0,080	02:01~44:03~16:02~07:01	0,071
25:01~18:01~12:03~03:01	0,086	26:01~07:02~12:03~15:01	0,080	32:01~18:01~07:01~11:04	0,071
26:01~18:01~12:03~11:04	0,086	24:02~35:01~04:01~11:04	0,079	02:01~15:01~03:03~11:03	0,071
03:01~51:01~01:02~11:01	0,086	32:01~40:02~02:02~13:01	0,079	02:01~07:02~07:02~14:01:01G	0,070
24:02~18:01~07:01~14:01:01G	0,085	24:02~07:02~07:02~16:01	0,079	02:01~27:05~02:02~13:01	0,070
30:02~18:01~05:01~03:01	0,085	01:01~08:01~07:01~16:01	0,078	02:01~51:01~02:02~04:03	0,070
32:01~41:01~17:01~03:01	0,085	02:01~35:03~04:01~13:01	0,077	03:01~35:03~04:01~13:01	0,070
03:01~38:01~12:03~13:01	0,084	24:02~27:05~01:02~01:01	0,077	24:02~18:01~07:01~01:01	0,070
24:02~56:01~01:02~11:04	0,084	03:01~51:01~15:02~11:01	0,076	31:01~35:08~04:01~03:01	0,070
03:01~18:01~07:01~01:01	0,084	24:02~27:05~02:02~01:01	0,075	68:02~14:02~08:02~13:03	0,070
02:01~07:02~07:02~07:01	0,083	24:02~44:05~02:02~11:01	0,075	01:01~58:01~07:01~04:04	0,070
02:01~49:01~07:01~13:02	0,083	02:01~18:01~12:03~11:04	0,075	24:02~44:02:01G~05:01~07:01	0,069
03:01~13:02~06:02~07:01	0,083	02:01~40:01~03:04~01:01	0,075	24:02~57:01~06:02~07:01	0,069
01:01~37:01~06:02~10:01	0,083	11:01~40:01~03:04~13:02	0,074	03:01~35:01~04:01~04:01	0,069
25:01~08:01~07:01~03:01	0,083	01:01~08:01~07:01~11:04	0,074	03:01~35:03~04:01~04:01	0,069
32:01~15:01~03:03~13:01	0,083	02:01~35:03~04:01~13:02	0,074	26:01~38:01~12:03~07:01	0,069

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)



Prilog S6 – nastavak. Raspodjela najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1 u hrvatskoj populaciji (N=10 000) (pozicija 51-350)

HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)	HLA-A*~B*~C*~DRB1*	f (%)
02:01~44:02:01G~05:01~07:01	0,068	03:01~40:01~03:04~13:01	0,063	11:01~38:01~12:03~14:01:01G	0,058
03:01~35:01~04:01~15:01	0,068	11:01~55:01~03:03~14:01:01G	0,063	02:01~44:02:01G~06:02~11:01	0,057
25:01~57:01~06:02~07:01	0,068	30:01~13:02~06:02~13:01	0,063	25:01~15:01~03:04~04:01	0,057
32:01~27:05~02:02~15:01	0,068	03:01~39:01~12:03~13:01	0,062	02:01~27:02~02:02~13:05	0,057
01:01~57:01~06:02~16:01	0,068	01:01~27:05~02:02~01:01	0,062	02:01~50:01~06:02~03:01	0,057
03:01~15:01~03:04~04:01	0,068	11:01~55:01~03:03~16:01	0,062	32:01~35:03~04:01~11:01	0,057
02:01~58:01~03:02~13:02	0,067	03:01~44:05~02:02~16:01	0,061	32:01~51:01~02:02~16:01	0,057
26:01~57:01~06:02~07:01	0,067	26:01~55:01~03:03~08:01	0,061	02:01~38:01~12:03~07:01	0,056
01:01~15:17~07:01~13:02	0,067	01:01~08:01~07:01~08:01	0,060	02:01~40:01~03:04~13:01	0,055
01:01~35:01~04:01~01:01	0,067	01:01~27:02~02:02~16:02	0,060	03:01~39:01~12:03~14:01:01G	0,055
02:01~51:01~15:02~14:01:01G	0,067	02:01~51:01~01:02~08:01	0,060	31:01~40:01~03:04~04:04	0,055
02:01~51:01~15:02~16:01	0,067	30:02~14:02~08:02~11:03	0,060	02:01~18:01~07:01~04:01	0,055
24:02~44:03~04:01~11:01	0,066	68:01~18:01~07:01~13:01	0,060	24:02~39:06~07:02~08:01	0,055
68:01~51:01~14:02~11:01	0,066	01:01~38:01~12:03~16:01	0,060	26:01~27:05~02:02~01:01	0,055
01:01~08:01~07:01~13:02	0,065	03:01~07:02~07:02~14:01:01G	0,060	33:01~14:02~08:02~11:04	0,055
02:01~27:05~02:02~07:01	0,065	01:01~51:01~12:03~11:04	0,059	25:01~27:05~02:02~01:01	0,055
02:01~40:01~03:04~08:01	0,065	02:01~35:01~04:01~16:01	0,059	02:01~27:02~02:02~15:01	0,054
26:01~35:03~04:01~04:03	0,065	03:01~07:02~07:02~11:04	0,059	02:01~44:02:01G~05:01~12:01	0,054
02:01~07:02~07:02~03:01	0,064	24:02~50:01~06:02~07:01	0,059	02:01~51:01~16:02~16:01	0,054
68:01~35:01~04:01~01:01	0,064	26:01~38:01~12:03~03:01	0,059	03:01~51:01~12:03~01:01	0,054
11:01~18:01~12:03~15:01	0,064	01:01~35:01~04:01~04:04	0,059	02:01~35:01~04:01~11:01	0,054
01:01~40:02~02:02~16:02	0,063	02:01~35:01~02:02~01:01	0,059	02:01~38:01~12:03~11:01	0,054
24:02~44:02:01G~16:04~15:01	0,063	02:01~51:01~14:02~11:04	0,059	02:01~44:03~16:01~07:01	0,054
32:01~39:01~12:03~11:01	0,063	02:01~44:02:01G~16:04~11:04	0,058	02:01~51:01~01:02~04:01	0,054
02:01~51:01~14:02~07:01	0,063	03:01~44:03~16:01~07:01	0,058	25:01~44:02:01G~05:01~14:01:01G	0,054

*f* - frekvencija haplotipa; HLA-B\*44:02:01G (-B\*44:02 ili -B\*44:27); HLA-DRB1\*14:01:01G (-DRB1\*14:01 ili -DRB1\*14:54)