МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Анастасия Иванова Ормандjиева

ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
на тема

ИМУНОМОДУЛИРАНЕ НА РАКОВИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ ОТ HLA

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление: 4.3. Биологически науки
Докторска програма: Имунология

Научен ръководител: Проф. Милена Иванова Иванова-Шиварова, дм
София, 2024

Дисертационният труд е написан на 125 страници, онагледен с 50 фигури и 37 таблици. Библиографията съдържа 139 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по Клинична имунология при Медицински университет – София с протокол № 03/08.04.2024, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 08.10.2024, съобразно заповед на Ректора на МУ – София № РК36-1179/16.05.2024 г., пред **научно жури** в състав:

1. Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова - Григорова, дмн - вътрешен член за МУ – София, пенсиониран преподавател по-малко от 5 год., Катедра по Клинична имунология на Медицински факултет при МУ-София;

2. Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн – вътрешен член за МУ – София, Катедра по Клинична имунология на Медицински факултет при МУ-София;

3. Доц. Иван Миладинов Бочев, дб – външен член за МУ – София, Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ при БАН;

4. Проф. д-р Фани Георгиева Мартинова, дмн – външен член за МУ – София, УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов”;

5. Доц. Светослав Георгиев Димов, дб – външен член за МУ – София, Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“;

Резервни членове:

1. Доц. д-р Екатерина Иванова Иванова - Тодорова, дм – вътрешен член за МУ – София, Катедра по Клинична имунология на Медицински факултет при МУ-София;

2. Доц. Милена Сергеева Мурджева - Андонова, дб – външен член за МУ – София, Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ при БАН.

Технически сътрудник:

Бушра Набил Ал Хадра

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по Клинична имунология. Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 08.10.2024 от 14:00 ч. в Аулата на УМБАЛ „Св. Екатерина“, ЕАД – гр. София, бул. „Пенчо Славейков“ 52.

Съдържание:

Използвани съкращения: 6
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 7
Въведение 7
I. Главен комплекс за тъканна съвместимост при човека (HLA) 8
1. Генетична организация на HLA системата 8
2. HLA клас I и клас II антигени 11
3. Антигенно представяне 13
4. HLA полиморфизъм 15
5. HLA номенклатура 16
6. HLA типизиране 16
II. Ракови заболявания и HLA 19
1. HLA генетични полиморфизми при раковите заболявания 19
2. Роля на експресията на класическите HLA клас Ia и Ib молекули 23
3. Роля на експресията на класически HLA клас II молекули при тумори 25
III. Плоскоклетъчен карцином на главата и шията (HNSCC) 26
Заключение 29
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 32
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 33
I. МАТЕРИАЛИ 33
II. МЕТОДИ 34
1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв 34
2. Измерване концентрацията на ДНК с Qubit флуорометър 35
3. Методи за HLA типизиране с NGS 37
3.1. GenDx NGSgo 37
3.2. AlloSeq Tx 17 43
4. Статистически методи 52
РЕЗУЛТАТИ 54
I. Оценка на методи за NGS на класически и некласически HLA гени 54
1. Оценка на GenDx метод за NGS с платформа Ion Torrent 54
2. Оценка на AlloSeq Tx17 метод за NGS с протокол за ранно обединяване на пробите 62
II. Изследване на равновесието на Харди-Вайнберг 66
III. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при HNSCC 67
1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при здрави индивиди и при пациентите с HNSCC 67

1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация 67
1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с HNSCC 67
2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с HNSCC 68
3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC 71
4. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC 73
IV. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на устната кухина и ларинкса – сравнителен анализ 74
1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при пациентите с OSCC и LSCC 74
1.1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC 74
1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC 75
1.3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при двете групи пациенти ... 76
2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при двете групи пациенти 79
3. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при двете групи пациенти 80
V. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при OSCC 80
1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC 80
2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с OSCC 81
3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с OSCC 85
4. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC 86
VI. Роля на HLA полиморфизми при LSCC 87
1. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при LSCC 87
1.1. Изследване на алелния полиморфизъм на HLA клас I и клас II гени при пациентите с LSCC.. 87
1.2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC 89
1.3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC 92
1.4. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC 93
2. Роля на некласическите HLA Ib и MIC полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на ларинкса 94

2.1. Изследване на алелния полиморфизъм на некласическите HLA клас Ib и MIC гени при здрави индивиди и пациентите с LSCC 94
2.1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация 94
2.1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC 94
2.2. Сравнителен анализ на некласическите HLA клас Ib и MIC алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC 95
2.3. Сравнителен анализ на некласически HLA Ib и MIC дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC 97
ДИСКУСИЯ 99
1. HLA типизиране с NGS 99
2. Ролята на HLA при HNSCC – предразположеност и протективен ефект 104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 111
ИЗВОДИ 112
ПРИНОСИ 113
ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 114
НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРАЗНИ С ТЕМАТА И ФИНАНСИРАЩИ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 114
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ 115
Използвана литература: 116
БЛАГОДАРНОСТИ 124
ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА АВТОРСТВО 125

Използвани съкращения:

На латиница:

APC	antigen presenting cells	антиген представящи клетки
HLA	human leukocyte antigen	човешки левкоцитен антиген
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	плоскоклетъчен карцином на главата и шията
LD	linkage disequilibrium	неравновесна връзка
LSCC	Laryngeal squamous cell carcinoma	плоскоклетъчен карцином на ларинкса
MHC	major histocompatibility complex	главен комплекс за тъканна съвместимост
Mb	megabase	мегабази
MIIC	MHC class II-loading complex	MHC клас II натоварващ комплекс
NK	natural killer cells	клетки естествени убийци
NGS	next generation sequencing	секвениране от ново поколение
OS	overall survival	оцеляване след поставяне на диагноза
OSCC	oral squamous cell carcinoma	плоскоклетъчен карцином на устната кухина
PCR	polymerase chain reation	полимеразна верижна реакция
SNP	single nucleotide polymorphisms	единични нуклеотидни полиморфизми
TCR	T cell receptor	Т клетъчен рецептор

На кирилица:

АТФ	аденозин трифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
ЕР	ендоплазмен ретикулум
АК	аминокиселина

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Въведение

Ракът е генетично заболяване възникващо в резултат на нарушения в гените, контролиращи функциите на нашите клетки, основно засягащи растежа и размножаването. Генетичните промени, които водят до възникването на рак, могат да се унаследят в поколението или да възникнат *de novo*, по време на постембрионалното развитие, в резултат на нарушения по време на клетъчното делене или повреди в дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК), вследствие на излагане на фактори на околната среда [1].

Ракът на всеки отделен пациент е комбинация от уникални генетични промени. Дори в рамките на един и същ тумор, различните клетки са в състояние на геномна нестабилност [2].

Натрупани са доказателства, че прогресивният туморен растеж не възниква поради нарушения в имунната система, а защото раковата клетка е способна да изработва стратегии за избягване на имунното разпознаване. Освен това, раковите клетки придобиват нови биологични функции, с цел да мигрират и колонизират нови тъкани [1]. В някои човешки тумори, раковите клетки се разпознават и унищожават от цитотоксични Т клетки. Въпреки това, повечето тумори не се елиминират от Т клетките, а растат неконтролируемо и образуват метастази, докато не унищожат гостоприемника [3].

Главният комплекс за тъканна съвместимост (MHC) или човешките левкоцитни антигени (HLA) е комплекс от антигенни молекули, които са специализирани в комуникацията с Т-клетъчния рецептор и клетъчните лиганди на клетките естествени убийци (NK клетки). Антигенните молекули комуникират със съответните рецептори чрез взаимодействието с пептиди, получени от преработени клетъчни и екзогенни белтъци, за да се разпознае „свое и чуждо“. По този начин, HLA молекулите детерминират степента на активация и капацитет за убиване на цитотоксичните Т клетки и NK клетките. Всяка промяна в HLA профила на туморните клетки може да има значително влияние върху имунното разпознаване и имунното отхвърляне на раковите клетки [4].

Туморите увеличават геномната нестабилност, което засяга *HLA* и други гени отговорни за ключови имунологични процеси. Този механизъм предоставя разнообразие от туморни фенотипи, които се селектират от активния имунен надзор. NK клетките

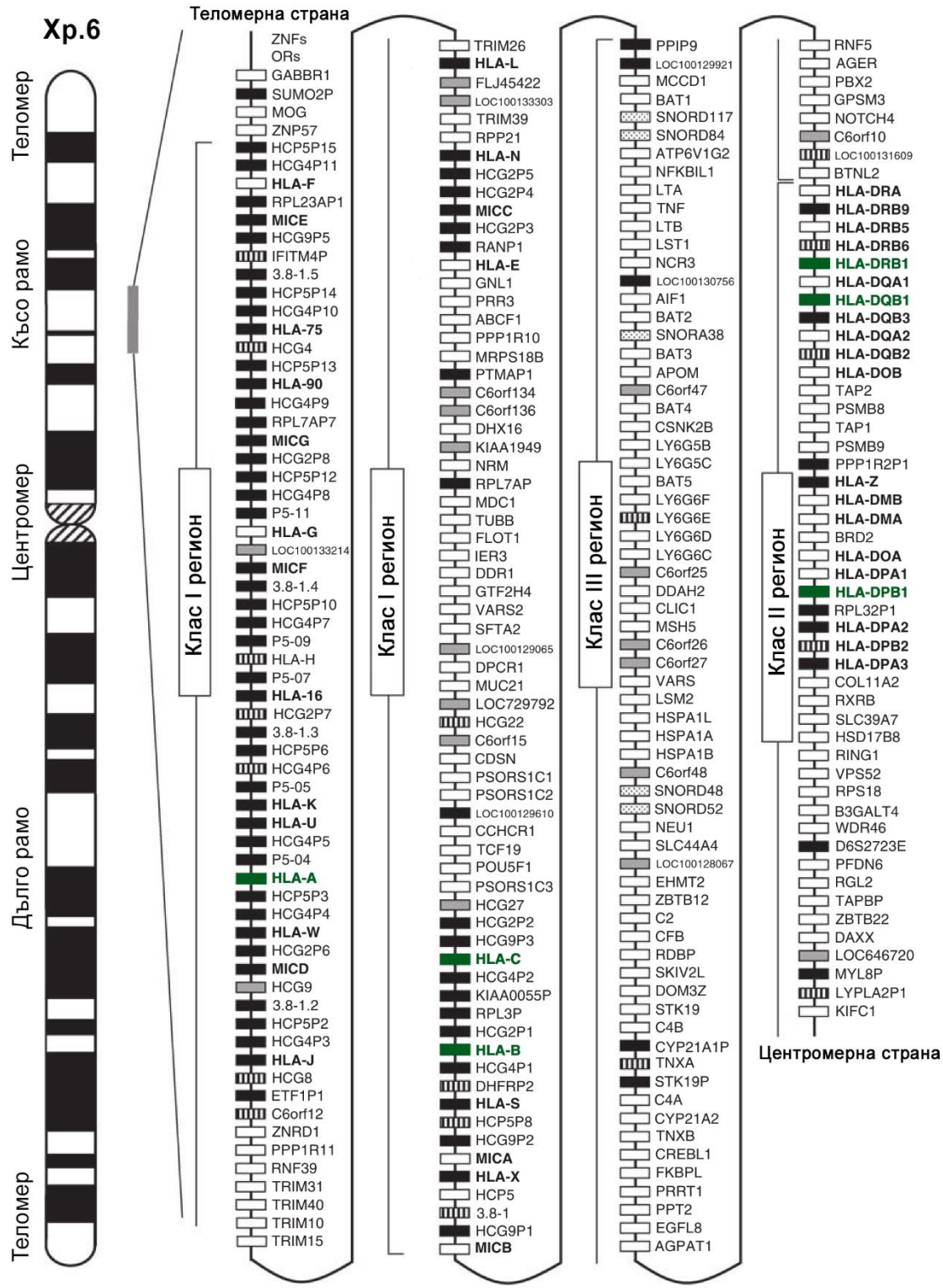
унищожават таргетните клетки с дефицит на HLA молекули, които са Т-клетъчно резизстентни [5]. Необходимо е да се дефинират тези HLA-дефицитни туморни клетки, особено когато съществуват хетерогенни популации в туморните тъкани. Именно хетерогенността на клетъчните популации в първичните тумори и генерирането на множество варианти с различни HLA фенотипи, селектирани по време на метастазна колонизация [6], води до затруднения и предизвикателства при разработването на ефективни и целенасочени терапии [7].

Степента и типът на HLA генно-експресионните профили все още не са дефинирани изцяло и трябва да се изяснят в контекста на нормалната физиология, както при хроничните и инфекциозните заболявания [8]. *HLA* геномният регион е включен в глобалните системи за анализ, чиято цел е съхраняването и разпространяването на данни на протеомно, транскриптомно, метаболомно и фенотипно ниво, както и имунни пътища, единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), инсерции и делеции и микросателити като геномни маркери или хаплотипни тагове за статистически анализ [9]. Полето за HLA геномни изследвания продължава да се разширява, заедно с разработването на нови методи и проучвания, за доизясняването на HLA генните взаимодействия и техните ефекти върху заболяванията при човека.

I. Главен комплекс за тъканна съвместимост при човека (HLA)

1. Генетична организация на HLA системата

HLA гените са разположени върху късото рамо на шеста хромозома, в дисталната част на 6p21.3 ивицата, и обхващат над 4 Mb от ДНК. Гените са повече от 220 и се разделят в три области според структурата и функцията на кодираните от тях молекули [10] (Фиг. 1).



Фиг.1. Геномна карта на HLA региона. Регионът е разделен на субрегиони - клас I, клас III и клас II. С бяло, сиво и раирано са обозначени: експресирани гени, гени кандидати, не кодиращи гени и псевдогени; със зелено - класическите HLA гени. Адаптирана по Shinna T., 2009 [8].

HLA клас I и клас II областите кодират полиморфни мембранни гликопротеини, които участват в антигенното представяне на Т лимфоцитите, чрез който процес се предизвиква имунен отговор. Клас III областта съдържа около 62 гена, част от които кодират белтъци участващи в имунния и възпалителен отговор (някои компоненти от системата на комплемента, цитокини и белтъци на топлинния шок) [11]. В HLA региона са установени и тандемни повтори - микросателити. Днес са известни около 300 микросателита, разположени приблизително през 2.4 Kb. Дължината им варира от динуклеотиди до пентануклеотиди. Със значителен полиморфизъм (5 или повече алела) се характеризират 54.3% от микросателитите [12].

HLA клас I областта е разположена телометрично и в нея са включени трите класически HLA клас I гени (*HLA-A, -B* и *-C*), кодиращи α веригите на класическите клас I високо полиморфни молекули (Ia), играещи централна роля в адаптивния имунитет. В тази област са включени и некласически клас I гени (*HLA-E, -F, -G*), кодиращи тежките вериги на некласическите клас I молекули (Ib), характеризиращи се с ограничен полиморфизъм [13].

Всяка HLA-Ib молекула е специализирана и има определена протективна имунна функция и поради тази причина, представянето на пептиди е по-ограничено. Друга съществена разлика между класическите и некласическите HLA клас I молекули е, че първите се експресират повсеместно, а експресията на вторите е тъканно ограничена и възниква веднага след сигнал от клетките, целящи да се скрият от имунната система [14].

Клас I областта включва и два клас I верижно свързани гена - *MICA* и *MICB*. Те имат ограничена експресия само в епителни клетки и фибробласти и се характеризират със значителен полиморфизъм. Клас I некодиращите последователности включват 12 клас I псевдогена (*H, J, K, L, N, P, S, T, Y, V, W, Y*) и 3 клас I свързани псевдогена (*MICC*, *MICD* и *MICE*) [12].

Клас II областта (*HLA-D*) е разделена на няколко подобласти - DP, DQ, DR, всяка от които съдържа поне по една двойка гени - *A* и *B*, кодиращи α и β веригите на клас II молекулите. Описани са още три субрегиона - DO, DN и DM. *DMA* и *DMB* гените притежават около 30% секвенционна идентичност с класическите клас II гени и кодират хетеродимер, който участва при свързването на пептиди с класическите клас II молекули [15]. Предполага се, че *DNA* (*DOA*) и *DOB* гените регулират свързването на пептиди към

клас II молекулите [16]. В клас II региона е открита и група от 4 гена (*LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*), чиито продукти участват в преработването на антигени, представяни от класическите клас I молекули. Продуктите на *TAP1* и *TAP2* гените формират хетеродимерен аденозин трифосфат-свързващ белтък преносител, който осъществява пренос на пептиди от цитозола към лумена на ендоплазматичния ретикулум. *LMP2* и *LMP7* кодират белтъци, които участват във формирането на протеазомните комплекси. *TAP-A* е ген, разположен на 80 Kb центромерно от *DP* гените. Той кодира трансмембранен белтък, който принадлежи към имуноглобулиновата суперфамилия и е важен за свързването на класическите клас I молекули към TAP преносителя [17].

Гените на HLA системата са свързани помежду си и се унаследяват под формата на хаплотип. Всеки индивид унаследява по една хромозома от двамата родители и не може да притежава повече от два алела от всеки локус. Алелите от съответните локуси се експресират „кодоминантно". В някои случаи се получава прекръстосване (crossing-over), в резултат на което се унаследяват клас I локуси от единия и клас II локуси от другия родителски хаплотип [12].

Според Vogel и Motulsky, някои HLA алели са в един и същ хаплотип по-често, отколкото се очаква според индивидуалните алелни честоти в популацията [18]. Lewontin и Kojima въвеждат термина неравновесна връзка (LD), който означава неслучайна асоциация на два алела в два или повече локуси [19]. Терминът LD се използва и за гени, локализирани в други хромозоми, които сегрегират независимо в една популация [19].

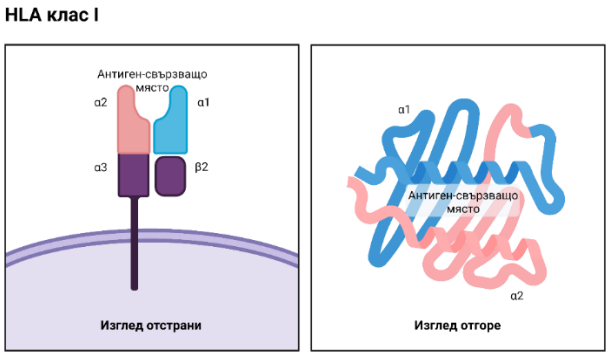
2. HLA клас I и клас II антигени

HLA системата е открита при търсене на детерминанти върху белите кръвни клетки, подобни на кръвно-груповите, които са от значение при трансплантация [20, 21]. HLA системата е серия от антигени, дефинирани чрез комбинация от серология, генетика и обширен статистически анализ. Ролята на HLA системата в контрола на имунния отговор е от основно значение, тъй като генетичният регион кодира двете големи групи клетъчно повърхностни гликопротеини, които медиират функционалните взаимодействия между клетките на имунната система.

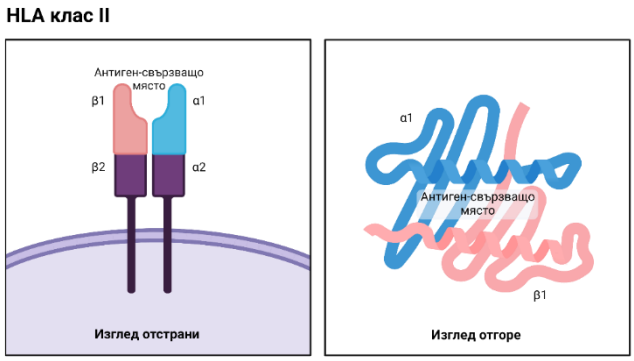
HLA клас I молекулата е хетеродимер, експресиран върху всички ядрени клетки. Изграден е от α верига с три домена: (α_1 - α_3) и β_2-микроглобулин, нековалентно свързан с α

веригите (Фиг. 2). При хората са известни над 16 000 HLA клас I алела [22], кодирани от гените на тежката верига HLA-A, HLA-B и HLA-C. β_2-микроглобулинът се кодира от различен локус на хромозома 15. Антиген-свързващото място на HLA клас I молекулата е изградено от α_1- и α_2- домените, които формират затворен свързващ джоб и свързват с предимство пептиди с дължина от 8 до 10 аминокиселини (АК) [23].

HLA клас II молекулите са структурно различни от HLA клас I молекулите. За разлика от експресията на HLA клас I, HLA клас II молекулите се експресират само върху професионални антиген представящи клетки (APC), като дендритни клетки, макрофаги и B лимфоцити. HLA клас II молекулата е хетеродимер, изграден от една α-верига (субединици α1 и α2) и една β-верига (субединици β1 и β2), а отвореният пептид-свързващ джоб е изграден от α1 и β1 субединиците (Фиг. 3). Морфологията на HLA клас II отворения джоб позволява свързването на пептиди с дължина 12-20 АК, тъй като остатъците на антигена могат да се разположат свободно от която и да е страна на пептид-свързващата бразда [24].



Фиг. 2. Схематична структура на HLA клас I антигените. Адаптирана по "MHC Class I", от BioRender.com (2022). Източник: https://app.biorender.com/biorender-templates



Фиг. 3. Схематична структура на HLA клас II антигените. Адаптирана по "MHC Class II", от BioRender.com (2022). Източник: https://app.biorender.com/biorender-templates

3. Антигенно представяне

Пътят, по който антигенът се превръща в разтворима форма за Т-клетъчно разпознаване, е известен като антигенно процесиране и представяне (Фиг. 4). Т клетките се развиват в тимуса преди да мигрират в периферията, където се активират чрез HLA органичено антигенно разпознаване. Т лимфоцитите се характеризират с експресия на клъстер на диференциация 3 - CD3 и Т клетъчен рецептор (TCR). Разнообразието в Т клетъчния репетроар се дължи на соматична рекомбинация - VDJ рекомбинация. Дефинирани са четири различни подтипа Т клетки: цитотоксични Т клетки ($CD8^+$), Т хелперни клетки ($CD4^+$), NKT клетки и γδ Т клетки [24].

HLA клас I пътят е фокусиран основно върху представянето на белтъци, синтезирани от самата клетка (включително белтъци от патогени в заразените клетки) на $CD8^+$ Т клетки, а клас II HLA пътят се концентрира върху извънклетъчни вещества навлизащи в APC и ги представя на $CD4^+$ Т клетки. Разликата между представянето на вещества, синтезирани от APC и процесирането и презентирането на външни антигени, не е абсолютна [24].

Антигенното процесиране и представяне и при двата пътя може да се раздели на 6 отделни стъпки: (1) установяване на антиген, (2) маркиране на антигена за унищожаване, (3) протеолиза, (4) доставяне на пептиди до HLA молекулите, (5) свързване на пептиди за HLA молекулите и (6) представяне на пептид-свързаните HLA молекули на клетъчната повърхност [25].

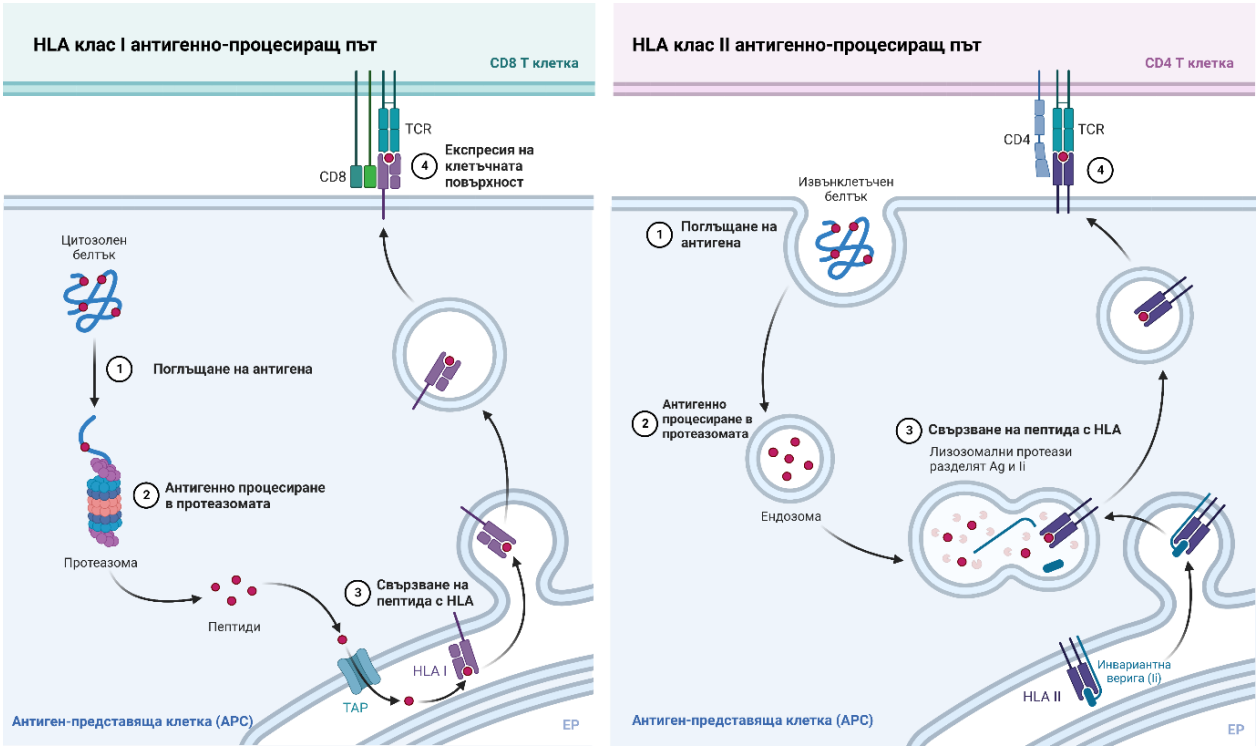
HLA клас I рестрицираните пептиди са с ендогенен произход и поемат по протеазомния път [26]. След установяването на неправилно нагънат белтък, той се маркира за унищожаване чрез полиубиквитинилиране (строго регулирана ковалентна модификация). Следва унищожаване чрез протеолиза в протеазомите. Протеазомата е протеаза, която свързва субстратите и без освобождаване на междинни продукти произвежда пептиди в размер от 3 до 20 АК. По време на възпалителния отговор и при отговор на интерферон γ, трите каталитично активни β субединици (β1, β2, β5) на протеазомата могат да се заменят от три имуноспецифични субединици: β1i, β2i и β5i, които се кодират от *HLA*. В резултат на тази замяна се генерира имунопротеазома, която определя средната дължина на произведените пептиди, както и местата за рязане. Прекурсорните пептиди се транспортират чрез TAP транспортер в ендоплазмения ретикулум (ЕР). TAP

комплексът е член от семейството на ABC суперфамилията на аденозин трифосфат (АТФ) енергийните помпи, той свързва пептиди на цитоплазмената повърхност на ЕР и чрез свързване на АТФ и хидролиза ги пренася в ЕР. Гените, кодиращи TAP1 и TAP2 субединиците, които изграждат TAP комплекса, са локализирани в HLA региона [25].

Новосинтезираните α_1 домени на HLA I молекулата са в комплекс с шаперона калнексин, което възпрепятства HLA I α_1 домените да напуснат ЕР. След свързването на β_2-m, HLA I α_1 домените се освобождават от калнексина и формират пептид натоварващия комплекс, който включва шаперона калретикулин, тапазин и аминопептидази свързани с ЕР, които скъсяват пептидите по-дълги от 10 АК. При успешно пептидно натоварване, HLA клас I пептидният комплекс се освобождава от пептид-натоварващият комплекс и се трансортира във везикули, получени от апарата на Голджи, до клетъчната повърхност, където се разпознава от $CD8^+$ Т клетки [25].

Дендритните клетки са способни на крос-представяне (кръстосано представяне) на пептиди, въпреки че представените пептиди върху HLA клас I молекулата обикновено произлизат от белтъци с ендогенен произход [27]. Процесът на крос-представяне описва представянето на екзогенни пептиди на HLA клас I молекулите. Смята се, че дендритните клетки са способни на крос-представяне на пептиди, поради адаптация на техните ендоцитни и фагоцитни пътища [28].

Пептидите, представени на HLA клас II молекулите, най-често са получени от екзогенни антигени, които се обработват в лизозомите. HLA клас II α и β - веригите се сглобяват в ЕР, свързани с Ii - инвариантна верига за предотвратяването на пептидно свързване. HLA клас II комплексът с инвариантната верига се транспортира във везикула към цитоплазмата. Тя се свързва с лизозоми от MHC клас II натоварващ комплекс (MIIC). В MIIC, инвариантната верига се разцепва на клас II свързан Ii пептид (CLIP), поради ниското pH в лизозомата, и се заменя от антигенен пептид с екзогенен произход, с помощта на шаперона HLA-DM. Пептид-натоварващите HLA клас II молекули се транспортират с везикули към клетъчната мембрана, където пептидите свързани за HLA клас II се разпознават от $CD4^+$ Т клетки [29].



Фиг. 4. Антигенно процесиране и представяне на HLA клас I и клас II молекулите. Адаптирана по "MHC Class I and II Pathways", от BioRender.com (2022). Източник: https://app.biorender.com/biorender-templates

4. HLA полиморфизъм

HLA гените са силно полиморфни. Те имат множество алели, които се различават едни от други поради замени в АК остатъци, участващи в структурата на пептид-свързващите джобове. Това разнообразие от алели води до различен имунен отговор сред индивидите [30]. Броят на различните фенотипи, които са възможни след комбинация на известните HLA алели, е по-голям от популацията на Земята [31]. IPD-IMGT/HLA базата данни 3.56.0, от март 2024 г., сочи, че огромният полиморфизъм на HLA молекулите се състои от 39.886 алела (http://hla.alleles.org/alleles).

Въпреки високия полиморфизъм, специфични хаплотипи се срещат с висока честота в определени популации [31]. Това се дължи на LD - множество алели от различни HLA локуси са представени по-често от очакваното случайно разпределение, унаследяват се на блокове (хаплотипи), вариращи при различните етнически групи [30].

5. HLA номенклатура

Името на всеки HLA алел има уникален номер с най-често до четири двойки цифри, разделени с двоеточие (фиг. 5) [12].

В допълнение на уникалното алелно число, има суфикси, които обозначават експресионния статус. Алелите, които не се експресират, са „нулеви“ алели със суфикс ‘N’. Алелите, които се експресират алтернативно, имат суфикс ‘L’ (понижен), ‘S’ (секреторен), ‘C’ (цитполазмен), ‘A’ (нетипичен) или ‘Q’ (неизяснен) [10].

Секвенциите на всички известни до момента и формално приети от Номенклатурния комитет алелни варианти, за факторите на HLA системата, при Световната Здравна Организация (СЗО), се съхраняват в IMGT/HLA секвенционна база данни (www.ebi.ac.uk/imgt/hla).



Фиг. 5. HLA номенклатура. Адаптирана и прерисувана от https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html [10]

6. HLA типизиране

Първите разработени методи за HLA типизиране се основават на фенотипно определяне. По-късно навлиза приложението на молекулярно-биологичните методи, като полимеразна верижна реакция (PCR) от типа real-time, секвенционно специфични олигонуклеотидни сонди (SSOP) и класическо Sanger секвениране (sequence based typing – SBT). HLA полиморфизми са установени за първи път в регионите, които кодират антиген-свързващите домени на класическите *HLA* гени (*HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1*) [31, 32]. В продължение на дълги години в лабораториите за тъканно типизиране се е прилагал серологичният метод [33].

Голяма част от HLA лабораториите прилагат PCR със секцвенионно специфични праймери (PCR-SSP), real-time PCR и SSOP. Тези молекулярни методи позволяват много по-голяма резолюция на HLA типизиране и предоставят информация на ниво АК разлики [32]. При PCR-SSP метода се използва панел от праймерни смеси, всяка от които съдържа двойка праймери, чиито 3' краища съвпадат напълно с последователността на даден алел или група алели. Амплификация се наблюдава само при пълно съответствие на двойката алели или на групово-специфичните праймери и матрицата. Пост-амплификационните процеси включват разделяне на амплификатите чрез агарозна гел електрофореза и визуализиране чрез флуоресцентно багрило [34].

SSOP методът използва специфични олигонуклеотидни сонди, свързани към флуоресцентно маркирани микросфери, за определяне на HLA специфичността на изследвания пациент. Отчитането се извършва на апарат Luminex (Luminex Corp., USA), посредством флуоресценцията на фикоеритрин (PE), на всяка популация микросфери. Определянето на HLA специфичността става спрямо позитивните реакции и публикуваната номенклатура на HLA алелите [34].

PCR-SBT методът се основава на PCR амплификация, последвана от директно автоматизирано ДНК секвениране и флуоресценция за детекция. Таргетните гени се амплифицират и получените PCR ампликони се пречистват ензимно със смес от хидролитичните ензими екзонуклеаза I и алкална фосфатаза (ExoSAP), с цел отстраняване на несвързани PCR праймери и динуклеотидни трифосфати (dNTP). Пречистеният ДНК ампликон се използва в последващата секвенционна реакция, при която се добавя смес от праймери, включваща дидеоксинуклеотидни трифосфати (ddNTP). Всички ДНК секвенции се детектират чрез автоматизиран ДНК секвенатор (Sanger секвенатор) и данните се анализират с помощта на софтуерна програма за алелно типизиране [35].

PCR-SBT методът се смята за „златен стандарт" до ден днешен, но въпреки това чрез този метод не може да се разреши проблемът с възникването на неразграничими алелни комбинации, тъй като се секвенират екзонни области от класическите HLA клас I (най-често екзони 2, 3 и 4) и клас II (най-често екзони 2 и 3) гени и не може да се определи ориентацията на секвенираните фрагменти [35].

Секвенирането от следващо поколение (NGS – next generation sequencing) се прилага в HLA лабораториите от 2015 година, най-често за типизиране на донори и пациенти, за

подготовка на трансплантации на хемопоетични стволови клетки [32]. Основните предимства на NGS технологиите пред класическото Sanger секвениране са високата разграничителна способност и голяма производителност [36]. Разработени на редица методи за HLA типизиране чрез NGS, част от които са PCR-базирани, включващи първоначална стъпка на амплификация (част от протокола за подготовка на ДНК библиотека). Дълговерижният PCR NGS метод позволява секвенирането на целия *HLA* ген, включително интроните, нетранслираните региони, upstream и downstream регионите, което осигурява типизиране с висока разграничителна способност и висока производителност. Въпреки предимствата на PCR базираните NGS технологии пред SBT, те притежават и недостатъци, като отпадане на алели и алелен дисбаланс, които настъпват по време на PCR стъпката [32].

Разработените NGS методи за HLA типизиране, използващи улавяне на фрагменти и последваща хибридизация (т.нар. hybrid capture технология), не включват стъпка на дълговерижен PCR, чрез което избягват получаването на PCR артефакти, подобрен е алелният баланс и се понижава нивото на отпадане на алели [37].

Въпреки изброените предимства на NGS технологията остава проблемът с „фазирането“ на целите HLA клас I и клас II хаплотипи. Този проблем е разрешен с внедряването на технологията за секвениране от трето поколение, основаваща се на секвениране на единични молекули. Тя позволява бързо секвениране на дълги последователности – до 100 kbp [38].

Нивата на експресия на *HLA* гените могат да имат важна роля при патогенезата на заболяванията, поради което е необходима детекцията на малки нуклеотидни варианти (SNV), инсерции и делеции, локализирани извън екзоните. За тази цел са необходими анализи определящи HLA на транскрипционно ниво, което включва молекули-таргети на HLA и регулаторни елементи съдържащи места за свързване на транскрипционни фактори. РНК секвенирането има редица предимства пред настоящите ДНК-базирани методи, като дава информация за целия транскриптом и експресията на HLA. Лимитаця е липсата на интронна информация и микроРНК. МикроРНК регулира експресията на *HLA* по различен начин, включително при ракови и други заболявания [32].

Бъдещето на HLA типизирането включва реализирането на целите на „персонализираната медицина”, чрез изследване на HLA системата на омикс ниво.

II. Ракови заболявания и HLA

1. HLA генетични полиморфизми при раковите заболявания

HLA генетичните полиморфизми се асоциират с рак, автоимунни заболявания и инфекции. Полиморфните HLA молекули оказват влияние на способността на имунната система да детектира туморни клетки и да ги унищожава. HLA асоциациите с рака нямат пряка връзка с клиничното значение, но могат да спомогнат да последващи изследвания на адаптивния имунен отговор срещу рака [39].

HLA алелната честота варира сред популациите и поради тази причина се налага асоциативните изследвания за връзката между HLA полиморфизмите и заболяванията да са популационно специфични [39]. Всеки HLA алел има способността да представя лимитиран репертоар от пептиди, получени от „собствени“ и „чужди“ белтъци [40]. Поради ролята на HLA молекулите при представянето на туморните антигени, HLA може да се използва като маркер за податливост и контрол на заболяването [41]. Полиморфизмите в некодиращите промоторни региони на *HLA* гените могат да окажат влияние върху експресията на различни алели. Това може да представлява механизъм, който определя индивидуланите различния в ефикасността на антигенното представяне на Т клетките. Наличието на асоциации на заболявания с едни и същи HLA алели, сред различни популации, индикира че полиморфизмите най-вероятно са важни при патогенезата на тези заболявания. Като се вземе впредвид и имунното редактиране по време на развитието на рака, някои индивиди унаследяващи специфични алали или хаплотипи, могат да са свързани с предразположение или протекция спрямо специфични видове рак [42]. Таблица 1 обобщава установените до момента асоциации на различни видове солидни тумори с HLA алели и/или хаплотипи.

Честа неоплазия, с нарастващ брой диагностицирани през последното десетилетие, е рака на кожата (меланом и немеланомни форми). Не-меланомният рак на кожата (Non-melanoma skin cancer – NMSC) бива базален клетъчен карцином (Basal cell carcinoma – BCC) и плоскоклетъчен карцином (Squamous cell carcinoma – SCC). Други типове рак на кожата са класифицирани според първоначалния тъканен произход. NMSC възниква във всички области на света и засяга всички раси. HLA се асоциира с развитието на този тип рак, въпреки че конкретните механизми все още не са напълно известни [43]. Bonamigo и

сътрудници откриват позитивна асоциация между HLA-DQB1*03:01 и повишаването на риска от развитие на меланом при американски пациенти [43]. Lombardi и сътрудници изследват италианската популация, където също е установена повишена честота на HLA-DQB1*03:01 алела при пациенти с меланома, в сравнение със здрави контроли [43]. При японска полулация на пациенти с меланом, Luli и сътрудници установяват HLA-DQB1*03:02 като предразполагащ алел и DQA1*01:01/01:04 и DQA1*04:01 като протективни [43]. HLA-DQB1*03:03 е установен с повишена честота при пациенти от британската популация, а при италиански пациенти е повишена честота на DQB1*05:01 [43].

Установено е че при пациенти с карцином на сливиците и основата на езика, които са позитивни за човешки папилома вирус (human papilloma virus – HPV), протичането е по-леко, в сравнение с HPV негативните тумори (80% срещу 40% 5 годишно оцеляване, при лечение с радиотерапия). Tertipis и сътрудници анализират HPV и HLA-A*02 като прогностични фактори за рака на сливиците и основата на езика. Те стигат до заключението, че липсата на HLA-A*02 е благоприятен прогностичен фактор при пациенти с HPV-позитивни тумори [44].

Таблица 1. Описани асоциации на HLA със солидни тумори

Солидни тумори	**Предразполагащи и протективни HLA алели**	**Литературни източници**
Рак на кожата	DQB1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*03:03, DQB1*05:01 DQA1*01:01/01:04, DQA1*04:01	[43]
Рак на сливиците и основата на езика	A*02	[44]
Рак на хранопровода	A*11 DRB1*15:01, DQB1*03:01	[45] [46]
Назофарингеален карцином	DRB1*03, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*01	[47]
Хепатоцелуларен карцином	DRB1*07, DRB1*12, DRB1*11	[48, 49]
Рак на стомаха	DQB1*03:01, DQB1*06:02	[50, 51]

	DRB1*04, DQA1*01	
Рак на дебелото черво	DQB1*02	[52]
Рак на гърдата	DRB1*03, DRB1*04, DRB1*13, DQB1*02, DQB1*03, DQB1*06, DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01 DQB1*06:02, DQA1*03:01, DQA1*05:05	[42, 53, 54]
Рак на шийката на матката	B*07, DRB1*07, DQB1*02, DQB1*03	[55, 56]

Карциномът на хранопровода е сред десетте най-чести агресивни форми на рак. Сред рисковите фактори са генетичните полиморфизми, генните мутации и/или хромозомната нестабилност като загуба на хетерозиготност. При изследване на Hu и сътрудници, HLA-A*11 е установен като алел, предразполагащ към развитието на карцином на хранопровода [45]. При изследване на Hu J., HLA-DRB1*15:01 и HLA-DQB1*03:01 са установени като предразполагащи алели за развитието на плоскоклетъчен карцином на хранопровода (Esophageal squamous cell carcinoma – ESCC) в китайската популация. Изследването предполага, че тези алели могат да повлияят имунния отговор към туморите и HPV кодираните епитопи [46].

Yang и сътрудници провеждат мета анализ, за да определят връзката между HLA-DRB1 полиморфизмите и назофарингеалния карцином (Nasopharyngeal cancer – NPC), като резултатите показват, че четири HLA алела са силно предразполагащи към заболяването - HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*09 и HLA-DRB1*10, докато HLA-DRB1*01 има протективен ефект [47].

Хепатоцелуларният карцином (hepatocellular carcinoma - HCC) е третата най-честа причина за смърт при раково болни в световен мащаб, с около 600 хиляди пациента с летален изход от заболяването и най-честият рак на черния дроб. Lin и сътрудници провеждат мета анализ, който предполага, че HLA-DRB1*07 и DRB1*12 алели са предразполагащи за заболяването, най-вече при азиатската популация [48].

Ракът на стомаха (Gastric cancer – GC) също е често раково заболяване в световен мащаб. Пет годишното оцеляване при GC е сравнително понижено. HLA полиморфизмите

могат да повишат риска от развитие на рак на стомаха, най-вече ако се съчетава с инфекция с конкретен щам на бактерията *Helicobacter pylori,* характеризиращ се с повишен възпалителен отговор [50]. Kocak и сътрудници изследват ролята на HLA при рака на стомаха при пациенти с *H. pylori* инфекция от тайванската популация. HLA-DQB1*06:02 е предразполагащ за рак на стомаха при мъже от тайванската популация, докато HLA-DQB1*03:01 е протективен, най-вероятно поради резистентност към инфекция с *H. pylori* [51].

Kocak и сътрудници установяват, че HLA-DQA1*01 и HLA-DQB1*06 са предразполагащи за рак на стомаха. Въпреки това, DRB1*04 алелът е с предполагаема протективна роля [51]. Tong и сътрудници установяват, че алелът HLA-DQB1*02 е предразполагащ за развитието на колоректален рак [52].

Ракът на гърдата е един от най-смъртоносните видове малигнени заболявания при жените. Възрастта, фамилната история, излагането на ендогенни и екзогенни хормони, диетата, и факторите на околната среда се свързват с риск от развитие на рак на гърдата [53]. Gun и сътрудници установяват, че HLA-DRB1*03, HLA-DQB1*02, HLA-DRB1*13 и HLA-DQB1*06 алелите са свързани с добра прогноза, а HLA-DQB1*03 и HLA-DRB1*04 са предразполагащи [53].

Harrath и сътрудници изследват тунизийски пациенти и установяват негативна корелация с HLA-DRB1*07-DQB1*02 и развитието на рака на гърдата [42]. При изследване на Mahmoody M. на ирански пациенти, HLA-DQA1*03:01 алелът е установен като предразполагащ за развитието на рак на гърдата, а HLA-DQB1*06:02 има протективна роля срещу ранното възникване на заболяването. Освен това, те установяват че HLA-DQA1*05:05 и HLA-DQB1*06:02 алелите са свързани с протективната роля срещу заболяването при по-младите пациенти. Също DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01 е установен с повишена честота при пациенти с ранно развитие на рак на гърдата [54].

Qui и сътрудници установяват HLA-B*07 като високо рисков алел при рак на шийката на матката със силен потенциал за включването му като молекулярен биомаркер [55]. В друго изследване на Zhang и сътрудници установяват, че HLA-DRB1*07, HLA-DQB1*02 и HLA-DQB1*03 са предомонантни алели при жени с *HPV16* инфекция със средна или тежка форма на рак [56].

В таблица 2 са представени няколко хематологични неоплазии и асоциацията им с HLA алелели.

Таблица 2. HLA алели, асоциирани с хематологични неоплазии

Хематологични неоплазии	**Асоциирани HLA алели**	**Литературни източници**
Болест на Ходжкин	DPB1*03:01, DPB1*04:01, DPB1*09:01	[57]
Остра лимфобластна левкемия	DPB1*02, DPB1*05	
Лимфом на Бъркит	A*01, B*12, DR*07	
Т-клетъчен лимфом, свързан с ентеропатия	DQB1*03, DQA1*05:01, DQA1*02:01	
Хронична лимфоцитна левкемия	A*02:01, DRB4*01:01, DRB4*01:01-DRB1*07:01-DQB1*03:03	[58]
Мултиплен миелом	B*15-C*04, B*38-C*12, DRB3*02-DRB1*11-DQB1*02, B*07, B*44, B*58, C*05, C*07, DRB5*01	[59]
Дифузен В-едроклетъчен лимфом	B*44, DRB1*01	[60]

2. Роля на експресията на класическите HLA клас Ia и Ib молекули

Възникването на HLA клас I антигенни нарушения е един от главните механизми за имунно избягване на човешките ракови клетки от разпознаване и унищожаване от имунната система. Нарушенията в експресията на HLA клас I молекулите имат клинично значение. Те са свързани с лоша прогноза при много видове малигнени заболявания. Има данни и за развитие на резистентност към Т-клетъчно-базирани имунотерапии, в резултат на нарушена експресия, регулация и/или функции на HLA [61-64].

Установеното високо ниво на соматични мутации в *HLA* гените влияе силно на функциите на HLA молекулите. Най-добре изследвани са нарушенията в тежката верига на HLA клас I (HC - heavy chain) и β_2-m експресия при различни видове тумори, последвана от TAP1 и TAP2 субединиците и tpn. За разлика от това, експресията на протеазомните

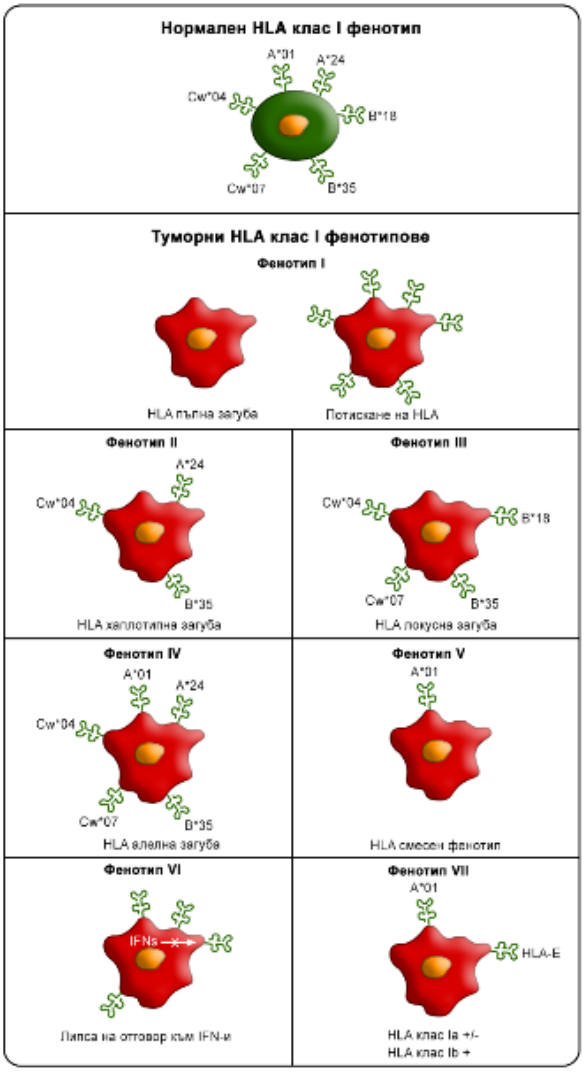
субединици LMP2 и LMP7, и шапероните калнексин, калретикулин и ERp57, е изследвана в по-ограничена степен при ракови заболявания [64].

Shukla и сътрудници изказват хипотеза, че мутациите на HLA със загуба на функция най-вероятно възникват в резултат на селективен натиск от страна на имунния отговор на гостоприемника срещу тумора. Установени са 7 фенотипа на нарушена HLA експресия при туморни клетки (Фиг. 6). Те включват пълна загуба на експресията на HLA клас I молекули или селективната загуба на една или повече специфичности [65, 66].

HLA клас I има прогностична значимост при пациентите с ракови заболявания, тъй като има водеща роля при имунното разпознаване на антигенни клетки. Някои изследвания подчертават важната роля на NK клетките, при елиминирането на клетки с липсваща експресия на HLA клас I молекули. Потиснатата експресия на HLA клас I се свързва с по-добро оцеляване при пациенти с колоректален рак [67] и увеален меланом (на окото) [68]. Други изседвания предполагат по-добър изход при понижена HLA клас I експресия при рак на гърдата [69] и на простатата [70]. Туморните клонове с HLA дефицит избягват Т-клетъчния отговор, но са по-податливи на NK клетъчно-медииран лизис.

Инхибирането на NK клетъчните отговори от HLA клас I молекули е добре установено, но тумор-асоциираните лиганди на активиращите NK клетъчни рецептори са почти изцяло неизвестни. Изключение са HLA клас I-свързаните лиганди на C-тип лектиновия рецептор NKG2D. NKG2D активира NK клетките и преодолява инхибиращите сигнали от HLA клас I молекулите [71].

Скорошни изследвания предполагат, че експресията на некласическите HLA Ib молекули може да се използва като туморен маркер, тъй като тяхната експресия е повишена в туморната микросреда. Механизмите на тумор-медиираната имуносупресия все още не са добре изяснени и са в основата на множество изследвания. Наличието на некласически HLA клас Ib молекули предполагат по-лоша прогноза и подсказва важната роля на тези молекули при имунната регулация и възникването на раково заболяване [14].



Фиг. 6. Туморни HLA клас I фенотипове. Адаптирана по Ormandjieva A., 2020 [72]

3. Роля на експресията на класически HLA клас II молекули при тумори

HLA клас II антигенната експресия води до специфични имунни отговори към туморните антигени, а клиничното протичане се повлиява в зависимост от типа на раковото заболяване. Честотата на експресия на HLA клас II антигените също варира според вида на раковото заболяване. При някои липсва HLA клас II експресия, което може да се дължи на структурни дефекти или нарушена регулация, засягаща различни компоненти на HLA клас II антиген процесиращия апарат и/или от липса на цитокини в туморната микросреда. До сега са описани пет различни HLA клас II фенотипа при човешки тумори, които се характеризират със (1) силна цитокин-независима хомогенна свръхекспресия, (2) тотална

липса на експресия, (3) потискане, (4) нарушена индукция на интерферон гама (IFNγ). Молекулярните механизми, медииращи селективната липса или потискане на конститутивната, както и IFNγ – медиираната свръхрегулация на HLA клас II антигените на малигнени клетки, са характеризирани в ограничена степен. Те се дължат основно на структурни нарушения от епигенетична, транскрипционна и пост-транскрипционна регулация на HLA клас II молекули и/или компоненти от антиген процесиращия апарат и възникнала геномна нестабилност [73]. Освен това, функцията на гените, кодиращи IFNγ, както и компонентите на IFNγ сигналния път, който регулира HLA клас II антигенната експресия, може да е нарушена в резултат на няколко механизма. Те включват или генно-инактивиращи мутации, генно замлъкване чрез метилиране на промоторите, потискане на транскрипцията или пост-транскрипционни нарушения, като нарушен профил на фосфорилиране [74-77].

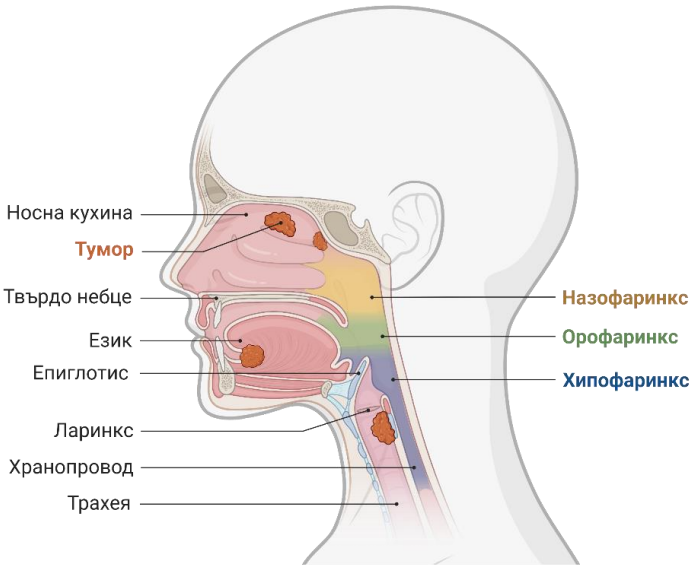
Ролята на HLA клас II антигенната експресия от тумори и клиничното значение остават противоречиви и изглежда, че зависят от туморния тип, включително генетичната му детерминираност. Има нарастващи доказателства, че HLA клас II антигените при туморни клетки оформят специфичния антитумурен имунен отговор срещу тумор асоциираните антигени, което е предпоставка за включването на HLA клас II антигените като нов терапевтичен таргет. Все още има много отворени въпроси, които трябва да бъдат изяснени, за да може напълно да се характеризира функцията на HLA клас I и клас II антигените при тумори [78].

III. Плоскоклетъчен карцином на главата и шията (HNSCC)

В световен мащаб, случаите на рак на главата и шията са приблизително 900 000 годишно, от тях 400 000 са смъртни случаи [79]. Мъжете са значително по-засегнати от жените, със съотношение вариращо от 2:1 до 4:1 [80].

Плоскоклетъчният карцином на главата и шията (head and neck squamous cell carcinoma - HNSCC) произхожда от епителните клетки на лигавицата на горните дихателни пътища и храносмилателния тракт (устна кухина, орофаринкс, ларинкс и хипофаринкс) (Фиг. 7). HNSCC започва развитието си от една клетка в един вид тъкан, но не представлява хомогенно заболяване. Значителната хетерогенност на HNSCC се дължи на сложността на

анатомичните структури, в които се развива и на разнообразната етиология и многобройните молекулярни промени, които участват в канцерогенезата [81].



Фиг. 7. Схематично представяне на рака на главата и шията. Адаптирана по "Types of Head and Neck Cancers", от BioRender.com (2022). Източник: https://app.biorender.com/biorender-templates

Основните рискови фактори за възникването на HNSCC са тютюнопушене и прекомерната консумация на алкохол. Инфекцията с високо рискови щамове на HPV също е причина за възникването на голяма част от тези тумори, основно в орофаринкса [82].

С изследването на експресията на гените, чрез секвениране на РНК, са характеризирани подгрупи на туморите на главата и шията [83]. Класификацията на базата на експресионни профили все още не е обичайна практика при HNSCC. Въпреки това, експресионните профили са информативни от биологична гледна точка.

При голяма част от пациентите с HNSCC, туморът възниква *de novo*, но може да се образува и вследствие на предракови лезии на лигавицата - бели (левкоплакия) и червени (еритроплакия) области, видими с просто око. Възможно е тези лезии да се развият до инвазивен рак, като левкоплакията е най-честата предшестваща лезия на орофарингеалния плоскоклетъчен карцином (oropharyngeal squamous cell carcinoma - OPSCC) [84].

Загубата на хетерозиготност в хромозоми 3p, 9p и 17p възниква при дисплазия и има роля в началото на канцерогенезата, докато промените в 11q, 4q и 8p се наблюдават при карциноми и отразяват промените в по-късните стадии на канцерогенезата [85]. С

използването на тези генетични маркери може да се определи дали има нарушения в епителните клетки на лигавицата, от хирургически отстранен материал. Изследването на клетки от тази област е от значение за установяването на наличие на втори първичен тумор [81]. Най-добрите маркери на малигнена трансформация от левкоплакия [86] и хирургически отстранен материал [85], са генетични изменения в 3p, 9p и мутации в *TP53* гена (локализиран в 17p).

Канцерогенезата в лигавицата може да възникне и след натрупване на мутации в единична възрастна стволова клетка [87]. Нормалните възрастни стволови клетки или техните предшественици са кандидати за първоначалната трансформирана клетка, която образува клон от ракови стволови клетки (cancer stem cells - CSC) с характерните самообновление и плурипотентност [88].

Инфекцията с HPV при HNSCC, основно при орофаринкса, е важен рисков фактор за развитието на OPSCC. Освен при OPSCC, инфекция с вируса се наблюдава най-често и при плоскоклетъчен карцином на сливиците, основно в областта на гънките на сливиците [82]. Най-често срещаният HPV тип е HPV-16, причина за 83% от HPV позитивните OPSCC.

Структурата на туморната микросреда при HPV-позитивни тумори се отличава значително от тази на HPV-отрицателни тумори [89]. HPV-позитивните тумори имат по-високо ниво на тумор-инфилтриращите лимфоцити (TIL), в сравнение с HPV-отрицателните тумори. Пациентите с HPV-позитивни тумори с високи нива на TIL са с добър изход, докато пациентите с HPV-позитивни тумори и ниски нива на TIL са с изход сходен на този при пациенти с HPV-отрицателен HNSCC [90].

HNSCC избягват имунния надзор, чрез редица механизми. Туморната микросреда при HNSCC е богата на имуносупресивни растежни фактори и цитокини (интерлевкини – IL-6, IL-10; VEGF и TGFβ), които повишават активността на MDSC, T_{reg} клетки и M2 макрофагите и едновременно с това инхибират анти-туморните ефекти на T_{eff} и NK клетките [91]. IL-10 и TGFβ стимулират макрофагите да се преобразуват в имуносупресивния M2 фенотип [92]. Генетичните и епигенетичните измененения водят до понижени нива на HLA при туморните клетки и до дефекти в антигенното процесиране, което от своя страна води до понижено разпознаване и цитолиза на туморните клетки [93]. HNSCC в напреднал стадий са с повишена експресия на PDL1, който отслабва

цитолитичната активност на Т клетките. Подобно, MDSC и T_{reg} клетките, част от туморната микросреда, експресират PDL1 и други имуносупресивни молекули (CTLA4) [94].

Наблюдаваните мутации, предимно в *TP53* и *NOTCH1* гените, установени по време на проекта за изготвяне на атлас на раковия геном (The Cancer Genome Atlas Program – TCGA) [81], позволяват развитието на персонализираната медицина, с цел лечение на HNSCC. *PIK3CA* мутациите са чести и установяването им може да се използва за лечение с инхибитори на PI3K биохимичния път при HNSCC [95].

Мутационният профил на туморите при голяма част от пациентите с HNSCC не се изследва и определя, а мутационният товар, служещ като биомаркер за определяне на имунотерапия, не е напълно изяснен [96].

Транскриптомните анализи, базирани на единична клетка (single-cell), са метод, който започва да се използва при HNSCC, за дефинирането на разнообразната интратуморна експресия и различията между туморите от различни пациенти [97]. HNSCC е заболяване характеризиращо се с чести мутации, водещи до производството на неоантигени, които имат потенциал да спомогнат за разработването на имунотерапии.

Заключение

Изясняването на структурните и функционалните промени, които настъпват в туморната микросреда, ще спомогне за предотвратяването на избягването на тумора от имунната система и ще подобри ефикасността на различните имунотерапевтични стратегии. Важно е и разработването на стратегии за предизвикване на HLA клас I експресия, която ще доведе до отговор и отхвърляне на тумора от цитотоксичните Т лимфоцити [97].

Избягването на тумора от имунния отговор, чрез загубата на HLA клас I, е често срещан феномен, установен при хора и експериментални тумори. Локализацията на тумор-инфилтриращите лимфоцити при човека се асоциира с определена тъканна организация на тумора. В началото на Т-клетъчно медиирания имунен отговор, $CD8^+$ Т лимфоцитите навлизат в туморната тъкан и унищожават HLA-I позитивните туморни клетки (пермисивна Фаза I). Крайният резултат е образуването на тумор, състоящ се само от HLA клас I негативни клетки (Фаза II), които се унищожават от NK клетките. В тази фаза, Т лимфоцитите и други левкоцити/макрофаги се установяват извън туморното "гнездо“. Тази

тъканна структура осигурява биологична бариера между тумора и стромата (не-пермисивна Фаза II). Тази добре отграничена „тумор-паренхимна“ строма е идентифицирана отдавна, но до скоро не се е асоциирала със загубата на HLA клас I от туморните клетки [97].

Статусът на HLA-I експресията в туморните проби представлява „движещата сила“, която определя последващото развитие на тумора: дали ще настъпи Th1-медиирано отхвърляне на тумора, или ще се образува Th2-тип гранулома. Th1 клетките произвеждат тумор некротизиращ фактор алфа, IFN-γ, IL-2 и IL-12, които предизвикват антитуморен отговор. Th2 клетките произвежат IL-4 и IL-10 и спомагат за туморния растеж като инхибират имунната система на гостоприемника.

Поради жизнено важната роля на CD8 лимфоцитите в анти-туморния имунитет, усилията са насочени (един от механизмите за биологична терапия е) да се възстанови експресията на HLA-I молекулите и да се възпрепятства „имунологичното замлъкване“ на туморите“

Чрез софтуерни програми може да се предскаже афинитетът на свързване и на клас I, и на клас II неоепитопите. За момента, точността на тези програми е под въпрос, но въпреки това, те представляват критична първа стъпка при определянето на потенциални неоантигенни мишени. При първите клинични изпитвания при хора, с използването на персонализирани ваксини на базата на неоантигени, афинитетът към свързването на HLA е ключов критерий, за подбора на подходящи кандидати. HLA типизирането на пациентите помага за предсказването на отговора към инхибиторна терапия на chek-point инхибиторите. Освен това соматичните HLA мутации също са индикатор за отговора на пациента към терапията. Генотипът на пациента може да се използва за изработването на персонализирана антиракова ваксина, както и за откриване на имунотерапевтичен биомаркер. Поради тази причина, точното HLA типизиране е от съществена необходимост. Степента и типът на профилите на цялостната HLA координирана генна експресия, все още трябва да се изясни напълно при нормална физиология, възпаление, имунни и автоимунни отговори, хронични и инфекциозни заболявания. Геномното изследване на HLA ще продължи да се разширява в бъдеще, с разработването на нови процедури и технологии, за по-доброто изясняване на HLA генните взаимодействия и техните ефекти при човешките заболявания. NGS технологията улеснява пълното секвениране на HLA и се очаква да

подобри разбиранията ни за механизмите, чрез които *HLA* гените се модулират, включително транскрипция, регулация на генната експресия и епигенетика. Технологията има капацитета да позволи и анализа на HLA-омикс. Подробната информация за тумора и имунния статус на пациента, ще допринесе за пълното изясняване на протичащата еволюция на тумора и ще помогне при избора на терапевтична стратегия с оптимален изход.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи ролята на полиморфизма на класическите и некласически *HLA* гени, определен на алелно ниво, чрез секвениране от следващо поколение, при пациенти с плоскоклетъчен карцином на главата и шията от българската популация.

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

1. Оценка на GenDx протокол за HLA типизиране на здрави индивиди от българската популация.
2. Оценка на AlloSeq Tx17 метод, за секвениране от ново поколение на *HLA* гени, с протокол за ранно обединяване на пробите.
3. Определяне на алели и хаплотипи, асоциирани с плоскоклетъчен карцином на главата и шията (обединен сравнителен анализ на пациентите с плоскоклетъчни карциноми на устана кухина и ларинкса) и здравите контроли.
4. Сравнителен анализ между двете групи пациенти с плоскоклетъчни карциноми на устана кухина и ларинкса.
5. Изследване на полиморфизма на класически *HLA* гени (*HLA-A, -B, -C, -DPB1, -DQB1, -DRB1*), при пациенти със плоскоклетъчен карцином на устната кухина и здрави индивиди от българската популация.
6. Изследване на полиморфизма на класически *HLA* гени (*HLA-A, -B, -C, -DPB1, -DQB1, -DRB1*), при пациенти с плоскоклетъчен карцином на ларинкса и при здрави индивиди от българската популация.
7. Изследване на полиморфизма на некласически *HLA* (*HLA-E, -F, -G, -H*) и *MIC* гени (*MICA, MICB*), при пациенти с плоскоклетъчен карцином на ларинкса и при здрави индивиди от българската популация.
8. Определяне на *HLA* алели и хаплотипи асоциирани с предразположение или предпазване от развитието на плоскоклетъчен карцином на главата и шията.
9. Определяне на алели и хаплотипи, асоциирани с плоскоклетъчен карцином на устната кухина в българската популация.
10. Определяне на алели и хаплотипи, асоциирани с плоскоклетъчен карцином на ларинкса в българската популация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. МАТЕРИАЛИ

За целите на настоящият дисертационен труд беше подбран биологичен материал – венозна кръв и ДНК от 95 пациенти, постъпили в Клиника по УНГ болести - УМБАЛ "Царица Йоанна" - ИСУЛ, Клиника по лицево – челюстна хирургия към УМБАЛ “Александровска” и Факултет по Дентална медицина към Медицински Университет – София, с поставена диагноза плоскоклетъчен карцином на устната кухина (OSCC – oral squamous cell carcinoma) и плоскоклетъчен карцином на ларинкса (LSCC – larynx squamous cell carcinoma) (Таблица 3). От изследваните 47 пациенти с OSCC, 31 са жени, 16 са мъже, със средна възраст 65±10 години. Изледваните пациенти с LSCC са 48, от които 45 са мъже и 3 жени със средна възраст 64±9. За обединения сравнителен анализ на пациентите с плоскоклетъчни карциноми на устната кухина и ларинкса – плоскоклетъчен карцином на главата и шията (HNSCC), както и отделните асоциативни анализи на класически HLA, използвахме 230 здрави контроли (n=230). За контролната група за асоциативен анализ на некласически HLA и LSCC подбрахме 63 здрави контроли. Всички здрави контроли са доброволни донори от Българския регистър за доброволни донори на костен мозък и периферни стволови клетки към Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска” и случайно избрани здрави, неродствени индивиди от българската популация, някои от които са HLA типизирани в хода на предходни проучвания на колектива [98, 99]. Генетичните изследвания са извършени след получаване на писмено информирано съгласие от пациентите. Тестовете са извършени съобразно Декларация от Хелзинки на Световната Медицинска Асоциация за етични правила при медицински изследвания върху хора.

Таблица 3. Пациенти и здрави контроли, включени в дисертационния труд

	Проби за анализ на класически HLA				**Контролна група за асоциативен анализ на некласически HLA (n=63)**
Параметър	**HNSCC (n=95)**	**OSCC (n=47)**	**LSCC (n=48)**	**Контроли (n=230)**	
Пол					
Мъже	76	31	45	96	22
Жени	19	16	3	134	41

p-стойност (Хи-квадрат)	<0.001	0.004	<0.001* <0.001		
Възраст					
Средна възраст	65±9	65±10	64±9	38±11	58±24
Възрастов диапазон	41-90	43-90	41-83	18-64	20-99
p-стойност (t-тест)	<0.001	<0.001	<0.001* 0.084		
Статистическа сила на анализа	0.865	0.806	0.808* 0.428		
Стадий на развитие на тумора (TNM)					
I	9	5	4		
II	14	12	2		
III	15	10	5		
IV	17	4	13		
неопределен	40	16	24		
Диференциация на карцинома (G)					
G1 (G1-G2)	14	9	5		
G2 (G2-G3)	21	12	9		
G3	10	10	0		
неопределена	50	16	34		

**Обозначен е статистическият анализ за различия между пациентите с LSCC и двете контролни групи по пол и възраст; и силата на двата анализа. За сравнителния анализ между пациентите – p=0,002 (за пола), p=0,239 (за възрастта), сила на анализа=0,376.*

II. МЕТОДИ

1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв

Геномната ДНК е изолирана чрез автоматична система за ДНК изолиране - iPrep™ Purification Instrument и iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit (Invitrogen, USA). Принципът на този метод се основава на свързването на ДНК към силиконовата повърхност на магнитни частици, с последващото им сепариране чрез магнитен елемент, вграден в апарата и елуиране на ДНК. Към изходния материал се прибавят лизиращ разтвор, необходим за разкъсване на клетъчните мембрани и протеиназа К, за разграждане на клетъчните белтъци.

Следва смесване на лизата с магнитните микросфери - Dynabeads® MyOne™ SILANE (Invitrogen, USA). Сферите са положително заредени и свързват силно отрицателната ДНК. Следват две последователни измивания, със съответните буфери, за премахване на контаминиращите агенти и потенциални PCR инхибитори. Като последна стъпка, ДНК се елуира чрез буфер и магнитен сепаратор.

Изпълнение на метода:

1) В 1,5 ml епруветка (iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit) се добавят 350 µl периферна венозна кръв. Използва се и втора празна епруветка, в която се извършва елуирането.
2) Приготвя се единичен стрип (касета), съдържащ магнитни микросфери и разтвори (iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit). Стрипът се вортексира, за да се ресуспендират магнитните частици.
3) Стрипът се поставя в автоматичен апарат за ДНК изолиране iPrep™ Purification Instrument и към съответните ямки се добавят двете епруветки от стъпка 1. Апаратът се стартира, като от стартовото меню се задава обем на елуиране. Процесът на ДНК екстракция трае около 35 минути.
4) Концентрацията на изолираната ДНК е определена чрез спектрофотометър GeneQuant™ (GE Healthcare, USA) и Qubit Fluorometer (Invitrogen™). Чистотата е изчислена от съотношението A_{260}/A_{280}, от което с цел коригиране на ефекта на магнитните частици, се вади абсорбцията при 320 nm. Оптималната чистота е между 1.6 и 1.9 (съотношение под 1.6 показва наличие на РНК, а над 1.9, наличие на белтъци).
5) Изолираната ДНК е съхранявана на +4°C за няколко седмици или при -20°C, за по-продължителен период.

2. Измерване концентрацията на ДНК с Qubit флуорометър

Флуорометърът Qubit 3.0 (Invitrogen, USA) използва флуоресцентни багрила, които емитират светлина само когато са свързани с целевите молекули, дори при ниски концентрации. Флуорометърът Qubit е по-чувствителен от UV абсорбцията, която измерва всичко абсорбиращо при 260 nm - ДНК, РНК, белтъци, свободни нуклеотиди или излишни соли. Освен това, UV спектрофотометрията често няма чувствителността да измерва точно ниските концентрации на ДНК. Измерванията чрез флуорометър Qubit са по-точни спрямо спектрофотометричните, тъй като багрилата в тестовите комплекти Invitrogen Qubit

флуоресцират само когато са свързани към избраната молекула в пробата - ДНК, РНК или белтък.

За целите на дисертационния труд е използван кит Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity), включващ флуоресцентно багрило, буфер за разреждане и ДНК стандарти. Китът е високо селективен за двойно-верижна ДНК (двДНК) спрямо РНК, и е точен за концентрации между 10 pg/µl и 100 ng/µl. Анализът се прави на стайна температура. Епруветките се инкубират за 2 минути след разбъркване на пробите с работния разтвор, за да се постигне оптимална флуоресценция. След този инкубационен период, флуоресцентният сигнал е стабилен за 3 часа на стайна температура.

Изпълнение на метода:

1) Приготвят се 0.5 ml (Qubit) епруветки.

NB! Надписването на епруветките трябва да става само върху капачките.

2) Приготвя се работен разтвор, като за една проба се комбинират:

x 199 µl буфер

x 1 µl багрило

3) Приготвят се разтворите на двата стандарта, като в 0.5 ml (Qubit) епруветки се комбинират:

190 µl работен разтвор с 10 µl от стандарт 1 и

190 µl работен разтвор с 10 µl от стандарт 2

4) Комбинират се x µl ДНК с (200 – x) µl от работния разтвор, за да се получи краен обем от 200 µl

5) Пробите се разбъркват с вортекс за 2-3 секунди, като се винимава да не се образуват мехурчета

6) Епруветките се инкубират на тъмно на стайна температура за 2 минути

7) От дисплея се избира ”Run new calibration”, за калибриране на апарата със стандартите. Последователно се измерват стандарт 1 и стандарт 2, след което се преминава към измерване на пробите.

8) Пробите се поставят в камерата за измерване на апарата и от менюто се избира ”Read tube”

NB! Флуорометърът може да измерва различни обеми ДНК. Преди да се започне измерването на пробите, трябва да се окаже обемът на използвания генетичен материал от стъпка 4!

3. Методи за HLA типизиране с NGS

3.1. GenDx NGSgo

За целите на настоящия дисертационен труд, въведохме и оценихме протокол на GenDx NGSgo (GenDx, the Netherlands), за подготовка на ДНК библиотеки, за типизиране на 6 HLA локуса (класическите клас I HLA-A, -B, -C и клас II HLA-DRB1, -DQB1 и -DPB1), и секвениране от ново поколение, с платформата на Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, USA) като секвенирахме 77 проби от здравата контролна група за асоциативния анализ на класически HLA.

Технологията на Ion Torrent използва нов подход за секвениране (sequencing by synthesis - SBS), чрез синтеза с електрохимична детекция. Секвенирането се осъществява чрез полупроводников чип, който отчита промяната в pH, която се дължи на отделянето на протони, в резултат от образуването на фосфодиестерна връзка, при синтезата на ДНК. По този начин се съкращава секвенционното време, което заедно с ниската цена и възможността за автоматизиране на подготовката на ДНК библиотеката, правят Ion Torrent платформата подходяща за таргетно секвениране или цялостно секвениране на малки геноми.

ДНК библиотеката се амплифицира върху микросфери, чрез емулсионен PCR. За процесите на амплификация и последващо обогатяване на библиотеката, е създадена системата ”Ion One Touch”, която автоматизира процеса и значително намалява времето за изработване. Обогатените микросфери се разпределят в ямките на йонния чип. По време на секвенционния процес, добавянето на разтвори от всеки нативен нуклеотид става последователно в определен ред. Промяната в алкално-киселинния баланс се отчита от сензор и се трансформира в електричен сигнал. Секвенирането се осъществява чрез полупроводников чип, който отчита промяната в pH, която се дължио на отделянето на протони, в резултат от образуването на фосфодиестерна връзка при синтезата на ДНК. Целият процес завършва в рамките на 4 до 8 часа. Секвенирането с Ion Torrent платформата е от типа единично четене (single read), което води до грешки като инсерции и делеции при прочита на дълги хомополимерни участъци от ДНК.

Изпълнение на метода:

1. NGSgo- AmpX v2 CE HLA амплификация

Концентрацията на ДНК трябва да е около 40 ng, в обем 1-2 µl.

1) Праймерите са лиофилизирани и трябва да се центрофугират преди отварянето им за първи път и след това се ресуспендират в 106 µl дейонизирана вода от кита. Епруветките се вортексират и центрофугират за една минута. Стъпката се повтаря поне два пъти.

2) Работи се на лед/ледени блокчета. GenDx-LongMix (4x), водата и NGSgo-AmpX v2 праймерите се вортексират и центрофугират преди използването им. Желателно е обемът на приготвената реакционна смес да е с около 10% излишък. Използването на негативна контрола, като механизъм за контрол на замърсяването е силно препоръчително.

Компоненти	**Обем**
Дейонизирана вода	4.5-5.5 µl
GenDx-LongMix (4x)	2.5 µl
NGSgo-AmpX v2 праймери	1 µl
ДНК (около 40 ng)	1-2 µl
Общ обем	**10 µl**

3) Реакционната смес и ДНК се накапват в 96-ямкова плака и се стартира следната PCR програма:

Брой цикли	**Температура**	**Време**
1	95º C	3 мин.
35	95º C	15 сек.
	65º C	30 сек.
	67º C	3 мин.
1	67º C	10 мин
1	15º C	∞

2. Измерване на концентрацията на ампликоните с Qubit флуорометър

За подготовка на библиотеките е необходима концентрация на ампликоните от 50 до 1000 ng (оптимално около 250 ng).

Амплификатите се разреждат десет пъти и се измерват на Qubit флуорометър. Концентрацията им се изчислява, като се умножи по фактора на разреждане (10x), и се определя количеството, което трябва да се вземе от всеки локус, за получаването на еквимоларни концентрации (т. нар. нормализиране) като се взема предвид дължината на предвид разликите в размера и концентрацията на HLA ампликоните. Формулата, препоръчана от производителя, по която се определя необходимото количество от всеки локус е: $\frac{\text{първоначален обем } (\mu l)}{\text{еквимоларно съотношение}} \times \text{екв. съотношение}$

Обединяване на ампликоните

В тази стъпка се обединяват всички локуси от една и съща проба, за да се постигне еднаква дълбочина на прочитите за всички локуси. Всеки пул от ампликони на една проба ще бъде маркиран по-късно с уникална секвенция с баркод, по време на лигирането на адапторите.

3. Фрагментация и поправка на краищата

За оптималният размер на фрагментите и добив на библиотека, е необходимо последващите стъпки на фрагментация, лигиране на адаптори, обединяване на пробите и пречистване, да се направят веднага без прекъсване. Пробите могат да се съхраняват на 4ºC до следващия ден, чак след стъпката на пречистване. Препоръчително е всички реакционни смеси да се приготвят с поне 10% излишък. Преди лигирането на адапторите, ампликоните трябва да се нарежат до размер от 200 до 400 bp, което се счита за оптимален размер за платформата S5. За целта се използва неспецифично ензимно нарязване чрез фрагментаза.

Фрагментазният ензим, фрагментазният буфер, end prep буферът, end prep ензимът и водата се размразяват. Всички реактиви се разбъркват и центрофугират и се държат на лед през цялото време.

Компонент	**Обем**
HLA ампликон (около 250 ng)	варира
NGSgo-LibrX фрагментазен буфер	2 µl
NGSgo-LibrX end prep буфер	3.25 µl
NGSgo-LibrX фрагментазен ензим	1.5 µl
NGSgo-LibrX end prep ензим	1.5 µl

H_20	варира
Общ обем	**32.5 µl**

Използва се следната PCR програма:

Стъпка	Време	Температура
Фрагментация и end-repair	20 мин.	25º C
dA-tailing*	10 мин.	70º C
Охлаждане	∞	15º C

*dA-tailing (tail – опашка) представлява добавянето на нематрични нуклеотиди за 3‘ края на ДНК с цел да не се съедини неспецифично.

4. Лигиране на адапторите

Лигирането на адаптори е метод за добавяне на олигонуклеотиди с известна секвенция за двата края на комплементарните ДНК. Лигазният микс е предназначен за подобряването на лигазната реакция като осигурява оптимално съотношение на буферните и езнимните компоненти. Адапторите представляват къси олигонуклеотиди, които притежават допълнителни функционални елементи като индекси за пробите и уникални молекулярни идентификатори с цел подобряване на анализа след секвениране на ДНК библиотеката.

Плаката с адапторите се центрофугира. Адапторите се предоставят лиофилизирани, с оранжево оцветена пелета. Във вода (5.5 µl) се ресуспендират само тези, които са необходими в момента. Гнездата, които са били използвани, се затварят с прозрачно фолио и плаката се замразява.

На лед се подготвя микс за реакцията на лигиране на адапторите:

Компонент	**Обем**
NGSgo-LibrX лигазен микс	7.5 µl
NGSgo-LibrX лигиращ енхансер	0.5 µl
Общ обем	**8 µl**

Сместа се вортексира и центрофугира и се добавя към плаката с фрагментираните проби (32.5 µl), накрая се прибавят и по 4.5 µl от ресуспендираните адаптори.

Компонент	**Обем**
Микс за лигиране на адапторите	8 µl
NGSgo-IndX AD-Ion-X (адаптори)	4.5 µl
dA-tailed ДНК фрагменти	32.5 µl
Общ обем	**45 µl**

Плаката се вортексира и центрофугира, след което се поставя на PCR апарат, с програма, нагласена на 20ºC за 15 минути.

5. Обединяване на всички проби (приготвяне на библиотека)

Обединяването трябва да се осъществи с възможно най-равни обеми, за да може разликите в концентрацията да са минимални. Плаката се центрофугира и вортексира. Добавят се по 10 µl от всяка пациентска проба, с всичките амплифицирани локуси. Библиотеката се разбърква и центрофугира.

6. Пречистване на ДНК библиотеката с 0.45x SPRI магнитни бедове

Пречистването и селекция на фрагментите по размер с магнитни бедове, позволява имобилизирането на ДНК, когато специалните SPRI бедове се свързват с маркираните ДНК фрагменти, които остават закачени за тях в стъпката на пречистване с помощта на магнитно поле.

1) Приготвя се свеж 80% етанол. Бедовете се темперират на стайна температура и се разбъркват. Използва се магнитен статив за 1.5 ml епруветки тип „Епендорф“.

2) За 24 до 96 проби се слагат максимум 240 µl и 108 µl от бедовете. Сместа се ресуспендира с пипета поне 10 пъти и се инкубира за 5 минути на стайна температура. След това се центрофугира и се поставя на магнитния статив, за да може бедовете да се отделят от супернатантата

3) Когато разтворът се избистри (след около 5 минути), супернатантата се отделя и изхвърля с пипетиране, без да се докосват магнитните бедове

4) Добавят се 900 µl прясно приготвен 80% етанол, докато епруветката е на магнитния статив.

5) Инкубира се на стайна температура за 30 секунди и след това отново внимателно се премахва супернатантата

6) Стъпките се повтарят два пъти, за да се получат общо 3 миенета

7) Отстранява се всичкият остатъчен етанол с малка пипета, без да се докосват бедовете, и епруветката се оставя отворена на магнитния статив за 3-5 минути, за да се изпари остатъчният етанол

8) След това епруветката се отстранява от магнитния статив, добавят се 50 µl стерилна дейонизирана H_2O и се инкубира за 2 минути на стайна температура, за да може ДНК фрагментите да се елуират от магнитните бедове

9) Епруветката се поставя обратно на магнитния статив и когато разтворът се избистри (след около 5 минути), се прехвърлят 46 µl от течността, съдържаща селектираните ампликони, в нова епруветка. Препоръчително е в стъпки от 2 до 7 да се използват епруветки с ниско свързване на ДНК (low-biding), които намаляват свързването на белтъци и нуклеинови киселини с цел минимална загуба на изследваната проба.

7. Измерване на ДНК библиотеката

Библиотеката се измерва чрез флуориметър Qubit в две повторения, заедно със стандарти. Следва се методиката описана в точка 2 от раздел Методи.

За да преизчислим концентрацията на ДНК библиотеката от ng/µl в nM, използваме следната формула:

$$\frac{(\text{концентрация в } ng/\mu l)}{(660\ g/mol\ x\ \text{среден размер на библиотеката в } bp)} x10^6 = \text{концентрация в } nM$$

След това ДНК библиотеката се разрежда двукратно: до достигане на концентрация от 1 nM и след това до 100 pM. От финално разредената библиотека зареждаме 50 µl (с финална концентрация 50 pM) на Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, USA) апарата, съгласно препоръките на производителя.

8. Емулсионен PCR

Извършва се напълно автоматизирано, от апарат Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, USA). ДНК библиотеката се амплифицира върху микросфери, чрез емулсионен PCR. За процесите на амплификация и последващо обогатяване на библиотеката е създадена системата ”Ion One Touch”, описана по-рано в началото на раздела. Разредената библиотека, чипът и останалите консумативи, необходими за осъществяване на реакцията, се зареждат на апарата според инструкциите на производителя.

9. Секвениране

Натовареният чип с намножени ДНК фрагменти се поставя в Ion GeneStudio S5 секвенционния апарат (Thermo Fisher Scientific, USA) и се задава начало на секвенционния рън

10. Анализ

Генерираните от Ion GeneStudio S5 секвенции са налични в интернет-базираната платформа. Анализа на генерираните секвенции се извършва на софтуер NGSengine v2.22.0.22581 (IMGT/HLA 3.38.0, GenDx, Нидерландия). Програмата използва два независими алгоритъма – статистическо и консенсусно генотипизиране, които определят HLA генотипа. Консенсусното генотипизиране предоставя цели консенсусни секвенции на познати алели, налични в IMGT/HLA базата данни.

3.2. AlloSeq Tx 17

За целите на настоящия дисертационен труд оценихме протокол за подготовка на ДНК библиотеки, за секвениране на платформата MiniSeq (Illumina), с кит за HLA типизиране с високоразграничителна способност - AlloSeq Tx 17 (CareDx, USA) като секвенирахме пробите на пациентите.

HLA гените, които са включени в кита, са HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA и MICB. Подготовката на ДНК библиотека за секвениране с този протокол се извършва с помощта на т. нар. хибридизационна технология, която за разлика от стандартните PCR базирани протоколи, изключва възможността от формиране на свързани праймери, cross-over PCR продукти и др. Таргетните гени се улавят чрез хибридизация за къси фрагменти, които са закачени на повърхността на магнитни микросфери, комплементарни на консервативни участъци от изследваните гени. Въпреки това, недостатък е че AlloSeq Tx17 протоколът осигурява пълно покритие само на гените от HLA клас I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H), а на всички останали – само екзонно покритие, което може да доведе до неразграничими алелни комбинации.

Използвахме протокол с ранно обединяване на всички проби. Този протокол, в сравнение с оригиналния, позволява ранното обединяване на пробите, веднага след

добавяне на индексите, които позволяват разпознаването на всяка отделна проба. Всички останали стъпки на протокола продължават в една епруветка. Този протокол елиминира необходимостта от селекция на фрагментите по размер, с използването на плака, пречистване и стъпка на концентриране, която е задължителна, ако се включват над 12 проби в ДНК библиотеката. Настоящият протокол с ранно обединяване намалява стъпките на пипетиране с 46%, в сравнение с оригиналния протокол.

Изпълнение на метода:

1. Подготовка на пробите

Номерата на пробите се нанасят в ексел файл, предоставен от CareDx, и се задава позицията на всяка проба в 96-ямковата плака и съответните i7 и i5 индекси.

2. Подготовка на библиотеката

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди започване на работа с тях, след това се разбъркват и центрофугират за кратко.

2) От всяка ДНК проба са необходими по 10 µl, с концентрация между 10 и 100 ng/µl.

3) Подготвя се тагментационна смес, която съдържа 10 µl тагментационен буфер, 20 µl стерилна вода и 10 µl тагментационни микросфери, за всяка проба.

4) След разбъркване се добавят по 40 µl от тази смес към съответните гнезда на 96 ямковата плака с ДНК пробите. Плаката се запечатва с алуминиево фолио и се центрофугира за 10 секунди на 100x g. След това се разбърква на клатачка за плаки, за 1 минута на 1800 rpm, и отново се центрофугира.

5) Плаката се поставя в PCR машина със зададена програма за тагментиране, нагрят на 105ºC капак и зададен обем на реакцията 50 µl:

Температура	**Време**
55ºC	5 мин.
10ºC	2 мин.

6) След приключване на програмата, плаката веднага се поставя на стайна температура за 2 минути. PCR фолиото се отстранява и се добавят по 10 µl стоп буфер в съответните ямки. Плаката се запечатва и се разбърква на клатачка за 1 минута на 1800 rpm. Инкубира се за 5 минути на стайна температура. През това време PCR миксът и индексите се

размразяват и поставят на леден блок. Плаката се центрофугира и пробите се мият три пъти с тагментационен измиващ буфер:

a. Плаката се поставя на подходящ магнитен статив за 30 секунди, с цел микросферите да се съберат от едната страна на ямките

b. С помощта на пипета се отстранява и изхвърля супернатантата, като микросферите остават закачени за магнита

c. Бавно се добавят по 100 µl от тагментационния измиващ буфер към всяка ямка

d. Плаката се разбърква на клатачка за 2 минути на 1800 rpm

e. Стъпки a-d се повтарят още два пъти, за общо три миенета

7) Преди изхвърлянето на последната супернатанта, се подготвя PCR мастър микс, като се добавят се по 20 µl стерилна вода и 20 µl PCR Микс

8) Плаката и тя се поставя на магнитния статив, като след 30 секунди се изхвърля последната супернатанта с пипета с нагласен обем 100 µl. Плаката се отстранява от магнитния статив и се добавят по 40 µl от PCR мастър микса от стъпка 7), към съответните ямки

9) Плаката се запечатва, разбърква се за 2 минути на клатачка на 1800 rpm и се центрофугира за 10 секунди на 100x g. Следва добавяне на 5 µl от i5 и 5 µl от i7 индексите към всяко гнездо

10) Плаката се разбърква на клатачка за 1 минута на 1800 rpm, центрофугира се за кратко и се поставя на PCR апарат, със зададена програма за PCR Индексиране, с предварително загрян капак до 105ºC и обем на реакцията 50 µl:

Температура	**Време**	**Брой цикли**
72ºC	3 мин.	1
98ºC	3 мин.	1
98ºC	20 сек.	9
60ºC	30 сек.	
72ºC	3 мин.	
72ºC	3 мин.	1
10ºC	∞	1

След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява за една седмица на температура от -15ºC до -25ºC.

3. Селекция по размер и пречистване

1) Всички реагенти се темперират до стайна температура, разбъркват се и се центрофугират преди работа. Подготвят се 2 ml епруветки за работа

2) Подготвя се 80% етанол, като се смесват 1920 µl 100% етанол и 480 µl стерилна вода

3) Микросферите за пречистване се разреждат със стерилна вода, като към 576 µl се добавят 864 µl вода

4) От разредените микросфери, за пречистване се вземат 1200 µl и се поставят в 2 ml епруветка. След приключване на програмата за PCR индексиране, от 96-ямковата плака се вземат по 10 µl от всяко гнездо, добавят се към микросферите и се разбъркват

5) Епруветката се разбърква, докато се образува хомогенна смес и се инкубира за 5 минути на стайна температура. *По това време най-големите фрагменти се свързват за микросферите*

6) Епруветката се центрофугира за кратко и се поставя на магнитен статив за 2.5 минути, позволявайки на микросферите да се съберат на стената на епруветката

7) 1320 µl от супернатантата се прехвърлят в друга 2 ml епруветка, в която се добавят 105.6 µl неразредени пречистващи микросфери. Разбърква се за 10 секунди и се инкубира за 5 минути. *По време на тази инкубация, таргетните фрагменти се свързват за микросферите*

8) Епруветката се центрофугира за кратко и се инкубира на магнит за 2.5 минути. Супернатантата се изхвърля, а микросферите остават закачени за магнита. Епруветката остава на магнита и се измива двукратно с 80% етанол:

9) Добавят се 1500 µl 80% етанол:

a. Инкубира се на стайна температура за 30 секунди

b. Супернатантата се изхвърля

c. Стъпки a-b се повтарят за общо две миенета

10) Остатъкът от супернатантата се премахва с P20 пипета и епруветката се суши за 5 минути на стайна тепмература, за да се изпари етанола

11) Епруветката се отстранява от статива и се добавят 37 µl ресуспендиращ буфер, за да се елуират таргетните фрагменти

12) Епруветката се разбърква и се инкубира за 5 минути на стайна тепмература. След това се центрофугира, поставя се на магнитен статив за 30 секунди, за да може микросферите да се съберат на стената на епруветката. Взимат се 35 µl от супернатантата, които се прехвърлят в нова 1.5 ml епруветка.

След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 1 месец между -15ºC и -25ºC. Очакваният добив на библиотеката е около 30 ng/µl, но може да варира според качеството на ДНК на пробите. Концентрация ≥10 ng/µl се смята за достатъчна, за получаване на добра концентрация в края на протокола

4. Хибридизация на пробите

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират

2) За хибридизационната реакция се комбинират следните реагенти в описания ред:

a. ДНК библиотека от предходната стъпка: 30 µl

b. AlloSeq Tx Probe Panel: 10 µl

c. Хибридизационен буфер 1: 50 µl

d. Хибридизационен буфер 2: 10 µl.

3) С пипета, нагласена на 70 µl, се разбърква 10 пъти и се центрофугира

4) PCR епруветката се поставя в PCR апарата със зададена хибиридизационна програма, температура на капака 100ºC и обем на реакцията 100 µl:

Температура	**Време**	**Брой цикли**
98ºC	5 мин.	1
98ºC-62ºC, спадаща с 2ºC на цикъл	по 1 мин. на цикъл	19
62ºC	60 мин.	1
62ºC	≤18 часа	1

5. Улавяне на пробите (capture)

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират. Capture Wash буферът се загрява на 58ºC преди работа в Hybex (SciGene, USA) темперираш апарат

2) Подготвя се елуиращ мастър микс съдържащ:

a. Capture elution buffer 1: 28.5 µl

b. 2 N NaOH: 1.5 µl

3) В 1.5 ml епруветка се поставят 250 µl Улавящи Микросфери и 100 µl от хибридизационната реакция получена в предната стъпка на протокола. Епруветката се разбърква, но не се центрофугира. Инкубира се на 58ºC за 15 минути на Hybex системата

4) Епруветката се центрофугира бързо и веднага се поставя на магнитен статив за 30 секунди, за да се съберат микросферите на стената. Супернатантата се изхвърля и микросферите се промиват три пъти с Capture Wash Buffer:

(когато не се използва, буферът се държи в Hybex системата на 58ºC)

a. Епруветката се премахва от магнитния статив. Добавят се 200 µl от затопления Capture Wash Buffer (58ºC)

b. Епруветката се разбърква, но не се центрофугира. Инкубира се на 58ºC за 5 минути

c. Центрофугира се и веднага се поставя на магнитния статив за 30 секунди. Супернатантата се изхвърля

d. Стъпки a-c се повтарят още два пъти, за общо три миенета

5) Епруветката се отстранява от магнитния статив. Добавят се 200 µl затоплен Capture Wash Buffer (58ºC), епруветката се разбърква, но не се центрофугира

6) Цялото количество разтвор и микросфери се прехвърля в нова 1.5 ml епруветка.

Тази стъпка на прехвърляне е критична за премахване на PCR инхибитори, които биха могли да повлияят на резултата от следващите стъпки

7) Епруветката се инкубира на 58ºC в Hybex системата за 5 минути. След това се центрофугира и поставя на магнитен статив за 30 секунди

8) Супернатантата се изхвърля, епруветката се центрофугира и пак се поставя на магнитния статив за 30 секунди. С пипета P20 се отстранява остатъка от супернатанта

9) Елуиращият мастър микс, приготвен по-рано, се разбърква и се добавят 23 µl от него към епруветката, след като тя се отстрани от магнитния статив

10) Разбърква се и се инкубира за 2 минути на стайна температура. Епруветката се центрофугира и се поставя за 30 секунди на магнитния статив

11) Прехвърлят се 21 µl в PCR епруветка и се добавят 4 µl Capture Elution Buffer 2. Разбърква се с пипета 6-8 пъти, като крайният обем е 25 µl

След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 24 часа на температура от -15ºC до -25ºC

6. PCR намножаване след улавяне на пробите

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират

2) 5 µl от PCR праймерите се добавят към PCR епруветката от предходната стъпка на протокола. Добавят се 20 µl PCR микс. Разбърква се с пипета 10 пъти

3) Епруветката се центрофугира за кратко и се поставя в PCR апарат, със зададена PCR програма за намножаване. След улавяне на пробите, капакът трябва да е с температура 105ºC и обем на реакцията 50 µl:

Температура	**Време**	**Брой цикли**
98ºC	30 сек.	1
98ºC	1 мин.	17
60ºC	30 сек.	
72ºC	3 мин.	
72ºC	5 мин.	1
10ºC	∞	1

След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 1 седмица на температура между -15ºC и -25ºC.

7. Пречистване на библиотеката, след PCR намножаване

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират

2) Приготвя се 80% етанол, като се смесват 480 µl 100% етанол и 120 µl стерилна вода

3) В нова 1.5 ml епруветка се поставят 27 µl пречистващи микросфери. В нея се прехвърлят и 45 µl от реакцията от предходната стъпка

4) Епруветката се разбърква и бързо се центрофугира. Инкубира се на стайна температура за 5 минути. След това се поставя на магнитен статив за 30 секунди и супернатантата се изхвърля. Епруветката се оставя на магнитния статив и се промива два пъти с 80% етанол:

a. Добавят се 200 µl 80% етанол

b. Инкубира се за 30 секунди

c. Супернатантата се изхвърля

d. Стъпки a-c се повтарят за общо две миенета

5) Остатъците от супернатанта се отстраняват с пипета P20. Епруветката се суши за 5 минути на стайна температура. Премахва се от магнитния статив и се добавят 32 µl ресуспендиращ буфер, за да се елуират фрагментите

6) Епруветката се разбърква на вортекс за 10 секунди. Инкубира се на стайна температура за 5 минути. Центрофугира се и се поставя на магнитен статив за 30 секунди

7) В нова 1.5 ml епруветка се прехвърлят 30 µl от супернатантата.

След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 1 месец на температура от -15ºC до -25ºC градуса

8. Измерване на концентрацията на ДНК библиотеката с Qubit флуорометър

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират

2) Приготвя се разтвор от буфер и багрило, в съотношение 199:1. След това от него се разпределят по 190 µl за стандарт 1 и стандарт 2 и се смесват с по 10 µl от всеки стандарт. Правят се две измервания на пробата, като към 199 µl микс се добавя по 1 µl от пробата. Четирите епруветки се инкубират на тъмно за 2 минути и концентрацията се измерва на Qubit флуорометър

9. Разреждане и денатуриране на ДНК библиотеката, преди поставяне в MiniSeq секвенатор

1) Всички необходими реактиви се темперират до стайна температура преди работа, разбъркват се и се центрофугират

2) Подготвя се работен разтвор 0.1 N NaOH, като се смесват 95 µl стерилна вода с 5 µl 2N NaOH

3) Разреждане на ДНК библиотеката до 1 nM

След въвеждане на концентрацията на ДНК библиотеката в exel файла, се изчислява колко nM е тя и какви количества трябва да се добавят от ресуспендиращия буфер, за да се разреди до 1 nM

4) Денатурация на 1 nM библиотека и получаване на 5 pM

Добавят се 5 µl от 1 nM библиотеката, 5 µl 0.1 N NaOH, разбърква се, центрофугира се и се инкубира на стайна температура за 5 минути. След това се добавят 5 µl стерилна вода. Отново се разбърква и центрофугира. Добавят се 985 µl студен хибридизационен HT1 буфер.

Така получената денатурирана ДНК библиотека, с концентрация 5 pM, може да се съхранява до 1 месец на температура от -15ºC до -25ºC

5) Окончателно разреждане преди зареждането на ДНК библиотеката в MiniSeq картриджа:

Необходимата концентрация е зададена на 1.6 pM, размера на фрагментите е 800 bp, а крайният обем - 600 µl.

Смесват се 192 µl от 5 pM библиотека с 408 µl от HT1 буфер, разбърква се без вортекс и се поставят 600 µl в картриджа

10. Секвениране на Illumina секвенатор MiniSeq

В Local Run Manager се експортира готов csv файл, с информация за номерата на пробите и съответните индекси. Апаратът се промива с детергент и белина преди работа, като следват две стъпки на миене с дестилирана вода. Размразеният картридж се поставя заедно със зареденатa ДНК библиотека и съответната флоу клетка

11. Анализ на софтуерната програма AlloSeq Assign

В AlloSeq Assign v1.0.3 софтуера (CareDx, USA) се прехвърлят fastq.gz файлове, които се получават след секвениране. MiniSeq платформата за секвениране (Illumina, USA), генерира

консенсусна секвенционна двойка за всяка проба, което позволява проверка и корекции на базите и сравнение на консенсусното генотипизиране, с базата данни IPD-IMGT/HLA 3.45.1.2.

4. Статистически методи

Статистическите различия за пола на пациентите и здравите контроли са изразени посредством *p* стойност (Хи-квадрат тест ($\chi 2$)) с програмата SPSS (v. 16) [100], за възрастта - посредством *p* стойност (двустранен T – тест, независими проби с различна дисперсия) с Microsoft Excel, версия 2013 (Microsoft Corporation). Статистическата сила на анализите е изчислена със статистически пакет *pwr* за R (v. 1.3-0) с p стоойност равна на 0.05 и слаба сила на ефекта на Cohen (f^2), която представлява разликата между двете групи [101]. При пациентите не са оценени етиологични фактори като HPV статус, тютюнопушене и др.

Тестване за отклонение от равновесието на Харди-Вайнберг (Hardy–Weinberg equilibrium – HWE) при здравите контроли се осъществи като се използва тест за съотношение на вероятностите (Likelihood ratio test – LRT) със софтуерната програма Arlequin (v. 3.5.2.2) [102].

Проучването на полиморфизма на HLA при здрави индивиди от българската популация и при пациентите, се осъществи чрез определяне на алелните и хаплотипни честоти. Съпоставяне на честотата на алелите при пациентите и здравите контроли, беше извършено чрез сравнителен анализ с Python статистически пакет *PyHLA* (v. 1.1.1), за тестване на асоциации между HLA алели и заболявания, зиготен тест и тест за взаимодействия между алели [103].

Анализът на алелните асоциации и повишен/намален риск от развитие на HNSCC, OSCC и LSCC, се извърши с логистична регресия с *PyHLA* (v. 1.1.1), със съобразяване на разликите във възрастта и пола на контролните групи и пациентите, тъй като те са различни в контролните групи и групите на пациентите и биха могли да доведат до отклонение в резултатите. Логистичната регресия е статистически модел, използван за класифициране и прогнозен анализ. Тя оценява вероятността за възникване на събитие, въз основа на даден набор от независими променливи. При този статистически метод се зползва генерализирано линеарно моделиране, с цел изготвяне на асоциативни модели, включващи количествени и

качествени параметри. Включването на корекция за променливи (covariates), подобрява точността на реултата. На получената p-стойност за алелите е приложена корекцията на Бонферони за множественост (Bonferroni correction), като за статистически значими се приемат коригирани Pc със стойности равни или по-малки от 0.05.

Анализът на хаплотипните асоциации се извърши с със статистически пакет *haplo.stats* за R (версия 1.8.9). Определяне на халотипните скорове се извърши със статистически пакет със съобразяване на разликите във възрастта и пола на контролните групи и пациентите [104]. За статистически значими се приемат стойности на *p* равни или по-малки от 0.05, базирани на разпределението на $\chi 2$ (chi square distribution). Хаплотипният скор (haplotype score) се основава на нормализирана (-log10) вероятност за намиране на точно определен брой хромозоми с този хаплотип, като се имат предвид честотите на отделните варианти (алели) и се приема, че те са независими. Скорът се нормализира чрез умножаване на основната вероятност по общия брой варианти (алели). Хаплотипните честоти са изчислени с EM algorithm (expectation maximization algorithm) със софтуерната програма Arlequin (v. 3.5.2.2) [102].

Графично представяне на резултатите се извърши с помощта на програмите Microsoft Excel, версия 2013 (Microsoft Corporation), GraphPad Prism софтуер (версия 8.0.1), Сан Диего, Калифорния, USA и R пакет *Graphics* (версия 4.1.2), част от RStudio program, 2021 [105].

РЕЗУЛТАТИ

I. Оценка на методи за NGS на класически и некласически HLA гени

1. Оценка на GenDx метод за NGS с платформа Ion Torrent

За целите на настоящия дисертационен труд, оценихме клиничното приложение на GenDx протокола за NGS с търговския кит NGSgo като секвенирахме 77 ДНК проби, част от контролната група. Китът използва дълговерижен PCR за амплификация на дълги фрагменти, целящ пълното покритие на HLA гените. В таблица 4 е представено покритието на HLA гените при амплификация с използвания търговски кит на GenDx – NGSgo AmpX v2 (GenDx, Холандия), сравнено с подобен търговски кит, основаващ се на дълговерижен PCR Omixon HLA Holotype (Omixon, Унгария).

На фиг. 8 схематично е представено покритието на HLA гените с използвания търговски кит NGSgo AmpX v2 на GenDx.

Таблица 4. Покритие на изследваните чрез NGS HLA гени

HLA ген	GenDx NgsGo HLA	Omixon Holotype HLA
A	Целият ген	
B		
C		
DPB1	Целият ген без интрон 1	Екзон 2 – 3` UTR
DQB1	Екзон 2 – 4	Целият ген: интр.1 – 3`UTR 5`UTR – интрон 4
DRB1	Екзон 2 – 3	Интрон 1 – 4



Фиг. 8. Схематично представяне на амплифицираните от NGSgo AmpX v2 участъци от съответните HLA клас I и клас II гени. Източник: https://www.gendx.com/product_line/ngsgo-ampx-v2/

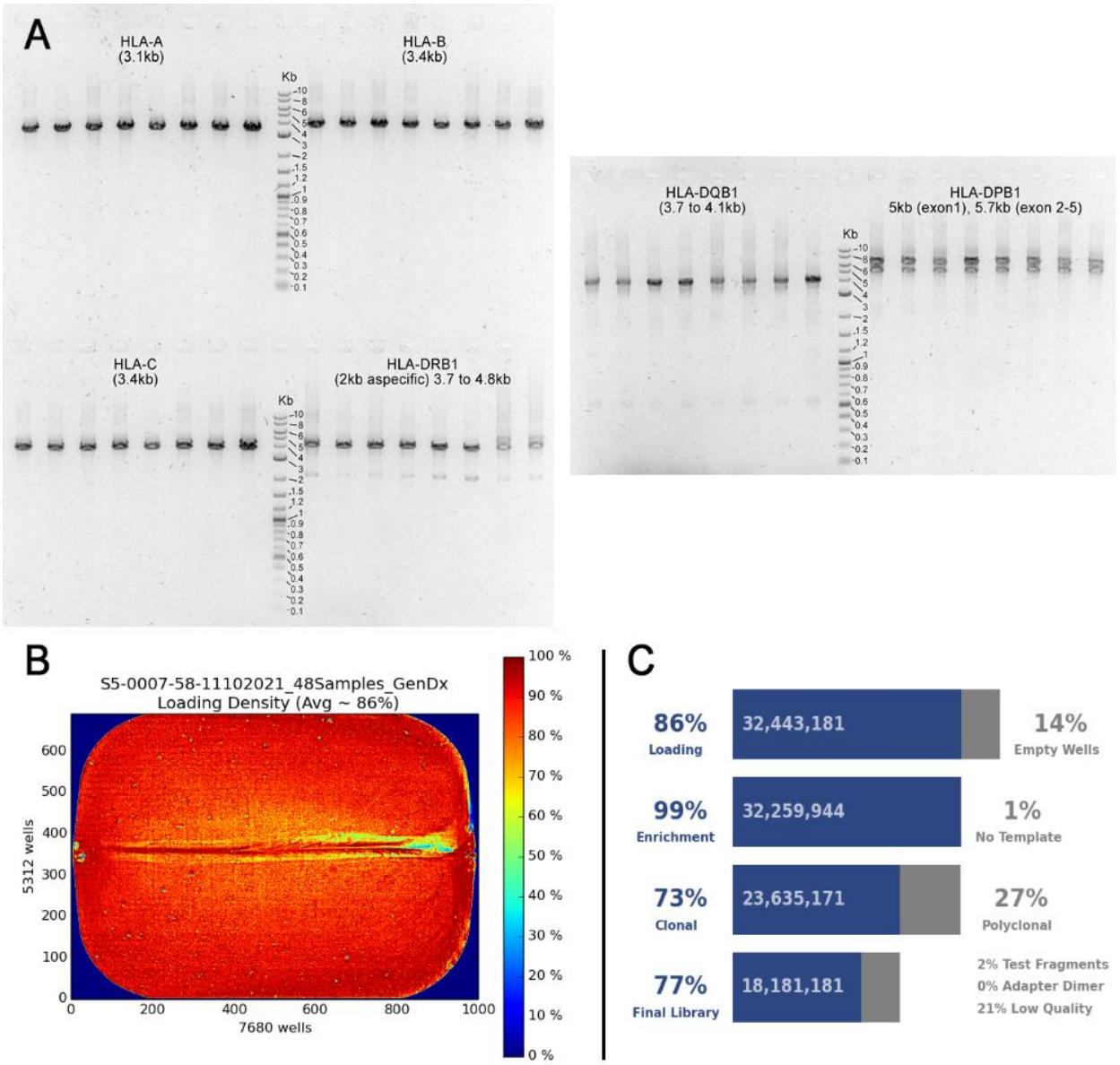
Средната ДНК концентрация на пробите беше 71.3 ng/µl със средно съотношение на чистотата на ДНК $A_{260/A280}$= 1.7. От всичките 77 проби, две бяха с концентрация под 20 ng/µl и 16 със $A_{260/A280}$ между 1.5 и 1.7. Бяха необходими общо 462 (77 × 6) PCR реакции за секвенирането на шесте HLA гена на всички проби. На фиг. 9 са представени PCR продуктите на 8 случайни проби визуализирани на агарозен гел. Средната концентрация на HLA ампликоните беше около 200 ng/µl, с добив от 2 µg в обем от 10 µl на PCR реакция. Допълнителното количество може да се използва за повторно секвениране при необходимост. След селекция по размер, средната концентрация на ДНК библиотеките беше 28 nM. Процентът на натоварване на чипа беше средно 80%. Фиг. 9B и 9C представят първата секвенционна серия, данните са от софтуера Torrent Suite v5.12.1 (Thermo Fisher Scientific, USA).

За оценка на HLA секвенциите се отчитат два основни показателя за качество – дълбочина на покритието и качество на прочитите.В статистическата обработка на резултатите бяха включени следните най-важни качествени показатели: качество на прочитите, покритие, големина на фрагментите, алелен баланс при хетерозиготните проби и ниво на шум в секвенциите.

В таблица 5 са представени средният брой прочити за всички гени, дължината им, процентът подравнени секвенции и средната дълбочина на прочитите (покритието). В таблица 6 са представени същите параметри за отделните изследвани HLA гени.

Броят прочити, генерирани от всички сквенирани гени за всяка проба, също е важен параметър на NGS технологията и трябва да е подобен при всички гени на дадена проба, за да може резултатът от HLA типизирането да е достоверен. Средният брой прочити в настоящото изследване беше 41 197 (фиг. 10).

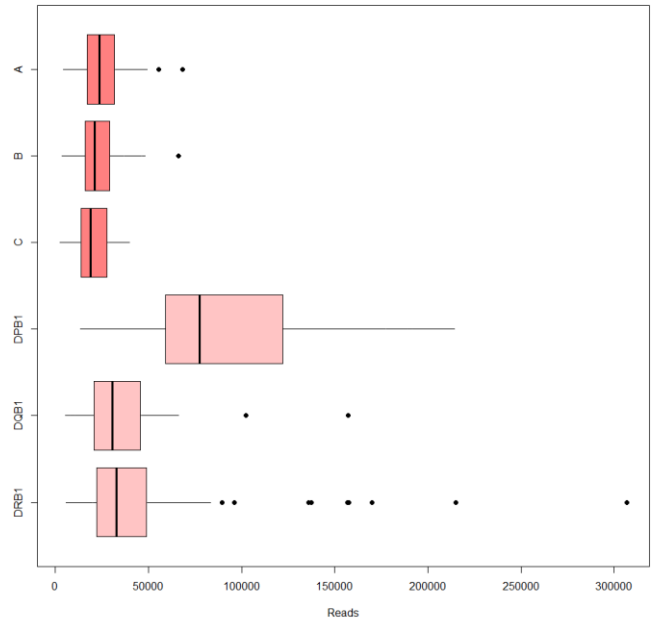
Подравняването на прочитите зависи от дължината им, тъй като прочитите трябва да са достатъчно дълги, за да се подравнят спрямо референтния геном. Дължината на прочитите изобразена на фиг. 11 е подобна за всички гени – средно 183 bp, със средно 77% подравняване.



Фиг. 9. Амплификация на 8 проби, визуализирани на 1% агарозен гел със SYBR Safe DNA gel багрило (Invitrogen, USA). DNA ladder – 1kB Plus DNA ladder for safe strains (New England Biolabs, USA) (A). Резултати от една от 4 секвенирани ДНК библиотеки от Torrent Suite software v. 5.12.1 (Thermofisher Scientific, USA) (B) и (C)

Средната дълбочина на прочитите е представена на фиг. 12 като броя прочити е най-голям за HLA-DPB1. Алелният баланс при хетерозиготните проби е представен на фиг. 13. Балансираната амплификация на двата алела при хетерозиготните проби се определя от процента данни за втория алел (фиг. 13). От установените 394 хетерозиготни генотипове, 96.9% са без алелен дисбаланс, при които вторият алел е >30%, докато 3.1% от типизираният имаха по-голям дисбаланс с вариация на втория алел между 15% и 29%).

Останалите параметри от софтуерната програма са представени в таблица 7. Важен параметър, също свързан с точността на HLA типизирането, е шумът на секвенциите. Важно е да се отбележи, че процентът на шума се отчита като малко по-висок от стандартния, тъй като NGSengine е софтуерен продукт пригоден основно за Illumina NGS платформата. Максималният шум беше 18%, със зададена горна гранца от 20%.



Фиг. 10. Boxplot графика, изобразяваща броя прочити (reads) за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки

Таблица 5. Средна стойност и стандартно отклонение на част от параметрите от NGS анализа

Среден брой прочити	41 197
Дължина на прочитите (bp)	183 ± 15
Подравняване на прочитите – mappability (%)	77 ± 3
Средна дълбочина на прочитите (покритие)	1277

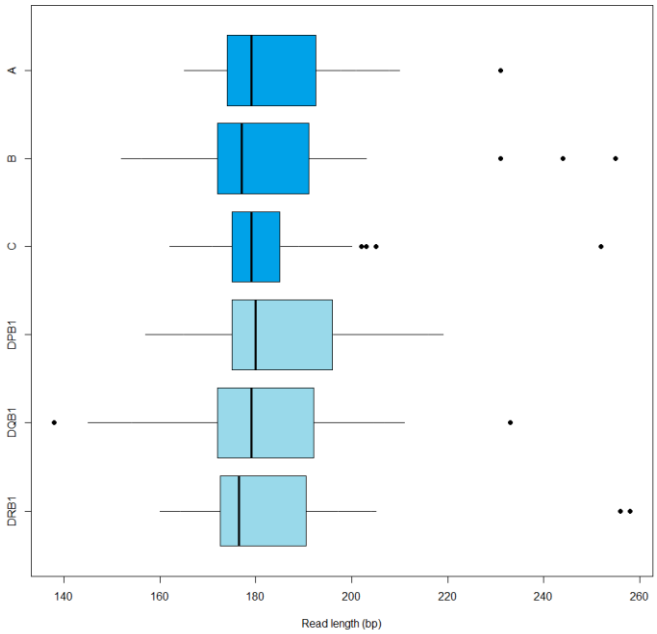
Таблица 6. Средна стойност и стандартно отклонение на NGS параметрите за отделните HLA гени

NGS параметър	A	B	C	DPB1	DQB1	DRB1
Брой прочити	25 151	22 641	20 344	94 582	35 203	47 917
Дължина на прочитите (bp)	183 ± 13	182 ± 16	183 ± 13	184 ± 14	182 ± 15	183 ± 13
Подравняване на прочитите – mappability (%)	79 ± 2	79 ± 2	78 ± 2	73 ± 2	77 ± 2	74 ± 2
Средна дълбочина на прочитите (покритие)	1216	1023	869	1305	1428	1799

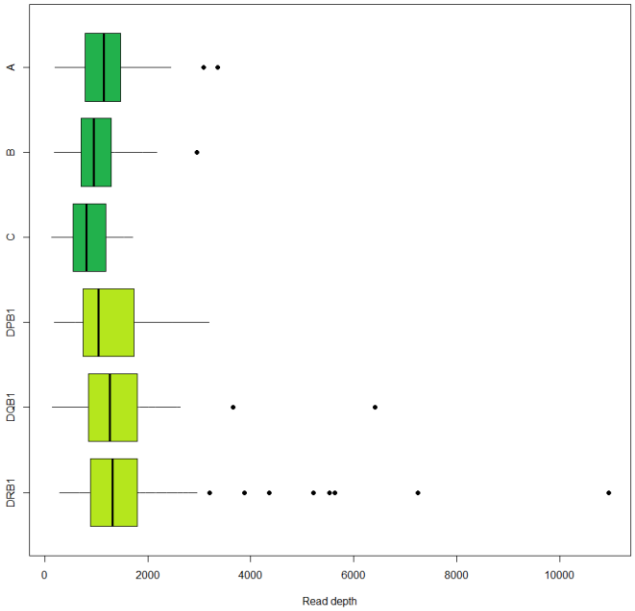
Последният NGS параметър, който използвахме за оценка на GenDx протокола за HLA типизиране е честотата на получените неразграничими алелни комбинации. (фиг. 14, таблица 8). Получаването на неразграничими комбинации в HLA-DRB1 и –DQB1 очаквано е в най-голям процент (24% и 19%) поради непълното покритие на секвенциите на гените при GenDx метода. Единични неразграничими алелни комбинации се откриват и при гените HLA-B, -C и -DPB1.

Таблица 7. Качествен контрол от изпитването на NGS

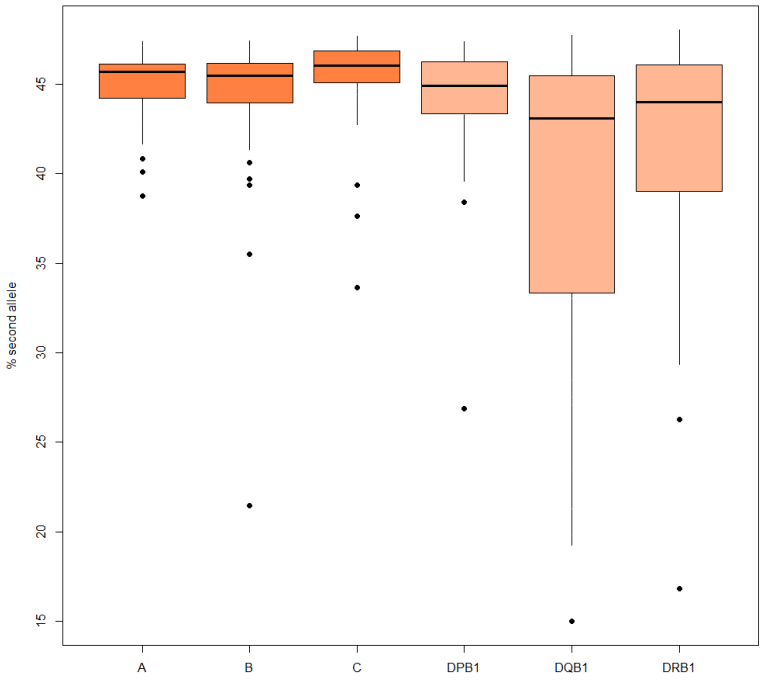
NGS параметър	**Част на секванцията**	**A**	**B**	**C**	**DPB1**	**DQB1**	**DRB1**
Минимална дълбочина на прочитите	*Core+*	695 ± 366	402 ± 283	390 ± 238	967 ± 572	455 ± 305	730 ± 675
	Exon+	401 ± 210	402 ± 283	390 ± 283	852 ± 569	265 ± 197	730 ± 675
	Amplicon	377 ± 199	317 ± 245	164 ± 76	493 ± 406	242 ± 190	554 ± 721
Хетерозиготни позиции	*Core+*	22 ± 12	25 ± 11	15 ± 7	5 ± 6	20 ± 13	19 ± 9
	Exon+	35 ± 20	32 ± 15	27 ± 16	8 ± 8	26 ± 16	26 ± 13
	Amplicon	87 ± 56	61 ± 32	66 ± 49	55 ± 87	251 ± 160	63 ± 41
Максимално ниво на шум (%)	*Core+*	17 ± 11	19 ± 10	18 ± 11	18 ± 10	16 ± 8	16 ± 11
	Exon+	27 ± 12	22 ± 7	18 ± 10	19 ± 9	24 ± 8	17 ± 12
	Amplicon	28 ± 11	23 ± 7	21 ± 10	22 ± 8	25 ± 7	17 ± 9
Delta signal to noise (%)	*Core+*	29 ± 7	24 ± 10	27 ± 7	28 ± 6	24 ± 12	28 ± 10
	Exon+	17 ± 15	20 ± 11	27 ± 7	25 ± 10	15 ± 13	26 ± 10
	Amplicon	11 ± 15	18 ± 12	23 ± 10	17 ± 14	3 ± 10	16 ± 12
Установен втори алел (%)	*Core+*	45 ± 2	44 ± 3	45 ± 2	44 ± 3	39 ± 9	42 ± 6
	Exon+	45 ± 1	45 ± 3	46 ± 2	44 ± 3	39 ± 9	42 ± 5
	Amplicon	45 ± 5	44 ± 7	45 ± 5	42 ± 9	37 ± 9	42 ± 6



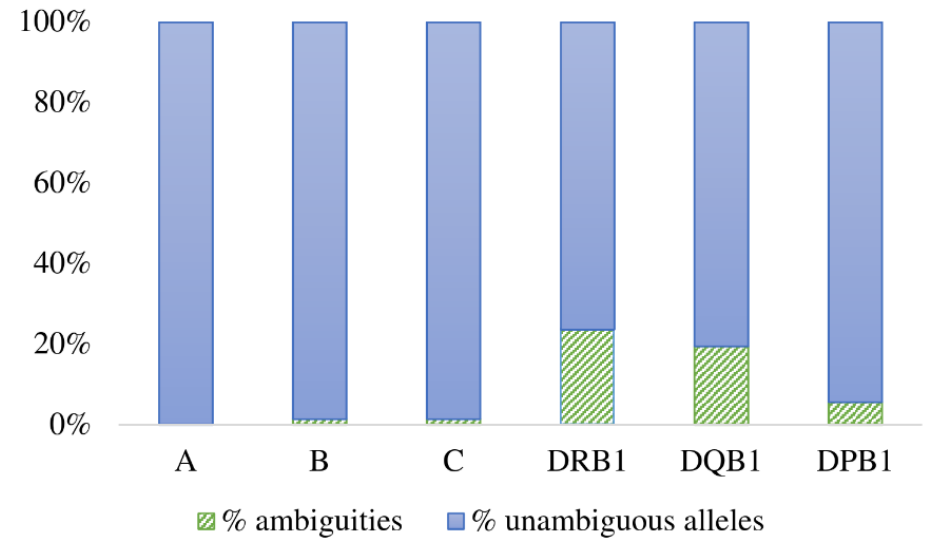
Фиг. 11. Boxplot графика, изобразяваща дължината на прочитите (read length), за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 12. Boxplot графика, изобразяваща дълбочината на прочитите (read depth), за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 13. Box plot графика, избразяваща процентът установен втори алел, при хетерозиготните проби (% second allele). Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 14. Съотношение на разграничимите (unambiguous) и неразграничимите (ambiguities) алелни комбинации, получени при секвениране с GenDx NGSgo (GenDx, USA)

Таблица 8. Установени неразграничими алелни комбинации при изследваните HLA гени

Локус	Неразграничими алелни комбинации GenDx	Брой
B	13:02:01:01/13:02:16	1
	18:01:01:01/18:01:03/09/25/26/27/29/33/35/38/40	1
C	02:02:02:01/02:02:14/37	1
	04:01:01:01/04:01:30	2
	07:02:01:01/07:02:55/75	1
DRB1	01:01:01:01/01:01:32/33/35	17
	03:01:01:01/03:01:31	34
	04:03:01:01/04:03:17	10
	10:01:01:01/10:01:12	5
	11:01:01:01/11:01:40	23
	14:54:01:01/14:54:09	20
	15:01:01:01/15:01:42	18
DPB1	02:01:02:01/02:01:40	8
	04:01:01:01/04:01:31/33/34/36/37/38/39/4142/45/47/48/49/50	5
	04:02:01:01/04:02:09/10/12/13/14/16	5
DQB1	02:01:01:01/02:01:08/26/27/32/33/35/36/37	2
	02:02:01:01/02:02:06:02/02:02:09	15
	03:01:01:02/03:01:41/43/44	8
	03:02:01:01/03:02:26	22
	05:01:01:01/05:01:21/22/23/24/25/26/27/28/29/33/34/35/36/37/38/39/40/42	5
	05:02:01:01/05:02:25	1
	05:03:01:01/05:03:18/19	28
	06:01:01:01/06:01:15/25	4
	06:02:01:01/06:02:36/41/42	8
	06:03:01:01/06:03:35/40	14
	06:04:01:01/06:04:11	1

2. Оценка на AlloSeq Tx17 метод за NGS с протокол за ранно обединяване на пробите

За целите на настоящия дисертационен труд беше въведена нова версия на протокола AlloSeq Tx17 (CareDx, USA), за подготовка на ДНК библиотеки, за секвениране от ново поколение (next generation sequencing - NGS), посредством платформата на Illumina – MiniSeq. Новата версия на AlloSeq Tx17, с ранно обединяване на всички проби, дава възможност за едновременното секвениране на 17 HLA гена, както класически от клас I и II (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и –DPB1), така и некласически (HLA-E, -F, -G, -H, -MICA, -MICB).

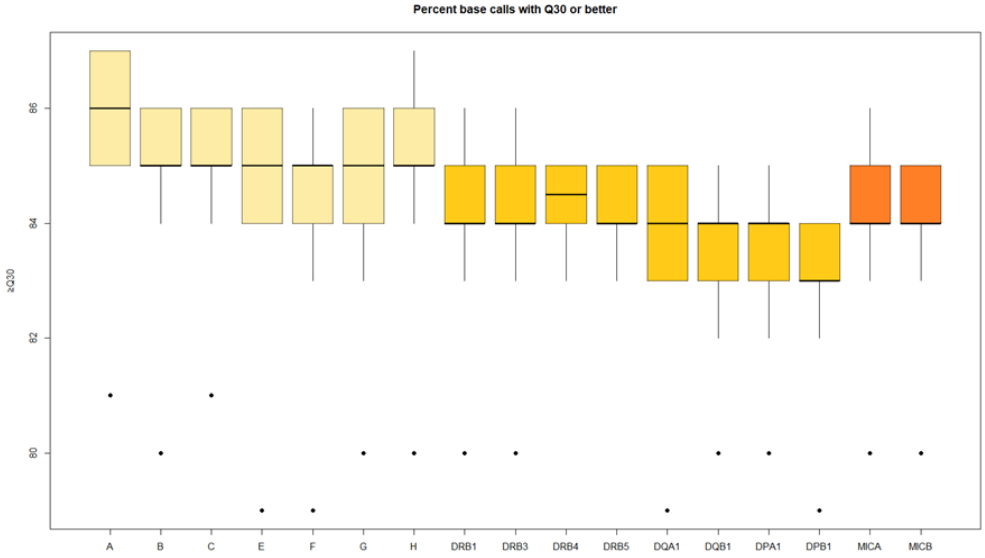
С този протокол секвенирахме пробите на пациентите (n=95). Трите критерия, за приемане на първичните данни от NGS, които изследвахме, са плътност на клъстерите, процент клъстери преминаващи през филтъра, и процент бази с определено качество (≥ Q30).

Третият критерий е процентът бази с резултат на качество от 30 и повече. Q30 на една база е еквивалент на възможността да се генерира грешна база 1 път от 1000 пъти (точността на определянето на базите е 99,9%). В таблица 9 са представени резултатите от различните NGS серии.

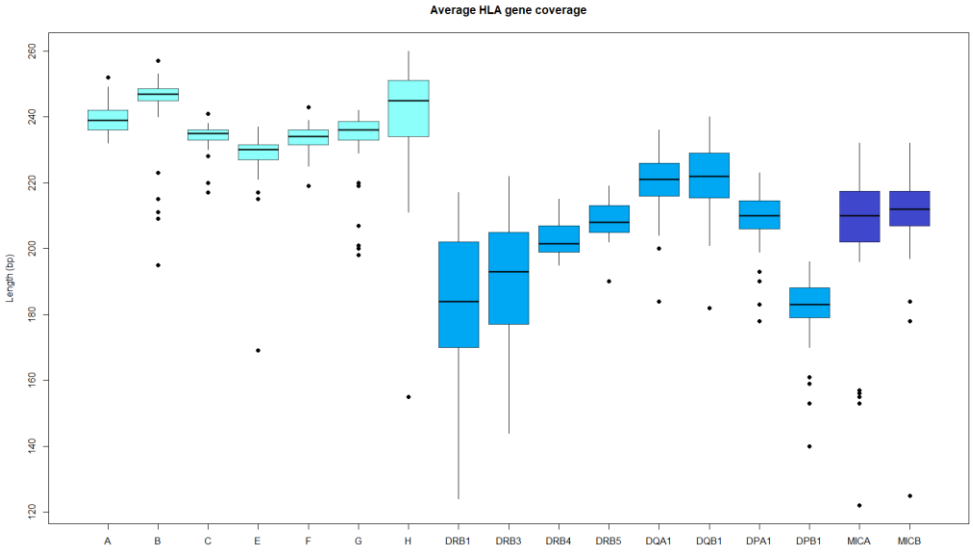
Таблица 9. Критерии за приемане на първичните данни от NGS

Критерии	**Серия 1**	**Серия 2**	**Серия 3**	**Серия 4**
Плътност на клъстерите (170-220 K/mm^2)	244 K/mm^2	266 K/mm^2	267 K/mm^2	285 K/mm^2
Клъстери преминаващи през филтъра (>60%)	62%	63%	53%	20%
Бази с качество ≥ Q30 (>80%)	83%	81%	84%	65%

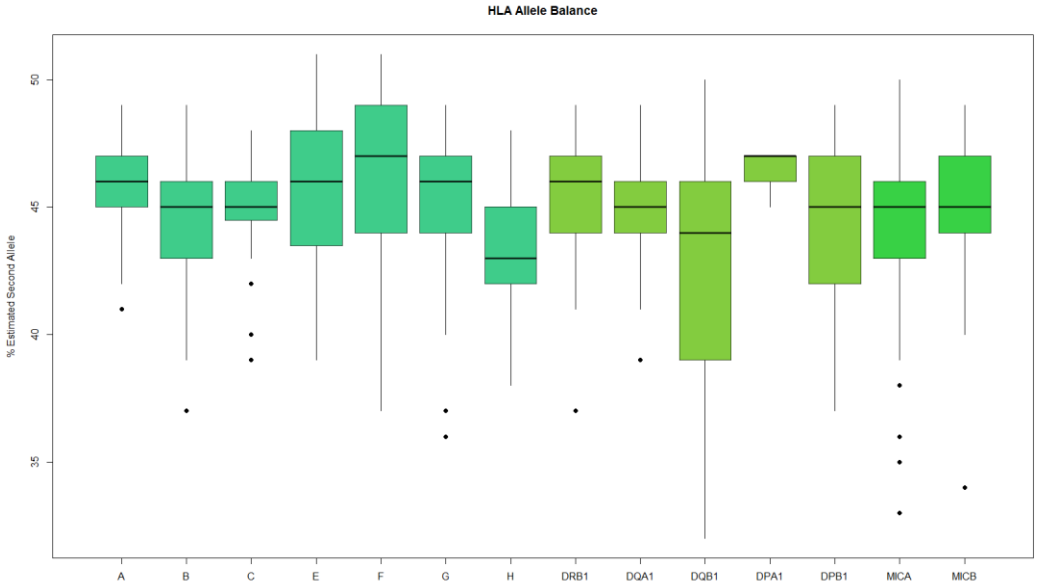
На фиг. 15 е представен процентът бази с Q30 и нагоре, при отделните HLA гени. На фиг. 16 е представена дължината на прочитите за всеки от изследваните гени, като най-голяма вариация се наблюдава при HLA-DRB1, която се дължи на дългите интронни последователности на този ген. На фиг. 17 е представен средният алелен баланс, като всички изследвани гени се характеризират с висок процент (около 45%). Последният изследван NGS параметър е процентът на неразграничимите алални комбинации. Неразграничимите алелни комбинации се получават при наличие на различия извън секвенираните региони (фиг. 18, таблица 10).



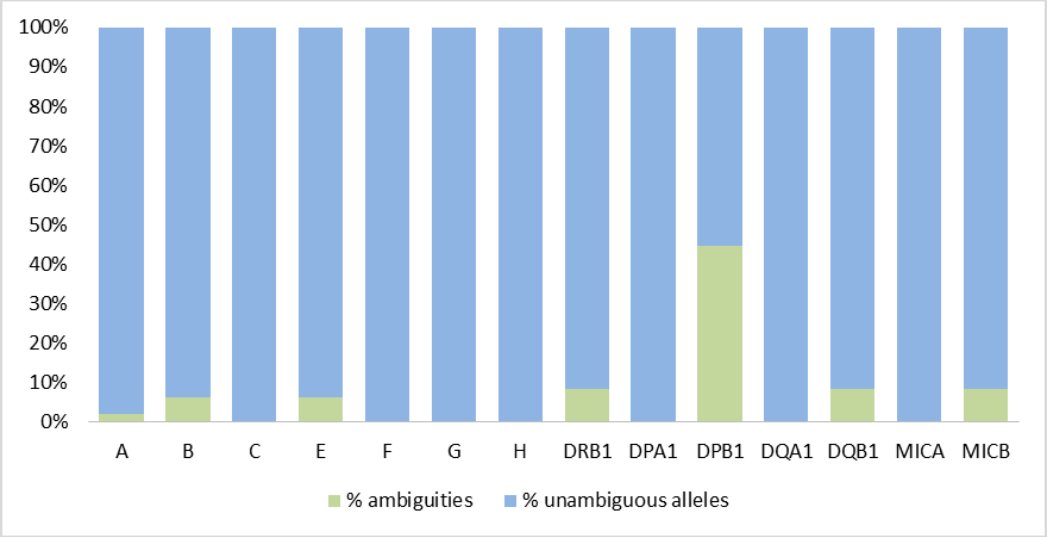
Фиг. 15. Boxplot графика, изобразяваща процента бази ≥Q30, за изследваните HLA гени. Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 16. Boxplot графика, изобразяваща дължината на ДНК фрагментите, за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot'' изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 17. Boxplot графика, изобразяваща алелния баланс на хетерозиготните проби, за всеки отделен HLA ген. Графиката тип „boxplot“ изобразява първия квартил, медианата и третия квартил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 18. Процент разграничими (unambiguous) и неразграничими (ambiguities) алелни комбинации, получени при секвениране с AlloSeq Tx17 (CareDx, USA)

Таблица 10. Установени неразграничими алелни комбинации при изследваните HLA гени

Локус	**Неразграничими алелни комбинации AlloSeq Tx17**	**Брой**
A	A*03:01:01+A*11:01:01/A*03:01:71+A*11:01:79	1
B	B*35:01:01+B*44:03:02/B*35:71+B*44:37:02 B*08:01:01+B*37:01:01/B*08:61+B*37:01:01	1 1

	B*15:17:01+B*49:01:01/B*15:17:01+B*49:01:06 B*07:02:01+B*07:05:01/B*07:355+B*07:06:01	1 1
E	E*01:01:01+E*01:03:02/E*01:01:02+E*01:03:01	9
DRB1	DRB1*03:01:01+DRB1*11:01:01/DRB1*03:01:08+DRB1*11:01:30 DRB1*03:01:01+DRB1*11:04:01/DRB1*03:01:08+DRB1*11:04:20 DRB1*03:01:01+DRB1*13:01:01/DRB1*03:01:08+DRB1*13:01:19 DRB1*11:04:01+DRB1*14:54:01/DRB1*11:04:17+DRB1*14:54:07	1 3 1 1
DPB1	DPB1*01:01:01+DPB1*02:01:02/DPB1*162:01:02+DPB1*461:01 DPB1*02:01:02+DPB1*04:02:01/DPB1*416:01:01+DPB1*105:01:01 DPB1*02:01:02+DPB1*09:01:01/DPB1*352:01:02+DPB1*899:01 DPB1*02:01:02+DPB1*14:01:01/DPB1*352:01:02+DPB1*651:01 DPB1*02:01:02+DPB1*16:01:01/DPB1*352:01:02+DPB1*940:0 DPB1*02:01:02+DPB1*104:01:01/DPB1*414:01:01+DPB1*124:01:01 DPB1*03:01:01+DPB1*04:01:01/DPB1*124:01:01+DPB1*350:01 DPB1*04:01:01+DPB1*04:02:01/DPB1*126:01:01+DPB1*105:01:01 DPB1*04:01:01+DPB1*05:01:01/DPB1*702:01+DPB1*744:01 DPB1*04:01:01+DPB1*06:01:01/DPB1*350:01+DPB1*914:01 DPB1*04:01:01+DPB1*10:01:01/DPB1*350:01+DPB1*902:01 DPB1*04:01:01+DPB1*13:01:01/DPB1*350:01+DPB1*133:01 DPB1*04:01:01+DPB1*14:01:01/DPB1*350:01+DPB1*651:01 DPB1*04:01:01+DPB1*19:01:01/DPB1*702:01+DPB1*106:01 DPB1*04:01:01+DPB1*104:01:01/DPB1*702:01+DPB1*124:01:01 DPB1*04:02:01+DPB1*05:01:01/DPB1*1037:01+DPB1*790:01 DPB1*04:02:01+DPB1*14:01:01/DPB1*463:01:01+DPB1*854:01 DPB1*04:02:01+DPB1*17:01:01/DPB1*105:01:01+DPB1*460:01	1 5 1 1 1 1 1 8 1 1 1 1 1 1 1 3 2 1 1
DQB1	DQB1*03:01:01/DQB1*03:276N	7
MICB	MICB*004:01+MICB*005:02/MICB*010+MICB*028	7

II. Изследване на равновесието на Харди-Вайнберг

За да определим съотношението на HLA алелите в българската популация за всички изследвани HLA гени, оценихме равновесието на Харди-Вайнберг.

При изследване равновесието на Харди-Вайнберг за всички анализирани HLA гени в двете контролни групи здрави индивиди от българската популация не се установява отклонение от равновесието (Таблица 11).

Таблица 11. Изследване на равновесието на Харди-Вайнберг при здравите контролни групи

HLA ген	**Брой изследвани здрави индивиди от българската популация**	**Наблюдавана хетерозиготност**	**Очаквана хетерозиготност**	***p стойност***
A	230	0.86955	0.87389	0.11268
B	230	0.94348	0.94879	0.12163
C	230	0.91304	0.90709	0.55285
DPB1	230	0.79130	0.90709	0.26478

DQB1	230	0.86522	0.88686	0.53342
DRB1	230	0.92609	0.94146	0.35786
E	63	0.57143	0.60470	0.85434
F	63	0.39683	0.40771	0.11866
G	63	0.76190	0.75695	0.14702
H	63	0.68254	0.69543	0.15736
MICA	63	0.87302	0.89867	0.15412
MICB	63	0.69841	0.70606	0.20200

III. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при HNSCC

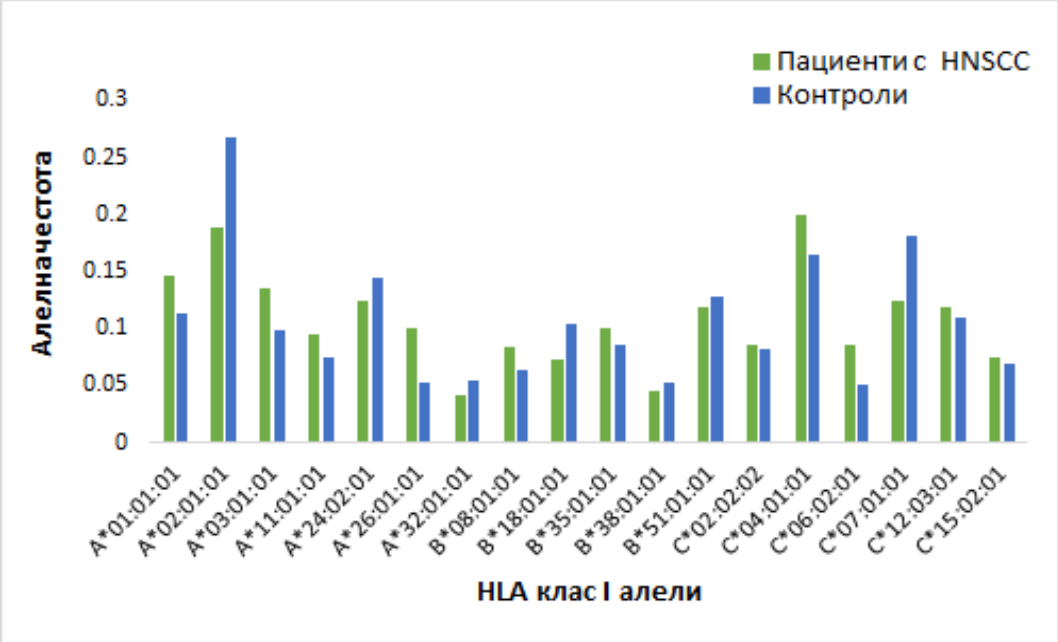
1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при здрави индивиди и при пациентите с HNSCC

1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

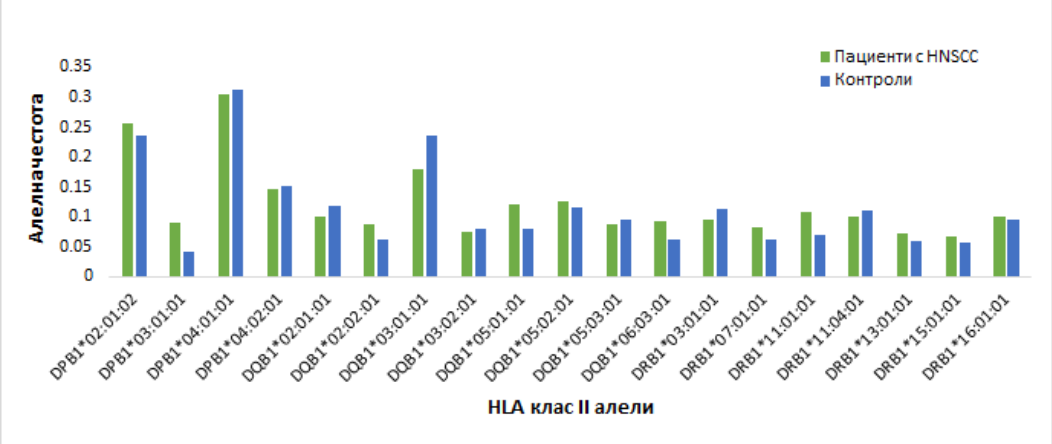
В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на класическите HLA клас I гени при 230 здрави индивиди от българската популация. Очаквано най-висока степен на полиморфизъм се установява за HLA-B гена с 57 алела. Най-честите класически HLA клас I алели са: A*02:01:01 (26,7%), B*51:01:01 (12,8%) и C*07:01:01 (18,0%) (фиг. 19). Сред класическите HLA клас II гени, най-високата степен на полиморфизъм се установява при HLA-DRB1 гена, с 36 алела. Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:04:01 (11,0%), DQB1*03:01:01 (23,5%), DPB1*04:01:01 (31,3%) (фиг. 20). Честотата на срещане на тези алели е съпоставима с предходни HLA антропологични изследвания на българската популация [12, 106, 107].

1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с HNSCC

Разпределението на класическите HLA клас I гени изследвахме при 95 пациенти от българската популация, диагностицирани с HNSCC. Отново, най-висока степен на полиморфизъм се установява при HLA-B гена – 30 алела. Най-честите класически HLA клас I алели при пациентите са: A*02:01:01 (18,8%), B*51:01:01 (11,8%) и C*04:01:01 (19,9%) (фиг. 19). Сред класическите HLA клас II гени, най-високата степен на полиморфизъм се установява при HLA-DRB1 гена, с 23 алела. Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:04:01 (10,1%), DQB1*03:01:01 (18,0%), DPB1*04:01:01 (30,6%) (фиг. 20).



Фиг. 19. Алелна честота на HLA клас I алелите на здравите контроли и пациентите с HNSCC



Фиг. 20. Алелна честота на HLA клас II алелите на здравите контроли и пациентите с HNSCC

2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с HNSCC

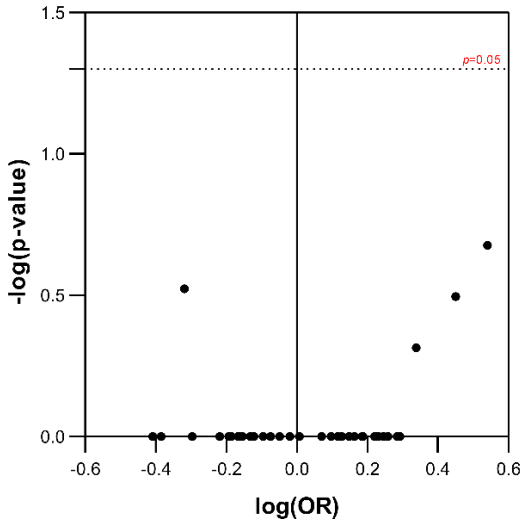
При извършения асоциативен анализ, между контролната група и групата на пациентите с логистична регресия с вариабилни пол и възраст, не се установяват статистически значими различия в алелното разпределение на класическите HLA (таблица 12). След прилагане на корекция за множественост на Bonferroni при HLA-A*02:01:01

(p=0.0429, Pc=0.3001, OR=0.4802) и A*11:01:01 (p=0.0300, Pc=0.2102, OR=3.4714), статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи.

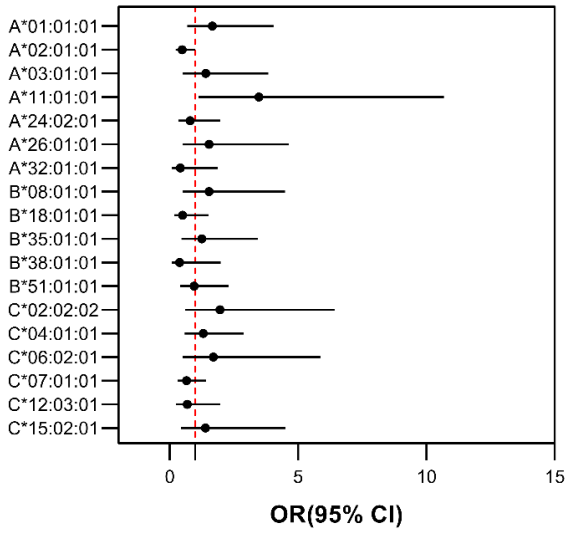
Таблица 12. Сравнителен анализ между групите на пациентите с HNSCC и здравите контроли. АЧ – алелна честота, OR (odd ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница), Pc – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

HLA алел HNSCC	***p*-стойност**	**OR**	**95% CI**	**Pc**
A*01:01:01	0.2638	1.6603	0.6823-4.0402	1.0000
A*02:01:01	0.0429	0.4802	0.2361-0.9767	0.3001
A*03:01:01	0.5049	1.4075	0.5153-3.8442	1.0000
A*11:01:01	0.0300	3.4714	1.1278-10.6849	0.2102
A*24:02:01	0.6307	0.8022	0.3266-1.9703	1.0000
A*26:01:01	0.4441	1.5404	0.5095-4.6575	1.0000
A*32:01:01	0.2519	0.4130	0.0910-1.8748	1.0000
B*08:01:01	0.4381	1.5315	0.5215-4.4971	1.0000
B*18:01:01	0.2194	0.5048	0.1696-1.5027	1.0000
B*35:01:01	0.6620	1.2520	0.4571-3.4293	1.0000
B*38:01:01	0.2564	0.3902	0.0768-1.9817	1.0000
B*51:01:01	0.9201	0.9566	0.4016-2.2784	1.0000
C*02:02:02	0.2670	1.9596	0.5974-6.4281	1.0000
C*04:01:01	0.5078	1.3079	0.5910-2.8943	1.0000
C*06:02:01	0.3980	1.7050	0.4948-5.8758	1.0000
C*07:01:01	0.2800	0.6525	0.3007-1.4158	1.0000
C*12:03:01	0.4910	0.6906	0.2408-1.9806	1.0000
C*15:02:01	0.5743	1.3998	0.4329-4.5266	1.0000
DPB1*02:01:02	0.6780	1.1749	0.5490-2.5144	1.0000
DPB1*03:01:01	0.0799	2.8238	0.8836-9.0242	0.3197
DPB1*04:01:01	0.3215	0.6823	0.3204-1.4529	1.0000
DPB1*04:02:01	0.1211	2.1817	0.8136-5.8502	0.4845
DQB1*02:01:01	0.5308	0.7392	0.2873-1.9017	1.0000
DQB1*02:02:01	0.6415	1.3045	0.4261-3.9938	1.0000
DQB1*03:01:01	0.3699	1.4573	0.6398-3.3198	1.0000
DQB1*03:02:01	0.4452	1.6721	0.4468-6.2581	1.0000
DQB1*05:01:01	0.3286	1.7617	0.5657-5.4869	1.0000
DQB1*05:02:01	0.8177	0.8948	0.3476-2.3033	1.0000
DQB1*05:03:01	0.4389	0.6053	0.1698-2.1577	1.0000
DQB1*06:03:01	0.9775	1.0169	0.3177-3.2551	1.0000
DRB1*03:01:01	0.4583	0.7001	0.2730-1.7959	1.0000
DRB1*07:01:01	0.6239	1.3416	0.4144-4.3438	1.0000
DRB1*11:01:01	0.2229	1.9246	0.6715-5.5157	1.0000
DRB1*11:04:01	0.2607	1.8153	0.6423-5.1302	1.0000

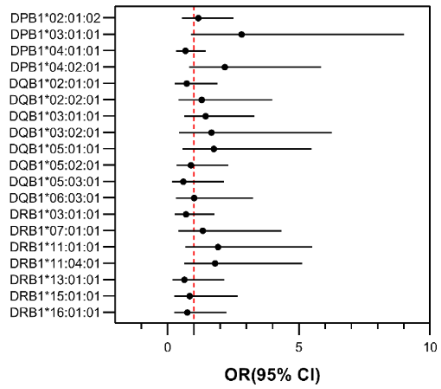
DRB1*13:01:01	0.4761	0.6426	0.1904-2.1687	1.0000
DRB1*15:01:01	0.7714	0.8423	0.2648-2.6796	1.0000
DRB1*16:01:01	0.6141	0.7553	0.2537-2.2484	1.0000



Фиг. 21. Разпределение на HLA клас I и клас II, при здрави контроли и пациентите с HNSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)



Фиг. 22.Асоциация на HLA клас I алелите с HNSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доврителня интервал (95% CI)

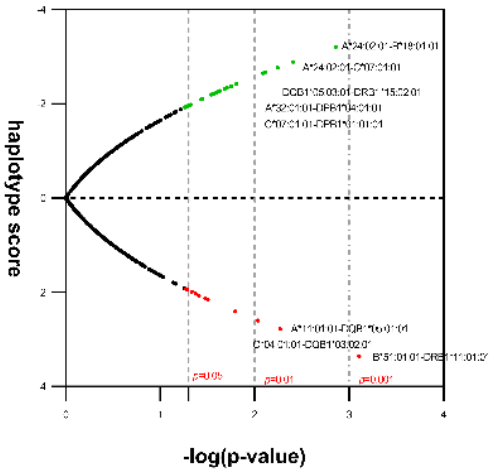


Фиг. 23.Асоциация на HLA клас II алелите с HNSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)

3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC

Поради силната LD в HLA региона и кодоминантната експресия на гените, за да се оцени по-комплексно ролята на HLA при конкретните заболявания, е направена и оценка на дву-локусните и три-локусните хаплотипи.

След извършения сравнителен анализ, на обединените групи пациентите с HNSCC, се установяват 42 класически HLA дву-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота ($p \leq 0,05$) (фиг. 24 и таблица 13).



Фиг. 24. Разпределение на HLA дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с HNSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

Таблица 13.Стастически значими HLA дву-лоусни хаплотипи при HNSCC

HLA дву-локусни хаплотипи HNSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*24:02:01-B*18:01:01	0	0.025497	-3.20148	0.00137
A*24:02:01-C*07:01:01	0.007264	0.024426	-2.88561	0.00391
A*02:01:01-C*12:03:01	0.011144	0.039872	-2.23965	0.02511
A*32:01:01-C*02:02:02	0.021053	0.006243	2.06816	0.03863
A*32:01:01-DPB1*02:01:02	0	0.010800	-2.64632	0.00814
A*32:01:01-DPB1*04:02:01	0	0.010179	-2.41913	0.01556
A*02:01:01-DPB1*04:02:01	0.039132	0.053147	-2.21768	0.02658
A*01:01:01-DPB1*04:01:01	0	0.039627	-1.93189	0.05337
A*02:01:01-DPB1*03:01:01	0.021666	0.013588	1.94559	0.0517
A*32:01:01-DPB1*04:01:01	0.021053	0.013150	2.15464	0.03119
A*01:01:01-DQB1*02:02:01	0.009765	0.017859	-2.21802	0.02655
A*11:01:01-DQB1*05:01:01	0.011264	0.013255	2.78509	0.00535
A*02:01:01-DRB1*03:01:01	0.015789	0.020479	-2.33565	0.01951
A*02:01:01-DRB1*13:01:01	0	0.022054	-1.97293	0.0485
A*02:01:01-DRB1*11:01:01	0.045674	0.028701	1.9924	0.04633
B*27:05:02-C*02:02:02	0	0.023121	-2.27158	0.02311
B*08:01:01-C*07:01:01	0.044798	0.068421	-1.94228	0.0521
B*49:01:01-C*07:01:01	0.010526	0.028902	-1.92334	0.05444
B*51:01:01-C*02:02:02	0.026316	0.005780	2.03236	0.04212
B*55:01:01-DPB1*02:01:02	0	0.11664	-2.25946	0.02385
B*27:05:02-DPB1*04:01:01	0	0.019090	-2.08828	0.03677
B*52:01:01-DQB1*05:03:01	0	0.009725	-2.24454	0.0248
B*27:05:02-DQB1*03:01:01	0	0.005170	-2.24082	0.02504
B*35:01:01-DQB1*03:01:01	0.007895	0.022283	-2.20131	0.02771
B*51:01:01-DQB1*05:03:01	0	0.003029	-2.18735	0.02872
B*35:02:01-DQB1*03:01:01	0.036842	0.014172	1.93102	0.05348
B*18:01:01-DRB1*11:04:01	0.010526	0.047299	-1.95221	0.05091
B*51:01:01-DRB1*11:01:01	0.042993	0.011382	3.3592	0.00078
C*07:01:01-DPB1*01:01:01	0	0.020636	-2.66416	0.00772
C*12:02:02-DPB1*04:02:01	0	0.006314	-1.94105	0.05225
C*12:02:02-DQB1*05:03:01	0.005263	0.010021	-2.36788	0.01789
C*07:01:01-DQB1*03:02:01	0	0.009657	-2.31517	0.0206
C*12:03:01-DQB1*03:01:01	0.006387	0.036362	-2.10146	0.0356
C*04:01:01-DQB1*05:01:01	0.055427	0.029951	2.12932	0.03323
C*04:01:01-DQB1*03:02:01	0.031579	0.015797	2.60472	0.00919
DPB1*02:01:02-DQB1*02:01:01	0	0.031520	-2.09873	0.03584
DPB1*04:02:01-DRB1*03:01:01	0	0.06637	-2.37321	0.01763
DPB1*02:01:02-DRB1*03:01:01	0	0.022537	-1.9309	0.0535

DPB1*04:01:01-DRB1*11:01:01	0.067608	0.024736	2.40712	0.01608
DQB1*05:03:01-DRB1*15:02:01	0	0.015561	-2.76465	0.0057
DQB1*02:01:01-DRB1*03:01:01	0.078947	0.101156	-1.97939	0.04777
DQB1*05:03:01-DRB1*14:54:01	0.015789	0.031792	-1.96882	0.04897

**ХЧ – хаплотипна честота*

В състава на дву-локусните хаплотипи, предоминантни HLA алели (срещащи се в повече от един хаплотип) в групата на пациентите с HNSCC са A*11:01:01, B*51:01:01 и DRB1*11:01:01. В контролната група, в състава на дву-локусните хаплотипи най-често се срещат: A*24:02:01 и C*12:02:02.

4. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC

От анализа на разпределението на три-локусните хаплотипи HLA-A-B-C, A-B-DRB1 и DPB1-DQB1-DRB1 между двете изследвани групи, се установяват 9 три-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота ($p \leq 0,05$) (таблица 14 и фиг. 25).

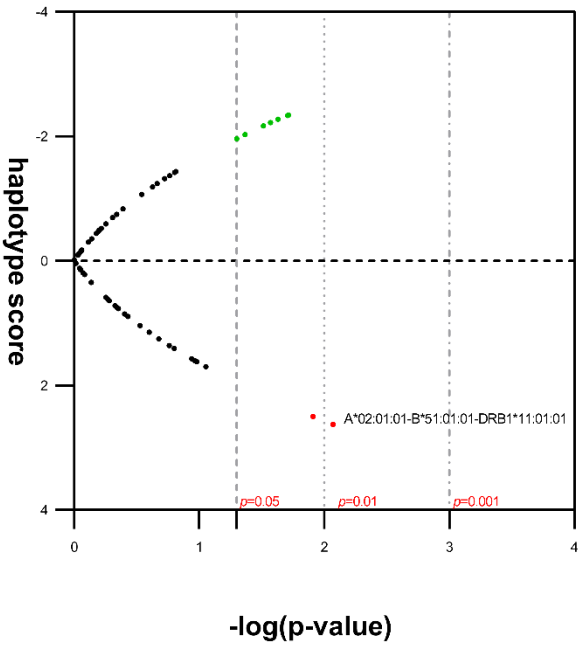
В състава на три-локусните хаплотипи, B*51:01:01 отпада като предоминантен HLA алел, но остава A*02:01:01. И тук продължава да се наблюдава връзката му със C*12:03:01 и A*02:01:01 алела. Запазват се и повечето асоциации на DRB1 алелите от дву-локусните хаплотипи.

Таблица 14. Статистически значими три-локусни хаплотипи асоциирани с HNSCC

HLA три-локусни хаплотипи HNSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*24:02:01-B*18:01:01-C*07:01:01	0.005263	0.020747	-2.3331	0.01964
A*02:01:01-B*38:01:01-C*12:03:01	0	0.019787	-2.26718	0.02338
A*24:02:01-B*18:01:01-DRB1*11:04:01	0	0.015896	-2.21564	0.02672
A*02:01:01-B*51:01:01-DRB1*11:01:01	0.036842	0.004039	2.6319	0.00849
DPB1*02:01:02-DQB1*03:01:01-DRB1*11:04:01	0.005609	0.027798	-2.33994	0.01929
DPB1*02:01:02-DQB1*02:01:01-DRB1*03:01:01	0	0.021534	-2.16378	0.03048
DPB1*02:01:02-DQB1*05:03:01-DRB1*15:02:01	0	0.008671	-2.02467	0.0429
DPB1*04:02:01-DQB1*02:01:01-DRB1*03:01:01	0	0.009338	-1.95994	0.05

DPB1*04:01:01-DQB1*03:01:01-DRB1*11:01:01	0.067631	0.030570	2.5049	0.01225

**ХЧ – хаплотипна честота*



Фиг. 25. Разпределение на HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1 три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с HNSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

IV. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на устната кухина и ларинкса – сравнителен анализ

1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при пациентите с OSCC и LSCC

1.1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC

В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на класическите HLA клас I гени при 47 пациента диагностицирани с OSCC от българската популация. Най-честите класически HLA клас I алели са: A*02:01:01 (20,2%), B*51:01:01 (15,1%) и

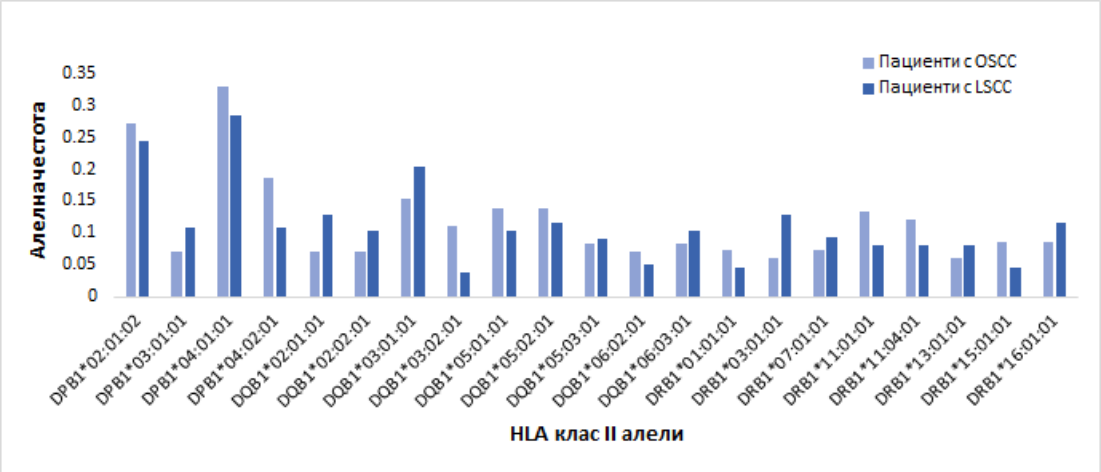
C*07:01:01 (10,5%) (фиг. 26). Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:04:01 (12,2%), DQB1*03:01:01 (15,3%), DPB1*04:01:01 (32,9%) (фиг. 27).

1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC

Разпределението на класическите HLA клас I гени изследвахме при 48 пациенти от българската популация, диагностицирани с LSCC. Най-честите класически HLA клас I алели при пациентите са: A*02:01:01 (17,4%), B*08:01:01 (10,9%) и C*04:01:01 (21,1%) (фиг. 26). Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:01:01 (10,7%), DQB1*03:01:01 (20,5%), DPB1*04:01:01 (28,4%) (фиг. 27).



Фиг. 26. Алелна честота на HLA клас I алелите на двете групи пациенти



Фиг. 27. Алелна честота на HLA клас II алелите на двете групи пациенти

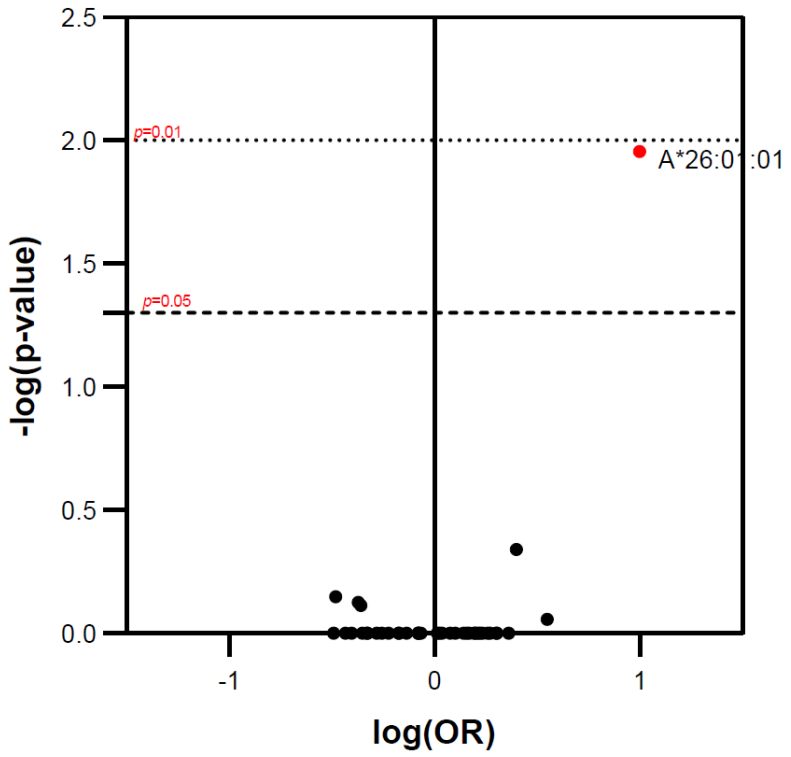
1.3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при двете групи пациенти

При извършения сравнителен анализ, между двете групи пациенти, с логистична регресия с вариабилни пол и възраст, се установяват статистически значими различия в алелното разпределение на класическите HLA (таблица 15). Алелът HLA-A*26:01:01 е със статистически значима силно повишена честота при групата на пациентите с OSCC (Pc=0.0111, OR=9.9980).

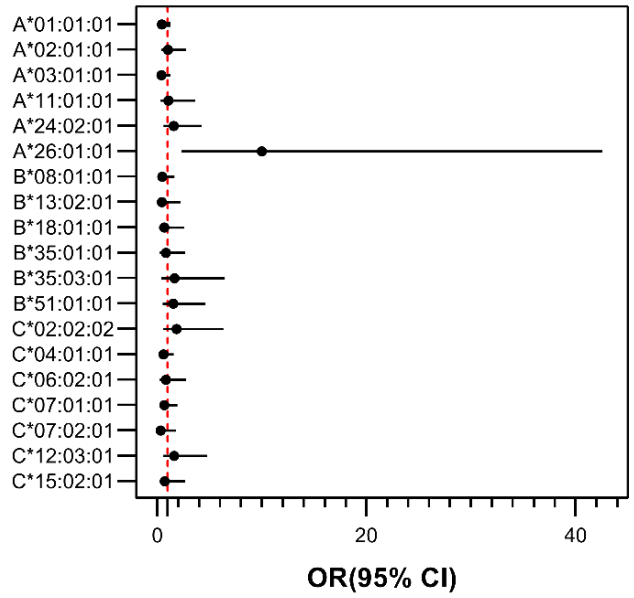
Таблица 15. Сравнителен анализ между двете групи пациенти с OSCC и LSCC. АЧ – алелна честота, OR (odd ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница), Pc – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

HLA алел	***p*-стойност**	**OR**	**95% CI**	**Pc**
A*01:01:01	0.1281	0.4379	0.1512-1.2685	0.7685
A*02:01:01	0.9458	1.0345	0.3892-2.7499	1.0000
A*03:01:01	0.1248	0.4257	0.1431-1.2668	0.7488
A*11:01:01	0.8948	1.0845	0.3259-3.6087	1.0000
A*24:02:01	0.3631	1.5799	0.5896-4.2332	1.0000
A*26:01:01	0.0018	9.9980	2.3466-42.5979	0.0111
B*08:01:01	0.2381	0.4709	0.1348-1.6454	1.0000
B*13:02:01	0.3235	0.4465	0.0901-2.2134	1.0000
B*18:01:01	0.5602	0.6698	0.1739-2.5797	1.0000
B*35:01:01	0.7608	0.8332	0.2574-2.6969	1.0000
B*35:03:01	0.4629	1.6643	0.4272-6.4841	1.0000
B*51:01:01	0.4192	1.5640	0.5284-4.6293	1.0000
C*02:02:02	0.3157	1.8662	0.5516-6.3135	1.0000
C*04:01:01	0.2995	0.5987	0.2272-1.5780	1.0000
C*06:02:01	0.7674	0.8348	0.2523-2.7619	1.0000
C*07:01:01	0.4599	0.6714	0.2333-1.9316	1.0000
C*07:02:01	0.2006	0.3230	0.0572-1.8235	1.0000
C*12:03:01	0.3818	1.6220	0.5487-4.7945	1.0000
C*15:02:01	0.6369	0.7322	0.2007-2.6712	1.0000
DPB1*02:01:02	0.5133	1.3879	0.5195-3.7080	1.0000
DPB1*03:01:01	0.2617	0.4700	0.1258-1.7566	1.0000
DPB1*04:01:01	0.4528	1.4748	0.5348-4.0667	1.0000
DPB1*04:02:01	0.1140	2.5034	0.8023-7.8111	0.4559
DQB1*02:01:01	0.1294	0.3682	0.1012-1.3393	1.0000
DQB1*02:02:01	0.1915	0.3940	0.0974-1.5939	1.0000
DQB1*03:01:01	0.2742	0.5529	0.1911-1.5995	1.0000
DQB1*03:02:01	0.0972	3.5440	0.7945-15.8088	0.8751
DQB1*05:01:01	0.5433	1.4293	0.4518-4.5215	1.0000

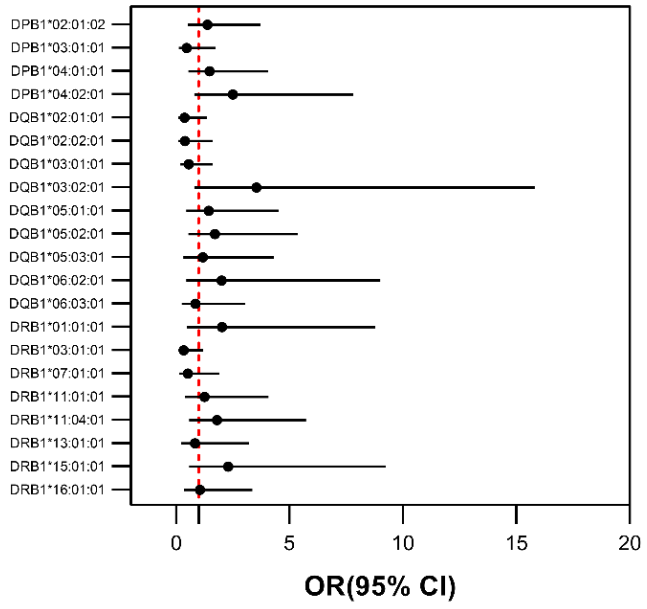
DQB1*05:02:01	0.3583	1.7090	0.5447-5.3618	1.0000
DQB1*05:03:01	0.7924	1.1890	0.3276-4.3150	1.0000
DQB1*06:02:01	0.3669	1.9993	0.4439-9.0048	1.0000
DQB1*06:03:01	0.8096	0.8561	0.2420-3.0282	1.0000
DRB1*01:01:01	0.3502	2.0170	0.4629-8.7900	1.0000
DRB1*03:01:01	0.0887	0.3308	0.0926-1.1823	0.7097
DRB1*07:01:01	0.3288	0.5230	0.1424-1.9208	1.0000
DRB1*11:01:01	0.6992	1.2603	0.3898-4.0754	1.0000
DRB1*11:04:01	0.3107	1.8130	0.5739-5.7273	1.0000
DRB1*13:01:01	0.7949	0.8361	0.2168-3.2241	1.0000
DRB1*15:01:01	0.2421	2.2968	0.5702-9.2513	1.0000
DRB1*16:01:01	0.9301	1.0533	0.3301-3.3612	1.0000



Фиг. 28. Разпределение на HLA клас I и клас II при двете групи пациенти. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)



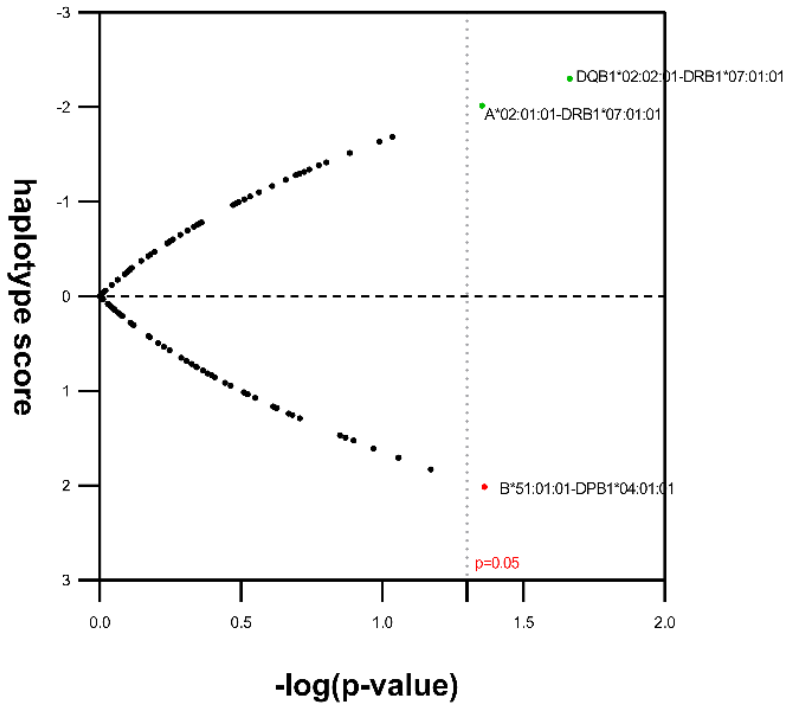
Фиг. 29.Асоциация на HLA клас I алелите с OSCC и LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)



Фиг. 30.Асоциация на HLA клас II алелите с OSCC и LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)

2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при двете групи пациенти

След извършения сравнителен анализ на двете групи пациенти се установяват 3 класически HLA клас дву-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота ($p \leq 0,05$) (фиг. 31 и таблица 16). Трябва да се отбележи, че и тук се наблюдава алелът A*02:01:01 и B*51:01:01 алелите в състава на установените дву-локусни хаплотипи с повишена честота, подобно на обединения анализ на групите пациенти.



Фиг. 31. Разпределение на HLA клас дву-локусните хаплотипи при двете групи пациенти. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

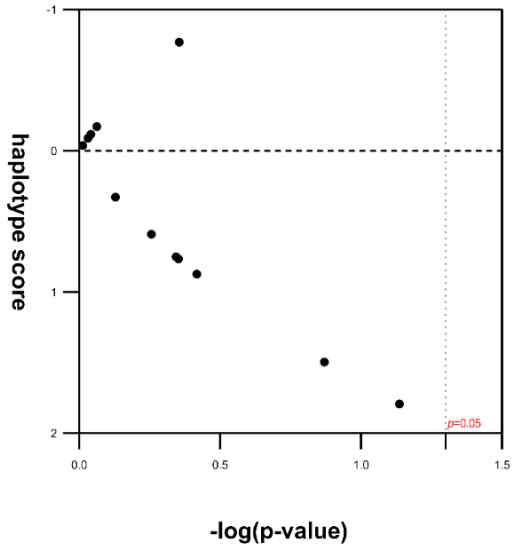
Таблица 16.Стастически значими HLA двулоусни хаплотипи при OSCC и LSCC

HLA дву-локусни хаплотипи	**ХЧ OSCC**	**ХЧ LSCC**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*02:01:01-DRB1*07:01:01	0.021277	0.063830	-2.01142	0.04428
B*51:01:01-DPB1*04:01:01	0.127660	0	2.01998	0.04339
DQB1*02:02:01-DRB1*07:01:01	0.053191	0.085106	-2.29658	0.02164

**ХЧ – хаплотипна честота*

3. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при двете групи пациенти

От анализа на разпределението на три-локусните хаплотипи не се установяват хаплотипи със статистически значима повишена честота (фиг. 32).

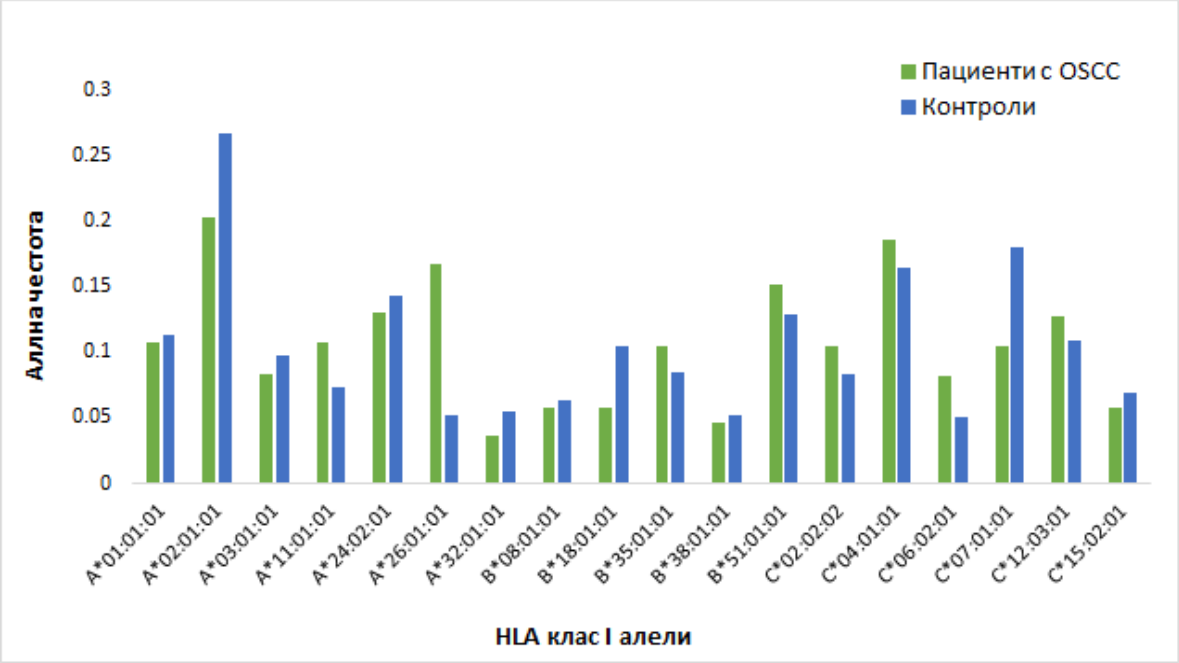


Фиг. 32. Разпределение на HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1 три-локусните хаплотипи при пациентите с OSCC и LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

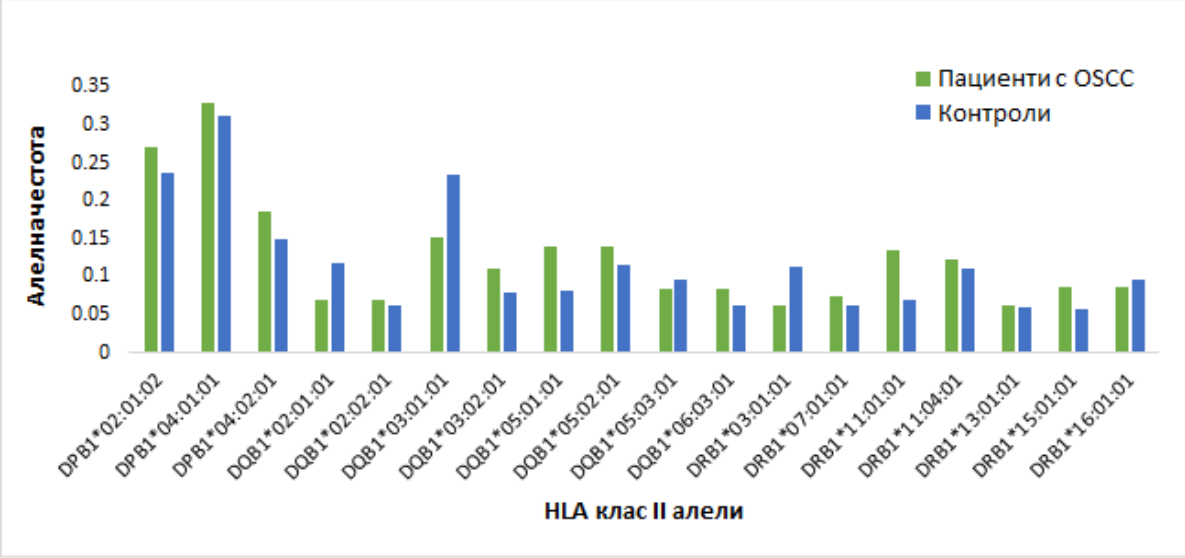
V. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при OSCC

1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC

В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на класическите HLA клас I гени при 47 пациента диагностицирани с OSCC от българската популация. Най-честите класически HLA клас I алели са: A*02:01:01 (20,2%), B*51:01:01 (15,1%) и C*07:01:01 (10,5%) (фиг. 33). Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:04:01 (12,2%), DQB1*03:01:01 (15,3%), DPB1*04:01:01 (32,9%) (фиг. 34).



Фиг. 33. Алелна честота на HLA клас I алелите на здравите контроли и пациентите с OSCC



Фиг. 34. Алелна честота на HLA клас II алелите на здравите контроли и пациентите с OSCC

2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с OSCC

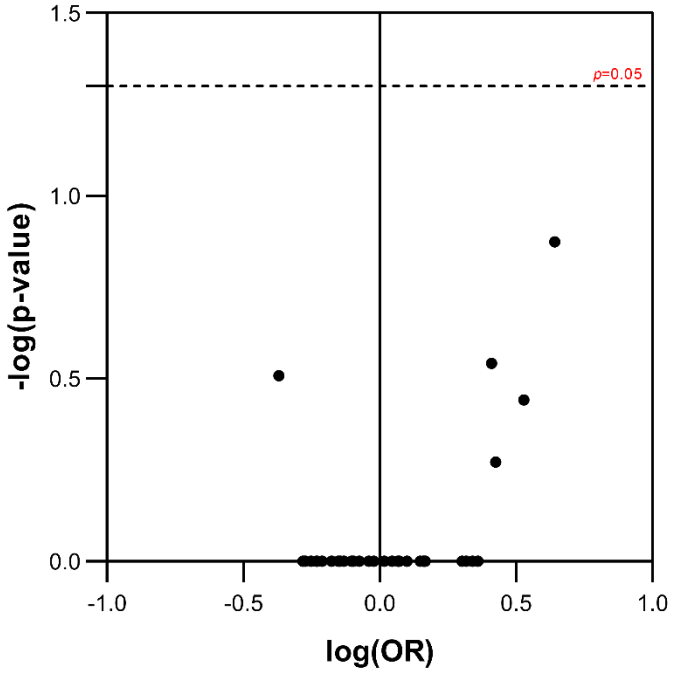
При извършения асоциативен анализ, между контролната група и групата на пациентите, с логистична регресия с вариабилни пол и възраст, не се установяват

статистически значими различия в алелното разпределение на класическите HLA (таблица 17). Резултатите ни показват потенциална протективна роля на A*02:01:01 алела (p=0.044; OR=0.42; 95%CI=0.18-0.98) и предразполагаща роля на A*11:01:01 (p=0.019; OR=4.39; 95%CI=1.27-15.13), сходно на обединения анализ. И тук алелът A*26:01:01 е с повишена честота при пациентите, но резултатът не достига статистически значима достоверност. След прилагане на корекция за множественост на Bonferroni, статистическата значимост на наблюдаваните разлики се губи.

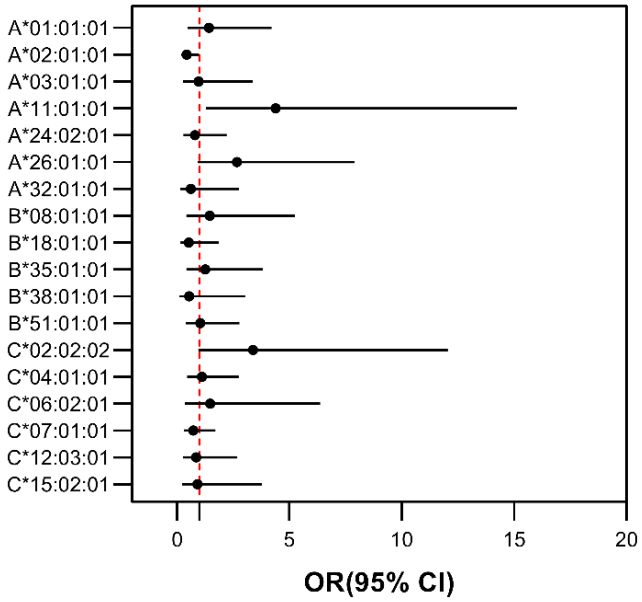
Таблица 17. Сравнителен анализ между групите на пациентите с OSCC и здравите контроли. АЧ – алелна честота, OR (odd ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница), Pc – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

HLA алел OSCC	***p*-стойност**	**OR**	**95% CI**	**Pc**
A*01:01:01	0.5363	1.4118	0.4732-4.2123	1.0000
A*02:01:01	0.0444	0.4268	0.1861-0.9789	0.3107
A*03:01:01	0.9392	0.9521	0.2701-3.3562	1.0000
A*11:01:01	0.0191	4.3904	1.2741-15.1290	0.1336
A*24:02:01	0.6533	0.7897	0.2819-2.2123	1.0000
A*26:01:01	0.0764	2.6705	0.9012-7.9137	0.5345
A*32:01:01	0.5250	0.6148	0.1372-2.7557	1.0000
B*08:01:01	0.5666	1.4538	0.4042-5.2287	1.0000
B*18:01:01	0.3153	0.5229	0.1475-1.8538	1.0000
B*35:01:01	0.6785	1.2627	0.4191-3.8038	1.0000
B*38:01:01	0.4788	0.5340	0.0941-3.0302	1.0000
B*51:01:01	0.9331	1.0428	0.3923-2.7722	1.0000
C*02:02:02	0.0603	3.3814	0.9487-12.0515	0.3616
C*04:01:01	0.8205	1.1099	0.4509-2.7322	1.0000
C*06:02:01	0.6040	1.4728	0.3410-6.3611	1.0000
C*07:01:01	0.4555	0.7183	0.3013-1.7126	1.0000
C*12:03:01	0.7717	0.8426	0.2650-2.6794	1.0000
C*15:02:01	0.9013	0.9141	0.2211-3.7798	1.0000
DPB1*02:01:02	0.3849	1.4625	0.6205-3.4474	1.0000
DPB1*04:01:01	0.6013	0.8031	0.3528-1.8280	1.0000
DPB1*04:02:01	0.0957	2.5732	0.8464-7.8227	0.2871
DQB1*02:01:01	0.3782	0.5874	0.1799-1.9179	1.0000
DQB1*02:02:01	0.4416	0.5894	0.1533-2.2658	1.0000
DQB1*03:01:01	0.7350	1.1718	0.4679-2.9346	1.0000
DQB1*03:02:01	0.2592	2.1938	0.5604-8.5890	1.0000
DQB1*05:01:01	0.2301	2.0765	0.6297-6.8480	1.0000
DQB1*05:02:01	0.7520	1.1824	0.4182-3.3430	1.0000
DQB1*05:03:01	0.4319	0.5608	0.1325-2.3725	1.0000

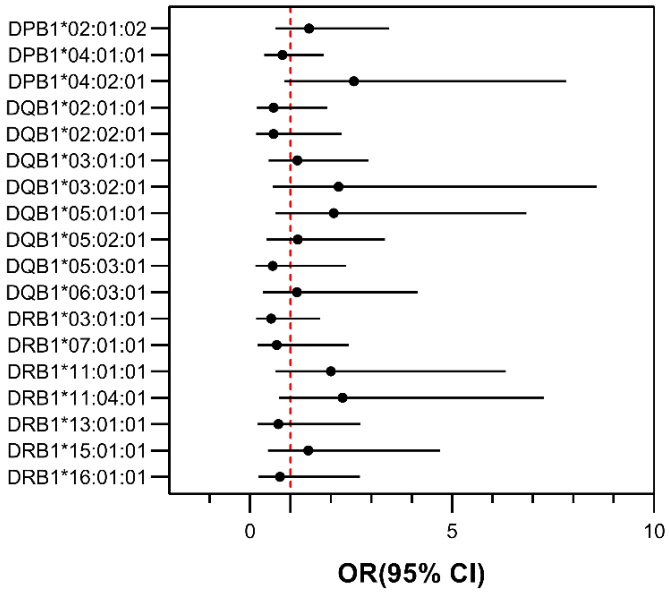
DQB1*06:03:01	0.8087	1.1695	0.3291-4.1555	1.0000
DRB1*03:01:01	0.2904	0.5244	0.1585-1.7352	1.0000
DRB1*07:01:01	0.5424	0.6663	0.1805-2.4596	1.0000
DRB1*11:01:01	0.2367	2.0030	0.6338-6.3300	1.0000
DRB1*11:04:01	0.1585	2.2949	0.7233-7.2813	1.0000
DRB1*13:01:01	0.6152	0.7060	0.1816-2.7443	1.0000
DRB1*15:01:01	0.5410	1.4455	0.4436-4.7101	1.0000
DRB1*16:01:01	0.6510	0.7400	0.2007-2.7279	1.0000



Фиг. 35. Разпределение на HLA клас I и клас II, при здрави контроли и пациентите с OSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)



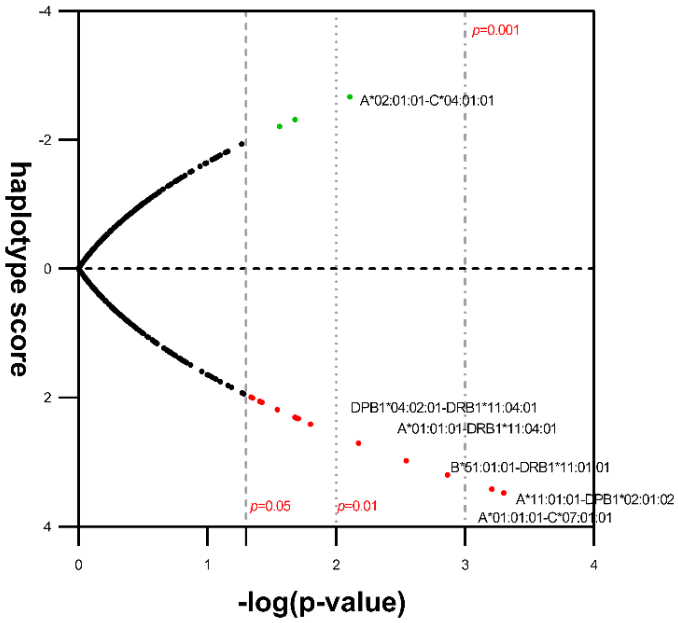
Фиг. 36. Асоциация на HLA клас I алелите с OSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)



Фиг. 37.Асоциация на HLA клас II алелите с OSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)

3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с OSCC

След извършения сравнителен анализ, при пациентите с OSCC, се установяват 17 класически HLA клас дву-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота (p≤0,05) (фиг. 38 и таблица 18).



Фиг. 38. Разпределение на HLA клас I и клас II дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)

Таблица 18.Стастически значими HLA двулоусни хаплотипи при OSCC

HLA дву-локусни хаплотипи OSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*02:01:01-C*02:02:02	0.031915	0	2.00985	0.04445
A*01:01:01-C*07:01:01	0.074468	0.037888	3.4228	0.00062
A*02:01:01-C*04:01:01	0.048776	0.036970	-2.66101	0.00779
A*01:01:01-DPB1*04:02:01	0.050458	0.016059	2.31227	0.02076
A*11:01:01-DPB1*02:01:02	0.062938	0.025559	3.4802	5.00E-04
A*02:01:01-DQB1*06:03:01	0	0.019619	-2.31269	0.02074
A*02:01:01-DRB1*11:01:01	0.074468	0.028043	2.06493	0.03893
A*01:01:01-DRB1*11:04:01	0.029353	0.007812	2.98314	0.00285

B*51:01:01-C*02:02:02	0.063830	0.003636	2.3332	0.01964
B*52:01:01-DQB1*06:01:01	0.012727	0.010638	1.94528	0.05174
B*51:01:01-DRB1*11:01:01	0.073608	0.014464	3.2036	0.00136
C*07:01:01-DPB1*04:01:01	0.021277	0.058426	-1.92801	0.05385
C*12:03:01-DPB1*04:01:01	0.049332	0.042412	2.32323	0.02017
C*02:02:02-DQB1*03:01:01	0.074468	0.010143	2.18972	0.02854
C*02:02:02-DRB1*11:01:01	0.063830	0.005974	2.41436	0.01576
DPB1*04:02:01-DQB1*03:01:01	0.046884	0.059922	1.92923	0.0537
DPB1*04:02:01-DRB1*11:04:01	0.050483	0.034626	2.71202	0.00669

**ХЧ – хаплотипна честота*

В състава на дву-локусните хаплотипи, предоминантни HLA клас I и клас II алели са A*02:01:01, B*51:01:01, DPB1*04:02:01 и DRB1*11:01/04:01, аналогично на обединения анализ на двете групи пациенти. Характерно за пациентите с OSCC е преобладаващия HLA-C алел C*02:02:02, участващ в няколко хаплотипа с повишена честота.

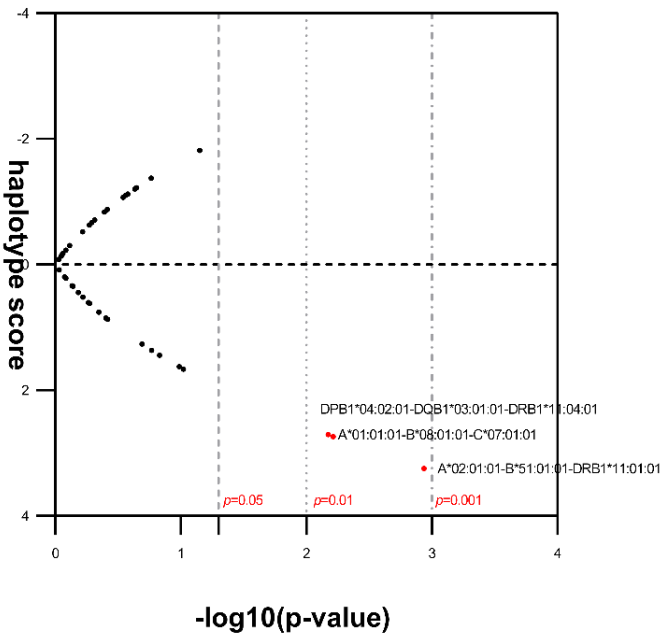
4. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC

След извършения сравнителен анализ, при пациентите с OSCC, се установяват 3 класически HLA клас три-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота в групата на пациентите ($p \leq 0,05$) (фиг. 39 и таблица 19).

Таблица 19. Статистически значими хаплотипи асоциирани с OSCC

HLA три-локусни хаплотипи OSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01	0.053191	0.036031	2.74302	0.00609
A*02:01:01-B*51:01:01-DRB1*11:01:01	0.063830	0.005860	3.25208	0.00115
DPB1*04:02:01-DQB1*03:01:01-DRB1*11:04:01	0.050930	0.035485	2.71202	0.00669

**ХЧ – хаплотипна честота*



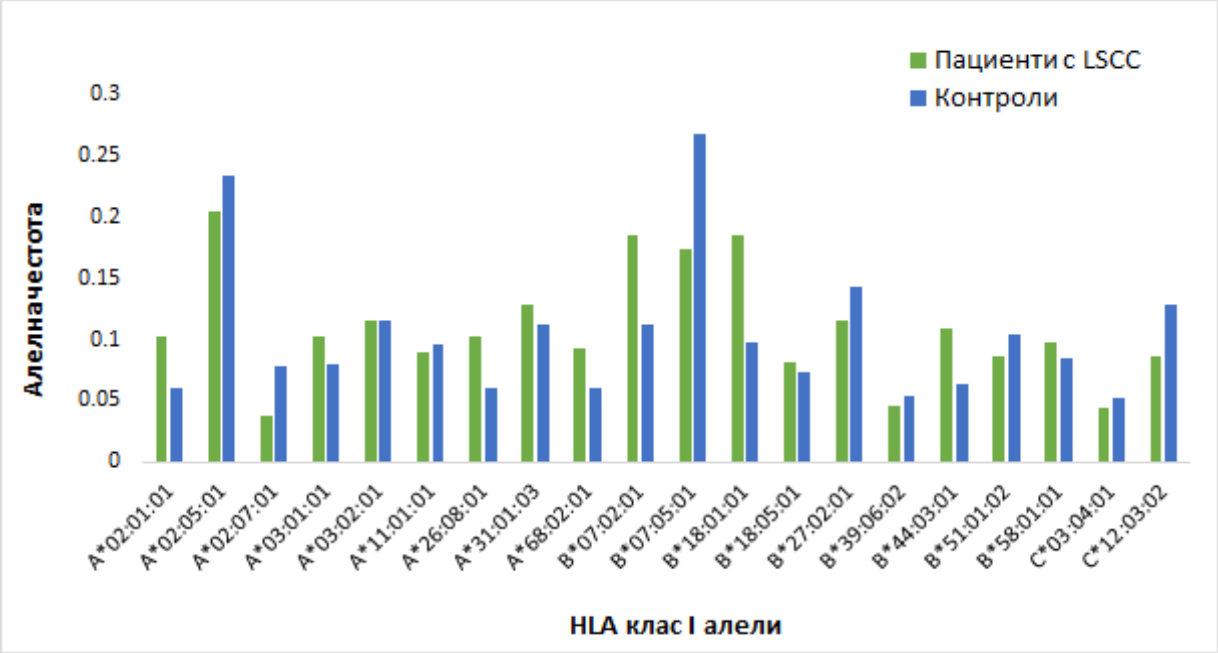
Фиг. 39. Разпределение на HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1 три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

VI. Роля на HLA полиморфизми при LSCC

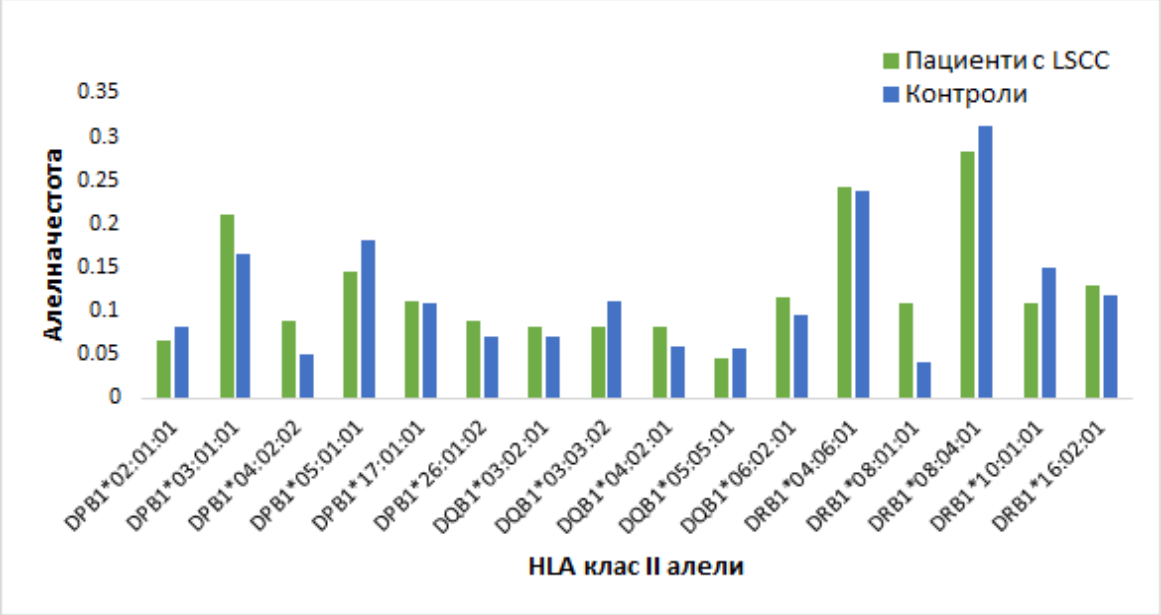
1. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при LSCC

1.1. Изследване на алелния полиморфизъм на HLA клас I и клас II гени при пациентите с LSCC

Разпределението на класическите HLA клас I гени изследвахме при 48 пациенти от българската популация, диагностицирани с LSCC. Най-честите класически HLA клас I алели при пациентите са: A*02:01:01 (17,4%), B*08:01:01 (10,9%) и C*04:01:01 (21,1%) (фиг. 40). Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1*11:01:01 (10,7%), DQB1*03:01:01 (20,5%), DPB1*04:01:01 (28,4%) (фиг. 41).



Фиг. 40. Алелна честота на HLA клас I при здравите контроли и пациентите с LSCC



Фиг. 41. Алелна честота на HLA клас II при здравите контроли и пациентите с LSCC

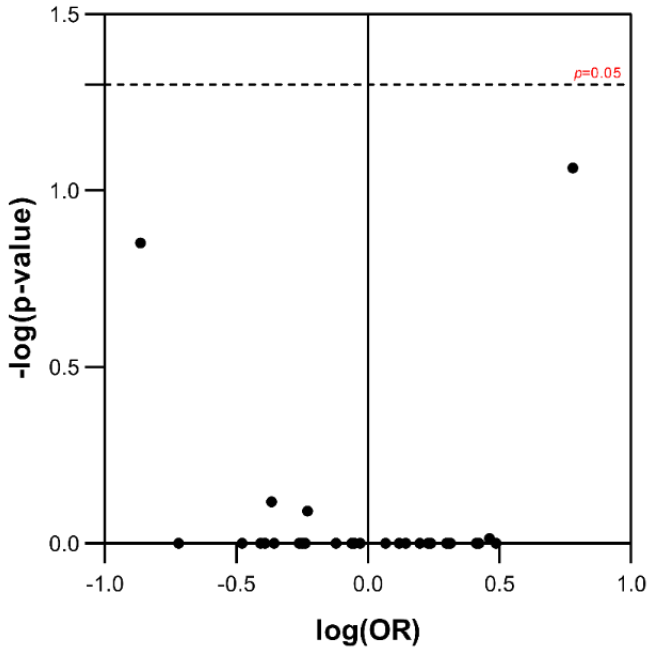
1.2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC

При извършения сравнителен анализ между контролната група и групата на пациентите, с логистична регресия, линеарен модел, за разлика от пациентите с OSCC, се установява повишена честота на HLA клас II алела DRB1*08:01:01(*p*=0.0173, OR=6.0174), но значимостта на наблюдаваната разлика се губи след прилагане на корекция за множественост на Bonferroni (Pc=0.0863) (Таблица 20).

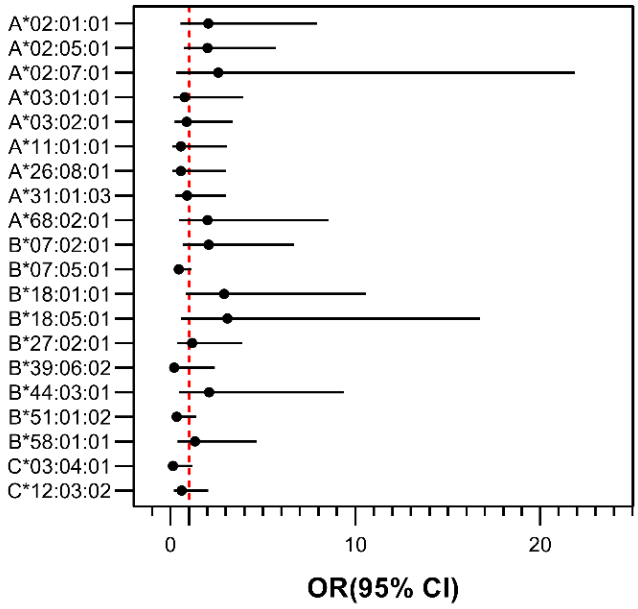
Таблица 20. Сравнителен анализ между групите на пациентите с LSCC и здравите контроли. OR (odds ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница), Pc – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

HLA алел LSCC	***p*-стойност**	**OR**	**95% CI**	**Pc**
A*02:01:01	0.3033	2.0394	0.5250-7.9223	1.0000
A*02:05:01	0.1910	2.0037	0.7069-5.6793	1.0000
A*02:07:01	0.3844	2.5809	0.3047-21.8574	1.0000
A*03:01:01	0.7409	0.7575	0.1460-3.9293	1.0000
A*03:02:01	0.8392	0.8702	0.2271-3.3344	1.0000
A*11:01:01	0.4921	0.5487	0.0990-3.0410	1.0000
A*26:08:01	0.4997	0.5639	0.1068-2.9762	1.0000
A*31:01:03	0.8515	0.8910	0.2662-2.9827	1.0000
A*68:02:01	0.3537	1.9939	0.4638-8.5710	1.0000
B*07:02:01	0.2282	2.0632	0.6352-6.7012	1.0000
B*07:05:01	0.0846	0.4315	0.1660-1.1215	0.7612
B*18:01:01	0.1075	2.8994	0.7932-10.5978	0.9673
B*18:05:01	0.1947	3.0715	0.5633-16.7490	1.0000
B*27:02:01	0.7988	1.1679	0.3542-3.8508	1.0000
B*39:06:02	0.1994	0.1908	0.0152-2.3958	1.0000
B*44:03:01	0.3388	2.0828	0.4631-9.3669	1.0000
B*51:01:02	0.1294	0.3329	0.0803-1.3796	1.0000
B*58:01:01	0.6673	1.3181	0.3741-4.6436	1.0000
C*03:04:01	0.0704	0.1365	0.0158-1.1805	0.1408
C*12:03:02	0.4048	0.5894	0.1699-2.0443	0.8096
DPB1*02:01:01	0.5761	0.5780	0.0846-3.9504	1.0000
DPB1*03:01:01	0.2024	1.9755	0.6935-5.6274	1.0000
DPB1*04:02:02	0.4927	1.7363	0.3590-8.3987	1.0000
DPB1*05:01:01	0.2628	0.5462	0.1895-1.5744	1.0000
DPB1*17:01:01	0.2401	0.4064	0.0905-1.8253	1.0000
DPB1*26:01:02	0.2234	2.6435	0.5528-12.6419	1.0000
DQB1*03:02:01	0.4716	1.5733	0.4581-5.4031	1.0000
DQB1*03:03:02	0.6575	1.3926	0.3221-6.0202	1.0000

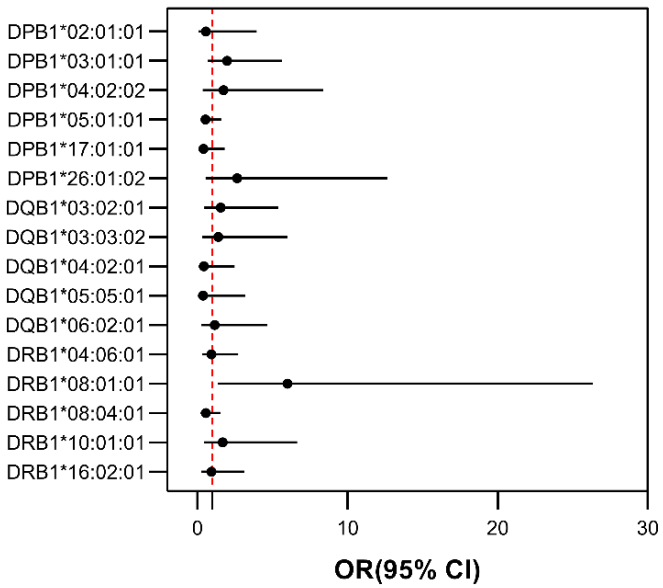
DQB1*04:02:01	0.3553	0.4409	0.0777-2.5032	1.0000
DQB1*05:05:01	0.3795	0.3907	0.0481-3.1767	1.0000
DQB1*06:02:01	0.8315	1.1629	0.2895-4.6717	1.0000
DRB1*04:06:01	0.9009	0.9342	0.3202-2.7257	1.0000
DRB1*08:01:01	0.0173	6.0174	1.3738-26.3578	0.0863
DRB1*08:04:01	0.2705	0.5690	0.2087-1.5512	1.0000
DRB1*10:01:01	0.4518	1.6925	0.4298-6.6651	1.0000
DRB1*16:02:01	0.9142	0.9355	0.2785-3.1428	1.0000



Фиг. 42. Разпределение на HLA клас I и клас II при здрави контроли и пациентите с LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)



Фиг. 43. Асоциация на HLA клас I алелите с LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)



Фиг. 44. Асоциация на HLA клас II алелите с LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)

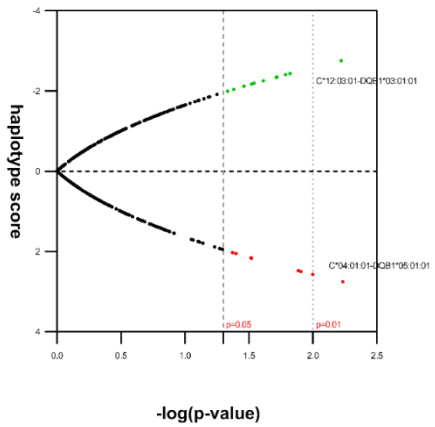
1.3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC

След извършения сравнителен анализ, при здравите контроли, се установяват 22 класически HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи със статистически значима повишена честота ($p \leq 0.05$) (фиг. 45 и таблица 21). Интересно е, че DRB1*08:01:01 не е част от установените хаплотипи.

Таблица 21. Стастически значими HLA дву-локусни хаплотипи при LSCC

HLA дву-локусни хаплотипи LSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*24:02:01-B*18:01:01	0	0.014085	-2.339	0.01934
A*11:01:01-B*35:01:01	0.049432	0.021127	1.95086	0.05107
A*02:01:01-C*12:03:01	0	0.067072	-2.1138	0.03453
A*01:01:01-C*15:02:01	0.020248	0.014085	2.02949	0.04241
A*03:01:01-C*12:03:01	0.062801	0	2.16796	0.03016
A*32:01:01-DPB1*02:01:02	0	0.021127	-2.40106	0.01635
A*11:01:01-DQB1*05:01:01	0.021127	0	1.93045	0.05355
A*02:01:01-DRB1*07:01:01	0.063830	0	2.5013	0.01237
B*08:01:01-C*07:01:01	0.085106	0.021127	-2.25114	0.02438
B*18:01:01-C*07:01:01	0.031915	0.056338	-1.99308	0.04625
B*51:01:01-DPB1*03:01:01	0.021127	0	2.05409	0.03997
B*35:02:01-DQB1*03:01:01	0.031915	0.028169	2.57493	0.01003
C*07:01:01-DPB1*01:01:01	0	0.007042	-2.18681	0.02876
C*12:03:01-DQB1*03:01:01	0	0.060138	-2.34422	0.01907
C*12:02:02-DQB1*05:03:01	0	0.156403	-2.03801	0.04155
C*06:02:01-DQB1*05:01:01	0.010638	0	2.16659	0.03027
C*04:01:01-DQB1*03:02:01	0.031915	0.010756	2.48435	0.01298
C*04:01:01-DQB1*05:01:01	0.074468	0.041371	2.75727	0.00583
C*12:03:01-DRB1*11:04:01	0	0.035211	-2.74768	0.006
DPB1*04:02:01-DQB1*03:02:01	0	0.021127	-2.1682	0.03014
DQB1*05:03:01-DRB1*15:02:01	0.065143	0.045212	-2.4313	0.01504
DQB1*02:02:01-DRB1*07:01:01	0.085106	0.035211	2.16399	0.03047

**ХЧ – хаплотипна честота*



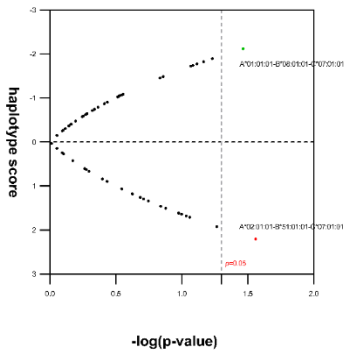
Фиг. 45. Разпределение на HLA дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

1.4. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC

От анализа на разпределението на три-локусните HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1, се установяват два три-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота ($p \leq 0.05$) при контролната група и групата на пациентите с LSCC (фиг. 46, Таблица 22).

Таблица 22. Стастически значими HLA три-локусни хаплотипи при LSCC

HLA три-локусни хаплотипи LSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	***p*-стойност**
A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01	0	0.060714	-2.11685	0.03427
A*02:01:01-B*51:01:01-C*07:01:01	0.010638	0	2.20507	0.02745



Фиг. 46. Разпределение на HLA три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

2. Роля на некласическите HLA Ib и MIC полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на ларинкса

2.1. Изследване на алелния полиморфизъм на некласическите HLA клас Ib и MIC гени при здрави индивиди и пациентите с LSCC

2.1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на некласическите HLA клас Ib гени (HLA-E, -F, -G, -H) и верижно свързаните MIC гени (MICA и MICB) при 63 здрави индивиди от българската популация. Най-висока степен на полиморфизъм от HLA Ib гените се установява за HLA-H с 12 алела. Най-честите некласически HLA клас Ib са: E*01:01:01 (54,7%), F*01:01:01 (74,2%), G*01:01:01 (42,9%), H*01:01:01 (34,8%). От MIC гените, по-висока степен на полиморфизъм се установява при MICA гена с 16 алела. Най-честите MIC алели са: MICA*008:01 (21,7%) и MICB*002:01 (36,7%) (фиг. 47).

2.1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC

Допълнително изследвахме разпределението на некласическите HLA клас Ib и MIC гени и при 48 пациенти от българската популация диагностицирани с LSCC. Отново най-висока степен на полиморфизъм при HLA Ib гените се установява за HLA-H с 11 алела. Най-честите некласически HLA Ib гени при пациентите са: E*01:01:01 (39,4%), F*01:01:01 (41,4%), G*01:01:01 (33,8%), H*02:04:01 (25,8%). От MIC гените, по-висока степен на полиморфизъм отново се наблюдава при MICA гена с 22 алела. Най-честите MIC алели са: MICA*008:01 (20,7%) и MICB*002:01 (30,9%) (фиг. 47).



Фиг. 47. Алелна честота на некласически HLA Ib и MIC алели при здравите контроли и пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса

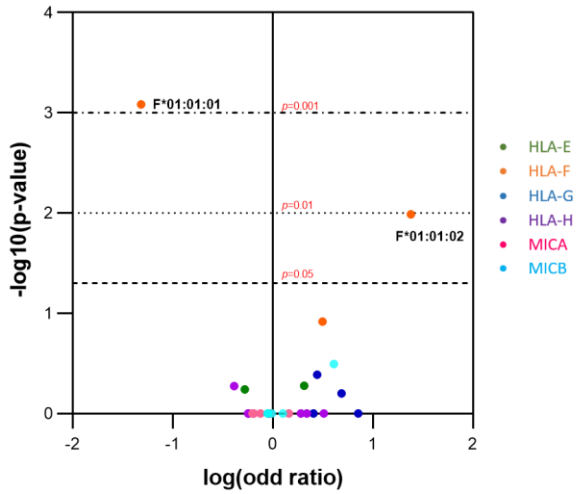
2.2. Сравнителен анализ на некласическите HLA клас Ib и MIC алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC

При извършения сравнителен анализ между контролната група и групата на пациентите с логистична регресия, линеарен модел се установяват две статистически значими различия в алелното разпределение на некласическите HLA Ib гени (таблица 23, фиг. 48 и 49). След прилагане на корекция за множественост на Bonferroni, HLA-F*01:01:01 се отличава със статистически значима повишена честота при здравите контроли (Pc=8.21e-04, OR=0.0485), а HLA-F*01:01:02 с повишена честота при пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса (Pc=0.0103, OR=24.0194). При HLA-F*01:03:01 статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи (*p*=0.0402, Pc=0.1205, OR=3.1422).

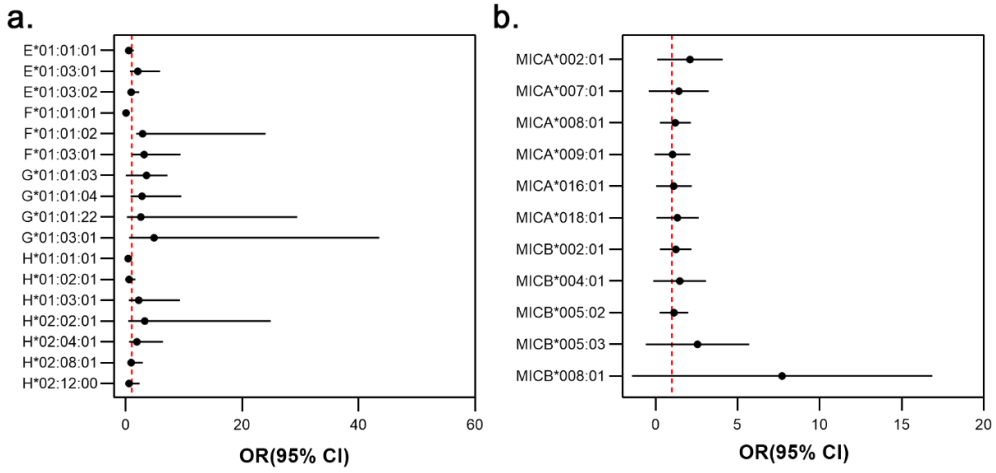
Таблица 23. Сравнителен анализ между групите на пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса и здравите контроли. АЧ – алелна честота, OR (odds ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница), Pc – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

Алел LSCC	***p*-стойност**	**OR**	**95% CI**	**Pc**
E*01:01:01	0.1916	0.5258	0.2003-1.3799	0.5747
E*01:03:01	0.1758	2.0651	0.7228-5.9005	0.5274
E*01:03:02	0.8424	0.9097	0.3577-2.3133	1
F*01:01:01	**2.74E-04**	**0.0485**	**0.0095-0.2474**	**8.21E-04**
F*01:01:02	**0.0034**	**24.0194**	**1.7842-2.8591**	**0.0103**
F*01:03:01	0.0602	3.1422	1.0527-9.3794	0.1205
G*01:01:03	0.9925	7.1492	NA	1

G*01:01:04	0.1026	2.7864	0.8141-9.5364	0.4104
G*01:01:22	0.4525	2.5534	0.2213-29.4548	1
G*01:03:01	0.1574	4.8628	0.5429-43.5551	0.6295
H*01:01:01	0.0757	0.4114	0.1544-1.0963	0.53
H*01:02:01	0.2944	0.5735	0.2029-1.6215	1
H*01:03:01	0.2863	2.1951	0.5174-9.3126	1
H*02:02:01	0.2549	3.2592	0.4263-24.9168	1
H*02:04:01	0.2934	1.9091	0.5714-6.3787	1
H*02:08:01	0.8974	0.9275	0.2952-2.9144	1
H*02:12:00	0.4354	0.5671	0.1363-2.3588	1



Фиг. 48. Разпределение на некласическите HLA Ib и MIC при здрави контроли и пациентите с LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо p-стойностите (p-value)



Фиг. 49. Асоциация на HLA некласическите алели с LSCC. Forest plot графиките изобразяват съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителня интервал (95% CI)

След провеждане на тест за зиготност (с точен тест на Фишер) (таблица 24), се установява че HLA-F*01:01:01 се асоциира с протективен ефект в хомозиготно състояние (*p*=4.10e-08, OR=0.0129).

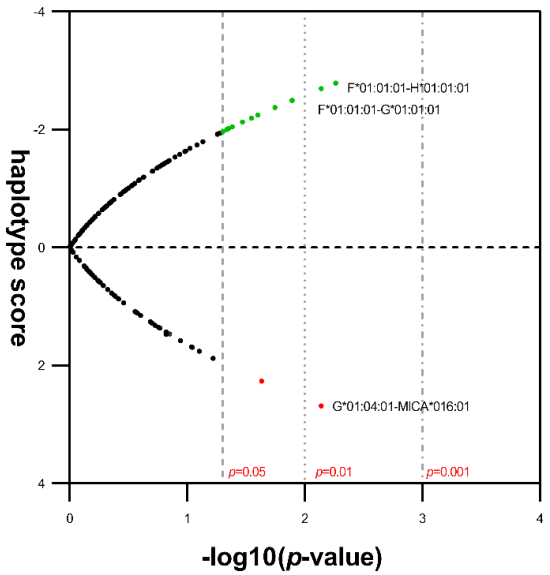
Таблица 24. Тест за зиготност на алелите асоциирани с LSCC

HLA алел	***p*-стойност хомозиготи**	***p*-стойност хетерозиготи**	**OR хомозиготи**	**OR хетерозиготи**	***p*-стойност зиготност**	**OR зиготност**
F*01:01:01	**4.10e-08**	1.0000	0.0129	0.9184	**2.06e-04**	0.0141
F*01:01:02	1.0000	0.0158	1.0000	0.3053	1.0000	3.2759

За да оценим по-прецизно ролята на F*01 алелите, проведохме и тест за взаимодействие между алелите. Резултатите сочат, че F*01:01:01 не е в неравновесна връзка (LD) с E*01:01:01, H*01:01:01 при пациентите и контролите, но се намира в LD с H*02:04:01 при пациентите. F*01:01:02 и H*01:01:01 се асоциират със заболяването и са в неравновесна връзка при контролите.

2.3. Сравнителен анализ на некласически HLA Ib и MIC дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC

Анализът за асоциация на LSCC с E-F, E-G, E-H, E-MICA, E-MICB, F-G, F-H, F-MICA, F-MICB, G-H, G-MICA, G-MICB, H-MICA, H-MICB, MICA-MICB хаплотипи показва статистически значима връзка на заболяването с 15 от 140 намерени хаплотипа показани на фиг. 50 и Таблица 25. Установеният протективен алел F*01:01:01 е част от 7 от статистически значимите хаплотипи асоциирани с LSCC – HLA-E*01:03:02-F*01:01:01 (хаплотипен скор= -2.49004, *p*=0.01277), E*01:01:01-F*01:01:01 (хаплотипен скор= -2.19210, *p*=0.02837), F*01:01:01-G*01:01:01 (хаплотипен скор= -2.68731, *p*=0.0072), F*01:01:01-H*01:01:01 (хаплотипен скор= -2.78009, *p*=0.00543), F*01:01:01-MICA*018:01 (хаплотипен скор= -2.04280, *p*=0.04107), F*01:01:01-MICA*004:01 (хаплотипен скор= -1.96365, *p*=0.04957), F*01:01:01-MICB*002:01 (хаплотипен скор= -2.24038, *p*=0.02507).



Фиг. 50. Разпределение на изследваните HLA хаплотипи в контролната група и пациентите с LSCC. Volcano plot визуализира корелацията между хаплотипния скор и p-стойността

Таблица 25. Стастически значими некласически HLA дву-локусни хаплотипи при LSCC

Хаплотип LSCC	**ХЧ пациенти**	**ХЧ контроли**	**Хаплотипен скор**	**p-стойност**
E*01:03:02-F*01:01:01	0.15625	0.19457	-2.49004	0.01277
E*01:01:01-F*01:01:01	0	0.39847	-2.19210	0.02837
E*01:01:01-G*01:06:01	0.03125	0.10076	-1.99524	0.04602
E*01:03:02-G*01:01:01	0.09617	0.21774	-1.93810	0.05261
E*01:03:01-G*01:04:01	0.08333	0.03076	2.26995	0.02321
E*01:03:02-H*01:01:01	0.04166	0.02223	-2.01044	0.04438
F*01:01:01-G*01:01:01	0.04432	0.33733	-2.68731	0.00720
F*01:01:01-H*01:01:01	0.16667	0.29365	-2.78009	0.00543
F*01:01:01-MICA*018:01	0.04167	0.05556	-2.04280	0.04107
F*01:01:01-MICA*004:01	0	0.04550	-1.96365	0.04957
F*01:01:01-MICB*002:01	0	0.23421	-2.24038	0.02507
G*01:01:01-H*01:01:01	0.13441	0.29365	-2.12370	0.03370
G*01:04:01-MICA*016:01	0.04167	0.03175	2.68682	0.00721
H*01:01:01-MICB*005:02	0	0.07844	-2.48700	0.01288
H*02:01:01-MICB*002:01	0	0.09193	-2.36746	0.01791

**ХЧ – хаплотипна честота*

ДИСКУСИЯ

1. HLA типизиране с NGS

В последните години редица проучвания са насочени към адаптиране и въвеждане на NGS технологиите в рутинната HLA диагностика. Изборът на NGS платформа се определя от капацитета на лабораторията, клиничната насоченост, допълнителното оборудвне, квалификацията и опита на персонала.

Основното предимство на GenDx NGS протокола за HLA типизиране е пълното покритие на всички гени от клас I и HLA-DPB1 гена (с изключние на интрон 1). Пълното покритие на HLA гените е от ключово значение за точното NGS типизиране, защото позволява разграничаването на неразграничимите алелни комбинации извън екзоните кодирщи антиген свързващите домени. Пълното покритие на изследваните гени, включително секвенирането на интронните региони, 5' и 3'-UTR, позволяват разграничаването на нулевите алели.

Неразграничимите алелни комбинации, които се получават при използването на други методи за HLA типизиране (напр. класическо Sanger секвениране), се елиминират с NGS, тъй като при него се покриват всички екзони, интрони и полиморфни позиции. Въпреки това, остава възможност за неразграничими алелни комбинации, тъй като полиморфизмите могат да се намират на големи разстояния, които не могат да бъдат секвенирани при настоящите условия.

Най-високият процент неразграничими алелни комбинации се устюновява за при *HLA-DRB1* и *–DQB1* гените (26.5% и 22.5%), което може да се обясни с ограниченията на настоящия протокол, при който съответните гени не се покриват напълно (фиг. 14). Протоколът покрива *DRB1* гена само от екзон 2 до екзон 3 и *DQB1* – от екзон 2 до 4. Въпреки това, GenDx предлагат индивидуални NGSgo-AmpX v2 HLA-DRB1/DQB1 (GenDx, Нидерландия) праймерни двойки, покриващи целите гени. Те могат да се използват за проверка на резултатите от HLA типизирането, когато вторият алел е по-нисък процент или за да се провери дали дадена проба е реално с хомозиготни алели. Подобно на други комерсиални китове, GenDx не покрива интрон 1 на DPB1 гена, поради дългата нуклеотидна секвенция (Таблица 4).

Покритието е основен NGS параметър, тъй като ако липсва покритие в основен регион на HLA гена, не може да се твърди че полученият генотип е коректния. Въпреки това, от всички HLA гени, покритието варира най-вече в началото и края на ампликоните, което е резултат от действието на фрагментиращите ензими. На фиг. 12 е представена дълбочината на покритие на гените, като в настоящото изследване с най-вариабилна дълбочина на покритието е *DRB1*. На фиг. 13 е изобразен алелният баланс, като най-голям дисбаланс в съотношението на двата алела се наблюдава при HLA-DRB1 и –DQB1, което най-вероятно се дължи на ниската концентрация и не доброто съотношение $A_{260}/_{280\ на}$ част от ДНК пробите.

NGSengine софтуерът за анализ използва йерархична стратегия за точкуване, с цел най-точното определяне на HLA алелите в пълна резолюция. Софтуерът използва два алгоритъма за определяне на фазата – класически и клъстерен, като клъстерният алгоритъм е зададен по подразбиране. И при двата резултатите са с точност над 95%.

Един от критериите за включване на даден метод в клиничната практика е работното време за изпълнение. В таблица 26 е представена съпоставка на използвания метод на GenDx с този на Omixon. Двата метода използват различни платформи, а именно – на Ion Torrent и Illumina.

Таблица 26. Сравнение на работния процес при методите на GenDx и Omixon

Етап	**GenDx NGSgo** *Работно време* (общо време)	**Omixon Holotype HLA**
Изолиране на ДНК	*10 мин.* (45 мин.)	*10 мин.* (45 мин.)
HLA амплификация	*60 мин.* (3 часа)	*35 мин.* (7 ч. 20 мин.)
Нормализиране на ампликоните	Измерване и нормализиране *30 мин.* (30 мин.)	Пречистване, измерване и нормализиране: *45 мин.* (45 мин.)
Подготовка на ДНК библиотеките	Фрагментиране и свързване с адаптори, комбиниране *15 мин.* (65 мин.)	Фрагментиране, поправка на крайщата, свързване на индекс адаптори, комбиниране и пречистване: *1 час и 10 мин.* (3 часа и 15 мин.)
Пречистване/селекция на ДНК библиотеките	Пречистване и селектиране размера на библиотеките чрез магнитни бедове: *10 мин.* (30 мин.)	Селектиране размера на библиотеките чрез PipinPrep: *15 мин.* (1 час)

Подготовка на пробите и секвениране	Измерване на библиотеките, секвениране чрез Ion Torrent: *15 мин.* (7 часа) Ion S5 секвениране *10 мин.* (5.5 часа)	Измерване на библиотеките и MiniSeq секвениране: *25 мин.* (30 часа)
Общо	*2 часа* (23 часа)	*3 часа и 25 мин.* (42 часа и 50 мин.)

Времето за амплификация на пробите е значително намалено при изследвания кит на GenDx, като от 7 часа се редуцира повече от двойно (в сравнение с протокола на Omixon), освен това протоколът за амплификация на клас I и клас II HLA гените е идентичен (Omixon използва два различни протокола за амплифицирането на двата класа *HLA* гени). Освен това в настоящия протокол липсва стъпка на пречистване на амплификатите, а измерването с цел уеднаквяване на концентрацията им не се прави на всички проби, а на три случайни представителни проби, спрямо които се изчислява необходимото количество от всеки ген за създаването на общ пул за всички гени на дадена проба. В сравнение с протокола на Omixon, фрагментирането и свързването с адапторите отнема значително по-кратко време, а в стъпката на пречистване се осъществява и селектирането на фрагменитие с желаната дължина чрез магнитен сепаратор с магнитни бедове, което изключва необходимостта от използване на допълнителна апаратура за сепариране и селекция на ДНК фрагменти (при другия протокол е необходимо използването на апарата PipinPrep). Секвенирането на подготвената ДНК библиотека на Ion Torrent NGS платформата (около 12 часа) също отнема по-малко време в сравнение с тази на Illumina (около 30 часа). Общото работно време за изготвяне на ДНК библиотеката е намалено с около един час при използвания метод на GenDx, в сравнение с този на Omixon. Сравнението на стъпките за подготовка на ДНК библиотеките с двата протокола е представено на таблица 27.

Таблица 27. Сравнение на стъпките за подготовка на ДНК библиотека между двата NGS метода

Стъпка	**GenDx NGSgo HLA**	**Omixon Holotype HLA**
Пост-PCR пречистване	-	ExoSAP-IT (PCR)
Количествено определяне на ампликоните	Измерване чрез Qubit	Измерване чрез qPCR
Обединяване на пробите	Нормализиране и обединяване на ампликоните	
Фрагментиране	Инкубация (PCR)	

Поправка на фрагментите (end repair)	-	Инкубация (PCR)
Добавяне на индекс адаптори	Инкубация (PCR)	
Обединяване на пробите и пречистване	Библиотеките се обядиняват и пречистват с магнитни микросфери	
Селекция на дължината на фрагментите	Селекция на дължината на фрагментите заедно с пречистването с бедовете	PippinPrep селекция на дължина на фрагментите 650÷1300bp
Количествено определяне на библиотеките	Измерване чрез Qubit	
Измерване на концентрацията на библиотеките		

Платформите на Illumina обаче са способни на т.нар. pair-end секвениране, което води до двупосочно четене за целевия регион, за разлика от секвенирането с единично четене (single read), извършвано при секвенирането на Ion Torrent, което може да доведе до грешки, свързани с хомополимерни инсерции или делеции.

Предимството от използването на платформата Ion Torrent, се дължи на по-краткото секвенционно време, отнемащо около 8 часа, протоколът на GenDx също се изпълнява за по-кратко време в сравнение на този на Illumina.

Поради значителния си полиморфизъм HLA системата, изследвана чрез генетични методи, е информативен маркер и в популационни изследвания и дава възможност за изясняване произхода и генетичните връзки между популациите. Въведеният метод за HLA типизиране с висока разграничителна способност позволява не само точното определяне на HLA полиморфизмите в отделните популации, но и установяването на редки алели и хаплотипи.

По отношение работния процес, ограниченията на PCR-базираните методи са високата чувствителност по отношение на изходната ДНК концентрация, необходимостта от залагане на няколко отделни амплификационни реакции за една проба и съответно по-висок риск от замърсяване. Предимствата на новата хибридизационна NGS технология са свързани с преодоляване на част от тези ограничения, които се изразяват в по-ниска чувствителност към концентрацията на изходната ДНК, възможност за улавяна на всички таргетни гени за дадена проба в една реакция, липса на PCR артефакти и хибридни алели, като за някои от локусите установяваме и намален процент неразграничими алелни

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

Подготовката на ДНК библиотека за секвениране на въведения за целите на настоящия дисертационен труд протокол AlloSeq Tx17 се извършва с помощта на т. нар. хибридизационна технология, която за разлика от стандартните PCR базирани протоколи, изключва възможността от формиране на свързани праймери, cross-over PCR продукти и др. Таргетните гени се улавят чрез хибридизация за къси фрагменти, които са закачени на повърхността на магнитни микросфери, комплементарни на консервативни участъци от изследваните гени. Въпреки това, недостатък е че AlloSeq Tx17 протоколът осигурява пълно покритие само на гените от HLA клас I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H), а на всички останали – само екзонно покритие, което може да доведе до неразграничими алелни комбинации.

Плътността на клъстерите върху флоу клетката (хиляди на mm^2) е основен критерий за оценка на качеството на получените данни. Разглежда се в комбинация с процента клъстери преминаващи през филтъра. В комбинация двата критерия могат да установят дали е възникнал проблем с прекалено ниска или висока концентрация на библиотеката. При Illumina, клъстерите се формират когато една молекула генерира единичен клъстер с чист сигнал в съответната секвенирана база. Процентът клъстери преминаващи през филтъра се изчислява от съотношението на базите с най-висок интензитет на светене разделени на сбора на базите с най-висок интензитет на светене и базите със следващия най-висок интензитет. Средната плътност на клъстерите от четирите секвенционни серии е 240 K/mm^2, а клъстерите преминаващи през филтъра са около и над 60% с изключение на четвъртата серия. При нея се наблюдава и по-ниско качество на базите (Q30=65%). Предполага се, че тези резултати се дължат на външни фактори по време на подготвянето на ДНК библиотеката. Хибридизационната NGS технология е чувствителна на температурни промени и е препръчително да се работи на стайна температура (20-22°C), а по време на работа в този момент температурните условия не бяха оптимални.

При HLA гените от клас I (класическите A, B, C и некласическите E, F, G и H) процентът Q30 е малко по-висок (средно 86-85%) в сравнение с този на останалите изследвани HLA гени (около 84%), но всички гени се характеризират с високо качество на прочитите (Q30≥84%) (фиг. 15).

Въпреки че настоящият протокол позволява покритие само на екзонните области от HLA клас II гените се наблюдават под 10% неразграничими алелни комбинации при всички изследвани гени (фиг. 18), с изключение на *DPB1,* при който процентът е значително по-висок (44,7%).

Поради значителния си полиморфизъм HLA системата, изследвана чрез генетични методи е информативен маркер и в популационни изследвания и дава възможност за изясняване произхода и генетичните връзки между популациите. Въведените ДНК методи с висока разграничителна способност позволяват не само точното определяне на HLA полиморфизмите в отделните популации, но и установяването на редки алели и хаплотипи.

2. Ролята на HLA при HNSCC – предразположеност и протективен ефект

Механизмите на имунно избягване са добре характеризирани и стоят в основата на туморообразуването. Вследствие, има множество установени биомаркери за целите на анти-раковата имунотерапия [108]. Известно е и че туморният растеж е резултат от дисбаланс в имунитета на гостоприемника [108] и поради тази причина е от голяма необходимост да се определят прогностични фактори и биомаркери, които да предскажат отговора и изхода от имунотерапиите [109]. Имунната система на пациентите с карцином на устната кухина и ларинкса обикновено е с изменения, но това зависи от различни рискови фактори като прекомерна консумация на алкохол, вирусни инфекции и напреднала възраст [109]. Множество изследвания се фокусират върху ролята на имунната регулация при канцерогенезата и лечението на HNSCC [110]. Въпреки това, понижаването на смъртността и увеличението на оцеляването до 5 години след поставяне на диагноза, остава неразрешен проблем [111]. Изясняването на молекулярните характеристики и механизми на прогресията на HSCC чрез методи като геномика, транскриптомика и белтъчен анализ,

ще позволи установяването на вероятни таргети за прогностични и терапевтични цели [109].

Плоскоклетъчният карцином на главата и шията (HNSCC) е основен фокус на повечето изследвания, а не конкретно карцинома на устната кухина (OSCC) или ларинкса (LSCC). Асоциативният анализ на HLA и HNSCC е най-често на класически клас I и клас II алели, но не и на некласически HLA. В допълнение, повечето изследвания са свързани с нивата на експресия на некласическите HLA молекули (основно HLA-E и –G) при туморна тъкан от HSCC. Изследванията за MIC молекулите също са фокусирани върху нивата на разтворимите MIC, а в контекста на полиморфизмите фокусът е върху късите тандемни повтори (STR).

HLA генотипните асоциации с рака имат връзка с афинитета на пептидното свързване на специфични генотипи. Поради тази причина се наблюдава специфично представяне на пептиди от HLA молекулите, в зависимост от съответстващите секвенции на аминокиселините в структурата на пептид свързващото място [30]. По-доброто оцеляване на пациентите може да се дължи на представяне на тумор-асоцииираните антигени и неоантигени, след което Т клетъчното разпознаване и цитотоксичната активност се повишава [30].

Широко разпространена е терорията, че разликите в продължителността на преживяемостта и ремисията при пациенти с ракови заболявания се дължи на разнообразния афинитет на свързване на HLA гликопротеините. Представянето на нео- и туморни антигени може да доведе до по-добро разпознаване от Т клетките и в резултат до по-висока цитотоксична активност, които имат връзка с подобреното оцеляване на пациентите [112].

В настоящият дисертационен труд, е извършен обединен анализ на двете групи пациенти с OSCC и LSCC (HNSCC), с цел увеличаване на статистическата сила на анализа. След проведеният асоциативен анализ на алелно ниво за връзката между *HLA* с HNSCC, не се установяват статистически значими алели. Статистическата значимост на протективния алел HLA-A*02:01:01 се губи след корекция за множественост на *p*-стойността (p=0.0429, Pc=0.3001, OR=0.4802). Алелът HLA-A*02:01:01 е вероятно протективен при пациентите от обединения анализ (HNSCC) и OSCC. В съответствие с получените данни, Dyckhoff и

сътрудници установяват, че немски пациенти с HNSCC носители на HLA*02:01:01 имат по-дълго време на ремисия след лечение (progression free survival) и стигат до заключението, че този алел има протективен ефект и носителите могат да се повлияят от Т-клетъчни имунотерапии [113].

Установено е, че $CD8^+$ Т клетките разпознават HLA-A*02 свързан с пептиди от онкопротеините EGFR и p53, което може да обясни наблюдаваното подобрение при HNSCC пациенти, носители на този алел [114]. Установената асоциация на HLA-A*02 с представянето на пептиди от EGFR и p53, алелът би могъл да бъде използван като маркер за селекция на пациенти, които ще се повлияят от имунотерапевтично лечение.

Този алел е установен и при други видове рак – като понижаващ риска от развитие на Ходжкинов лимфом свързан с инфекция с Епщайн Бар вирус при пациенти от Нидерландия. Смята се че HLA-A*02 молекулите се свързват със силен афинитет към пептиди, произхождащи от вируса, което води до разпознаването на вируса от $CD8^+$ Т клетките и съответно контрола и унищожаването на вируса. По този начин се намалява и риска от развитие на лимфом на Ходжкин в резултат на инфекция с EBV [115].

Tisch и сътрудници установяват, че немски пациенти с HNSCC, носители на HLA-A*11 са с ниска преживяемост [116], което съответства на получените от нас резултати за асоциация на алела A*11:01:01 като предразполагащ към HNSCC и OSCC, въпреки че статистическата значимост след корекция за множественост на *p* стойността се губи. В изследване на Konieczna [117] е установено че алелът A*11 понижава риска от оцелване в 3 годишен период при полски пациенти с рак на супраглотиса.

Хаплотипният анализ показва редица статистически значими хаплотипи, асоциирани с HNSCC, като преобладаващи алели са A*02:01:01, A*24:02:01, B*35:01:01, B*51:01:01. Получените данни в настоящия дисертационен труд се потвърждават от няколко други проучвания при пациенти, диагностицирани с различни видове рак на главата и шията.

Reinders и сътрудници установяват, че HLA-B*35 и HLA-B*40 се асоциират силно с рак на устната кухина при нидерландски пациенти с метастази. В допълнение към анализа на отделните алели, колективът е изследвал дали има асоциация с един или повече HLA-B-DRB1 хаплотипи, тъй като B*40 алелът се асоциира с групата на пациентите с рак на устната кухина, а B*35 алела с пациентската група с метастази [118].

В изследване на Wichmann и сътрудници, носителите на хаплотипа B*35-DQB1*03-DRB1*04, както и алелът B*51:01:01 се асоциират с преживяемост без прогресия (progression free survival – PFS) при немски пациенти с рак на главата и шията [119].

На хаплотипно ниво, установихме алелът A*11:01:01 в редица дву-локусни хаплотипи. Хаплотипът A*11:01:01-DQB1*05:01:01 се установява като предразполагащ при HNSCC (хаплотипен скор= 2.78509, p= 0.00535). Въпреки че алелът не е със статистически повишена честота при пациентите с LSCC, той се среща като преобладаващ при дву-локусния анализ. Хаплотъпът A*11:01:01-DQB1*05:01:01 аналогично на обединения анализ е установен като предразполагащ за LSCC (хаплотипен скор= 1.93045, p= 0.05355). Предразполагащ за LSCC е и A*11:01:01-B*35:01:01 (хаплотипен скор= 1.95086, p=0.05107), а за OSCC – A*11:01:01-DPB1*02:01:01 (хаплотипен скор= 3.4802, p=5.00e-04).

От извършения сравнителен анализ на двете групи пациенти с OSCC и LSCC се установява, че алелът HLA-A*26:01:01 е с повишена честота при пациентите с OSCC в сравнение с пациентите с LSCC. В голям брой проучвания алелът HLA-A*26 е описан като предразполагащ за болест на Бехчет [120, 121]. Болестта на Бехчет представлява системен васкулит с основен симптом – рецидивиращи язви на лигавицата на различни органи в тялото, включително устната кухина.

Резултатите от настоящия дисертационен труд сочат че не се открива асоциация на OSCC с определени HLA алели след корекция на p-стойността за можественост (Таблица 17, фиг. 35). Въпреки това, алелът HLA-B*51:01:01 е преобладаващ в установените статисически значими хаплотипи асоциирани с OSCC. Подобно на A*26, този алел се среща в литературата най-вече като предразполагащ към болестта на Бехчет. Няколко HLA-A и HLA-B алелни асоциации показват понижен или повишен риск от развитие на карцином на назофаринкса (НФК). Например, HLA-A*02-B*38 хаплотипът наблюдаван при Тайванската популация, повишава риска от развитие на НФК. Не може да се изключи че, гените локализирани близо до или в неравновесна връзка с HLA гените, дефинират асоциацията [122, 123].

От HLA клас II алелите, предоминантен в анализа на дву-локусните хаплотипи е DPB1*04, който е позитивно асоцииран с остра левкемия в изследването на Williams и сътрудници при пациенти англичани [124].

Алелът HLA-DRB1*11, участващ в редица хаплотипи предразполагащи към HNSCC и OSCC в настоящия дисертационен труд, е описан при тромботична тромбоцитопенична пурпура (TTP). Заболяването се характеризира с образуване на кръвни съсиреци в малките кръвоносни съдове. В резултат, броят на тромбоцитите и червените кръвни клетки намалява и от своя страна това води до нарушена функция на редица органи. TTP може да е с вторичен произход като един от предразполагащите фактори е наличието на раково заболяване [125].

В настоящия дисертационен труд не се установяват статистически значими класически HLA алели асоциирани с предразположеност към LSCC или протективен ефект, въпреки че DRB1*08:01:01 е с повишена честота при пациентите, но значимостта се губи след корекция на *p* стойността (p=0.0173, Pc=0.0863, OR=6.0174). DRB1*08 е описан като увеличаващ риска от развитието на назофарингеален карцином при азиатски пациенти [126].

От асоциативния анализ се установяват асоциации с някои от некласическите HLA гени и хаплотипи. Свръхекспресията на HLA-E се свързва не само с карцином на ларинкса, но и с инвазивни лезии и поради тази причина се приема като биомаркер за заболяването [127]. Високата експресия на HLA-G се наблюдава при премалигнени лезии в ларинкса и е понижена при малигнени, поради тази причина липсата й се приема като биомаркер/индикатор за малигнени лезии [127]. Данни за клиникопатологичното значение на HLA-F са по-ограничени, но се предполага че тази молекула има подобна имуносупресивна роля на HLA-E и –G. Наличието на некласически HLA Ib молекули предполага лоша прогноза [128].

HLA-H е псведоген и има малък брой изследвания в сравнение с функционалните HLA гени. Въпреки това, HLA-H има транскрипционна активност. Изказана е хипотеза, че HLA-H има толерогенна фукнция и участва в имунната хомеостаза, подобно на HLA-E, -F и –G [128].

По отношение на MIC асоциациите с раковите заболявания, MICA е най-изследваната молекула. MICA е известна като най-полиморфния некласически HLA клас I ген [129]. Нивата на експресия на MICA са изследвани при различни видове тумори, включително HNSCC [129]. Повишената регулация на MICA експресията корелира с

хистологичната степен, участието на лимфните възли и съдовата инвазия. Известно е и че експресията на MICA има роля при туморогенезата и развитието на плоскоклетъчния карцином на устната кухина (OSCC). Повишени нива на експресия на повърхностните и разтворими (sMICA и sMICB) MIC молекули са установени в серум от пациенти с различни виводе ракови заболявания [130].

Резултатите от настоящия дисертационен труд показват силна асоциация на LSCC с HLA-F*01:01:02 алела (Pc=0.0103, OR=24.0194), а F*01:01:01 е установен като алел с протективна роля (Pc=8.21e-04, OR=0.0485). Функциите на HLA-F все още не са напълно изяснени. Към днешна дата, 59 HLA-F алела, кодиращи 11 белтъка са описани. HLA-F*01:01 е доминантният алелен вариант. В нашата група на пациенти, HLA-F*01:01:01 е алелът с най-висока честота (АЧ при пациентите = 0.414, АЧ при контролите = 0.742). Двата HLA-F алела (F*01:01:01 и F*01:01:02), които са различно асоциирани с LSCC (респективно протективен и предразполагащ ефект), се различават в третото поле, при което има синонимни ДНК замени в кодиращия регион. Синонимните замени се смятат за „тихи“ мутации, тъй като засягат само ДНК и мРНК ниво и не са свързани с модификации в аминокиселините. Въпреки това, те имат влияние върху сплайсинга, стабилността на РНК, нагъването на РНК транслацията или ко-транслацията на белтъчното нагъване. Според Sharma и сътрудници [131], синонимните замени могат да повлияят на нивото на експресия на белтъците, дори нагъването. След като синонимните замени имат функционален ефект, ние предполагаме че пептид свързващия афинитет е различен при HLA-F*01:01:01 и HLA-F*01:01:02, което от своя страна води до различната им роля при риска от развитие и прогресия на LSCC.

Друг начин да се обясни различният ефект на двата HLA-F алела е че съществува хаплотип, наречен F*дистален-C, свързан с HLA-F*01:01:02 алели, а другите HLA-F алели F*01:01:01 и HLA-F*01:03, имат тясно свързани промоторни последователности. Въз основа на *in silico* анализи изглежда, че F*дисталният-C промотор свързва транскрипционните фактори по различен начин от другите HLA-F промотори. Индивидите, носещи хаплотипа F*дистален-C, изглежда имат по-високи нива на експресия на HLA-F иРНК [132].

Zhang и сътрудници установяват, че повишените нива на HLA-F корелират с понижен шанс за оцеляване при пациенти от Китай с ESCC [133]. HLA-F се свързва с

пептиди с характеристика на класически HLA клас I (Ia), но селекцията на пептидите е по-стриктна поради понижения полиморфизъм на HLA-Ib молекулите. HLA-F*01:01 представя пептиди главно от цитоплазмата и нуклеоплазмата. Най-често се свързват пептиди с дължина 16 аминокиселини. Но и сътрудници съобщават че N-терминалният край на пептидите не се закачва за пептид свързващото място [134]. Те установяват и че взаимодействието с KIR3DS1 рецептора на NK клетките води до забавяне на развитието на заболяването (в контекста на инфекция с HIV вирус) [134], но това може да обясни и протективната роля на HLA-F*01:01:01 при рака.

В настоящият дисертационен труд тестът за зиготност показва, че протективния алел HLA-F*01:01:01 се асоциира с LSCC в хомозиготна форма (p=4.10e-08, OR=0.0129). Това би могло да обясни протективната функция на този алел. От друга страна, HLA-F може да се свързва за инхибиторните рецептори ILT-2 (експресирани от NK клетките) и ILT-4 (експресирани на T и B клетките) и други имунни клетки (моноцити, макрофаги и дендритни клетки) [135]. Zhang и сътрудници изказват хипотезата, че това свързване може да има директен инхибиторен ефект върху имунните клетки и да влияе на тяхнтата функция в различни етапи на имунния отговор [135].

Тестът за взаимодействие показва че HLA-E*01:01:01 and HLA-F*01:01:01 имат комбинирано действие (p=7.18e-05, OR=0.06), а след хаплотипния анализ установихме статистически значимия хаплотип HLA-E*01:01:01-F*01:01:01, асоцииран с LSCC (p=0.02837). HLA-E*01:03:02-F*01:01:01 (p=0.01277) също е статистички асоцииран с LSCC. Установено е че HLA-E*01:03 and E*01:01 имат относителен пептиден афинитет, експресия на повърхността на клетките и потенциална литична активност на NK клетките, установено от Sullivan и сътрудници [136].

Barakat и сътрудници изследват асоциацията на LSCC с HLA-G полиморфизми при пациенти от Египет [137]. HLA-G има 8 екзона и 14-bp инсерция или делеция в 3‘ нетранслирания участък (UTR), отговорна за стабилността и сплайсинга на мРНК изоформите [137]. Те установяват асоциация между 14-bp делеция на HLA-G с LSCC [137]. В нашето изследване, HLA-G алелите не се асоциират със заболяването, но HLA-G участва в няколко статистически значими асоциирани хаплотипа (Таблица 19). HLA-G е част от хаплотипа HLA-F*01:01:01-G*01:01:01 (p=0.0072).

MIC полиморфизмите, асоциирани с HNSCC са основно изследвани в контекста на STR [138, 139]. Не установихме статистически значими алели, но MICA участва в два хаплотипа, включващи протективния HLA-F алел, който установихме – HLA-F*01:01:01-MICA*018:01 (p=0.04107) и HLA-F*01:01:01-MICA*004:01 (p=0.04957). Иванова и сътрудници изследват MIC полиморфизма асоцииран с OSCC при пациенти от българската популация [98]. Те установяват асоциация с MICB*002:01 алел, който е част от един от установените в този дисертационен труд хаплотипи – HLA-F*01:01:01-MICB*002:01 (p=0.020507).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плоскоклетъчият карцином на устната кухина представлява около 95% от от злокачествените заболявания на устната кухина. Плоскоклетъчният карцином на ларинкса е вторият най-често срещан рак на главата и шията. Тези видове неоплазии се характеризират с агресивен ход и значителна смъртност и засягат предимно хора на възраст между 50 и 70 години. Въпреки значителния напредък в сферата на диагностиката и грижата за пациентите, нивото на оцеляване 5 години след поставяне на диагнозата, значително намалява през последните десетилетия. Проучването на факторите и механизмите на развитие на изследваните заболявания са от съществено значение за разработването на ефективни, персонализирани терапевтични подходи. Поради ключовата роля на HLA комплекса в процесите на антигенно представяне, включително и на неоантигени и иницииране на антиген-специфичен имунен отговор, избягването на тумора от имунен надзор често е свързано със засягане на гените, респективно молекулите от този комплекс. Установените статистически значими асоциации на тези видове неоплазии с определените HLA алели и съответните хаплотипи, ще допринесат за избора на генетични маркери за заболяването. Данните в литературата за асоциациите между генетичния полиморфизъм на HLA, дефиниран на алелно ниво и плоскоклетъчния карцином на устната кухина и ларинкса са ограничени, като липсват проучвания в българската популация. Необходими са още изследвания в контекста на молекулярната генетика и имуногенетиката на този вид заболявания, с цел разработване на ефективни имунотерапии.

ИЗВОДИ

1. Оценката на GenDx протокола за NGS с Ion Torrent платформата показва, че методът се характеризира с по-лесно изпълнение, както и по-кратко технологично време в сравнение с други подобни протоколи.
2. Подобреният хибридизационен NGS подход на AlloSeq Tx 17 протокола елиминира необходимостта от селекция на фрагментите по размер с използването на плака. Настоящият протокол с ранно обединяване намалява стъпките на пипетиране с 46% в сравнение с оригиналния протокол. Методът се характеризира и с преодоляване на някои от ограниченията на PCR-базираните NGS подходи (алелен дисбаланс, отпадане на алели) и възможност за едновременно анализиране на по-голям брой HLA гени в една реакция.
3. Асоциация с плоскоклетъчния карцином на главата и шията се установява с алелите A*02:01:01 и A*11:01:01:01 както и редица статистически значими хаплотипи, като предоминантни алели са A*02:01:01, A*24:02:01 и описани в литературата като протективни за карциноми на главата и шията и A*11:01:01, B*35:01:01, B*51:01:01 и DRB1*11:01:01, описани като предразполагащи за HNSCC.
4. От сравнителния анализ между двете групи пациенти с плоскоклетъчен карцином на устната кухина и ларинкса на алелно ниво се установява повишена честота за A*26:01:01 при пациенти с OSCC, който е описан като предразполагащ за болест на Бехчет, характеризираща се с рецидивиращи язви, включително в устната кухина.
5. Асоциация с плоскоклетъчния карцином на устната кухина се установява с алелите A*02:01:01 и A*11:01:01:01 както редица статистически значими хаплотипи, като предоминантни алели са A*02:01:01 (описан в литературата като протективен при HNSCC) и B*51:01:01, DRB1*11:01:01/11:04:01 описани в литературата като предразполагащи към различни карциноми на главата и шията.
6. Асоциация с плоскоклетъчния карцином на ларинкса се установява с предразполагащия DRB1*08:01:01 както и редица статистически значими хаплотипи, като предоминантни алели са A*02:01:01 (описан в литературата като протективен при HNSCC), A*11:01:01 и B*51:01:01 описани в литературата като предразполагащи към различни карциноми на главата и шията.
7. Асоциация с плоскоклетъчния карцином на ларинкса се установява за некласическите HLA клас Ib и MIC гени: предразполагаща асоциация за HLA-F*01:01:02, докато HLA-F*01:01:01 се характеризира като протективен алел. Установени са 15 некласически дву-локусни хаплотипове, в 7 от тях участва установеният протективен HLA-F алел.

ПРИНОСИ

Приноси с потвърдителен характер

1. Оценен е GenDx протокол за NGS с Ion Torrent платформа за секвениране на 6 HLA гена (класическите клас I HLA-A, -B, -C и клас II HLA-DRB1, -DQB1 и –DPB1).
2. Оценен е подобрен протокол за секвениране от ново поколение AlloSeq Tx17 с ранно обединяване на пробите на 17 HLA гена (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA и MICB).
3. Проучено е алелното и хаплотипно разпределение на класическите HLA клас I и клас II гени при здрави индивиди и пациенти с плоскоклетъчен карцином на устната кухина от българската популация, дефинирани чрез използване на HLA типизиране с висока разграничителна способност.
4. Проучено е алелното и хаплотипното разпределение на класическите HLA клас I и клас II гени чрез обединен анализ на групите пациенти с плоскоклетъчен карцином на главата и шията и здравите индивиди от българската популация, дефнирани чрез използване на типизиране с висока разграничителна способност.

Приноси с оригинален характер

1. За пръв път са определени алели и хаплотипи на класически HLA гени при пациенти с плоскоклетъчен карцином на ларинкса от българската популация, които могат да се използват за предиктивни биомаркери за предразположеност или протекция.
2. За първи път е изследван алелният и хаплотипен полиморфизъм на некласическите HLA клас Ib (HLA-E, -F, -G, -H) и клас I свързаните MICA и MICB гени при пациенти с плоскоклетъчен карцином на ларинкса от българската популация.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Ormandjieva A. Immunomodulation of cancer by HLA molecules. Bulgarian Journal Of Clinical Immunology, 2020, vol. 13, issue 2, p. 35-45.
2. Ormandjieva A. Expression of the non-classical HLA-E, -F, -G molecules in the tumor microenvironment. Forum of Clinical Oncology, 2023, vol. 13, issue 1, p. 53-62. https://doi.org/10.2478/fco-2022-0008
3. Ormandjieva A., Yordanov S., Stoyanov H., Deliverska E., Shivarov V., Ivanova M. The Role of Non-classical and Chain-Related Human Leukocyte Antigen Polymorphisms in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Molecular Biology Reports, 2023, vol. 50, issue 9, p. 7245-7252. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08629-5 **Impact factor = 2.8**
4. Ormandjieva A., Ivanova M. Evaluation of a GENDX protocol for HLA NGS genotyping using the Ion Torrent sequencing platform. Acta Medica Bulgarica, 2023, vol. 50, issue 3, p. 11-17. https://doi.org/10.2478/amb-2023-0024

НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРАЗНИ С ТЕМАТА И ФИНАНСИРАЩИ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Конкурс “Млад изследовател-2021” на МУ София, Проект с вх. №: 7853/ 18.11.2020г, Договор № Д-126/04.06.2021г. на тема: “Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при орален спиноцелуларен карцином”.
2. Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2018 г. на Фонд научни изследвания (ФНИ), Проект №: Н23/7, Договор №9 КР-06-Н23/4 от 17.12.2018г. на тема: “Имуномодулиране на раковите заболявания от некласическите HLA молекули – MIC”.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Evaluation of a GENDX protocol for HLA NGS genotyping using the ion torrent sequencing platform. Anastasiya Ormandzhieva, Antoaneta Nedialkova, Ilina Todorova, Lidiya Tsitselkova, Tsvetelin Lukanov, Milena Ivanova. HLA, vol. 99, Issue 5, p511-512. 35-та конференция на Европейската федерация по имуногенетика и тъканна съвместимост (EFI), Амстердам, Холандия, 17-20.05.2022 ***Постер***
2. The role of non-classical and chain-related human leukocyte antigen polymorphisms in laryngeal squamous cell carcinoma. Anastasia Ormandjieva, Milena Ivanova. Kliment's Days, p105-106. Научна Конференция „Климентови дни" София, Биологически факултет, 04.11.2022 ***Постер***
3. Роля на полиморфизма на класическите клас I и клас II човешки левкоцитни антигени при плоскоклетъчен карцином на устната кухина. Анастасия Орманджиева, Станислав Йорданов, Христо Стоянов, Елица Деливерска, Милена Иванова. Научна конференция на Българската асоциация по клинична имунология (БАКИ), 16.12.2022 ***Доклад***
4. Спечелен конкурс на BioRender за най-добра научна фигура изработена с онлайн софтуерната програма на BioRender. Фигурата „Graph for a review article about the role of non-classical HLA in cancer" е една от наградените. Онлайн конкурс #MadeInBioRender 19.07.2022

Използвана литература:

1. “What Is Cancer?” *National Cancer Institute* https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

2. Stratton M, Campbell P, Futreal A. The cancer genome. *Nature.* 2009; 458(7239):719–24.

3. Fares J, Fares M, Khachfe H, et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1). http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x

4. Cabrera T, López-Nevot M, Gaforio J, et al. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2003; 52: 1-9.

5. Woulde G, Klein G, editors. Advances in Cancer Research. *Academic Press.* 2001; 83: 117–147.

6. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997; 18(2):89–95.

7. Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA and cancer: From research to clinical impact. *Immunol Today*. 1998; 19(12):539–42.

8. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 2009; 54:15–39.

9. Kennedy A, Ozbek U, Dorak M. What has GWAS done for HLA and disease associations? *Int J Immunogenet*. 2017; 44(5):195–211.

10. HLA Nomenclature. http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html

11. Milner C, Campbell R. Genetic organization of the human MHC class III region. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2001; 6.

12. Naumova E, Ivanova M. Major histocompatibility complex – facts, hypotheses, application in medicine. *Sofia, Litse*. 2006: 13-26.

13. Rizzo R, Fainardi E, Rouas-Freiss N, et al. The Role of HLA-Class Ib Molecules in Immune-Related Diseases, Tumors, and Infections. *J Immunol Res*. 2017: 2309574. http://dx.doi.org/10.1155/2017/2309574

14. Toni Ho G, Heinen F, Stieglitz F, et al. Dynamic Interaction between Immune Escape Mechanism and HLA-Ib Regulation. *Immunogenetics.* 2019; 1–25.

15. Kelly A, Monaco J, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature.* 1991; 353:571–3.

16. Denzin L, Angelo D, Hammond C, et al. Negative Regulation by HLA-DO of MHC Class II-Restricted Antigen Processing. *Science*. 1997; 278:106–9.

17. Herberg J, Sgouros J, Jones T, et al. Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur J Immunol*. 1998; 28(2):459–67.

18. Vogel F, Motulski A. Human Genetics: Problems and Approaches. *Berlin: Springer Science & Business Media*. 2010; 851.

19. Lewontin R, Kojima K. The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution*. 1960; 14(4):458–72.

20. Bodmer W. The HLA system: Structure and function. *Journal of Clinical Pathology*. 1987; 40:948–58.

21. Bach F. The HLA class II genes and products: the HLA-D region. *Immunol Today*. 1985; 6(3):89–94.

22. Robinson J, Barker D, Georgiou X, et al. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48(D1):D948–55.

23. Deres K, Beck W, Faath S, et al. MHC/peptide binding studies indicate hierarchy of anchor residues. *Cellular Immunology*. 1993; 151: 158–67.

24. Trombetta E, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*. 2005.

25. Lodish H, Berk A, Kaiser C. Molecular Cell Biology. *New York: W. H. Freeman*; 2016; 8: 1109–1115.

26. Schubert U, Antón L, Gibbs J, et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000; 404(6779):770–4.

27. Rock K, Shen L. Cross-presentation: Underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*. 2005; 207:166–83.

28. Joffre O, Segura E, Savina A, et al. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):557–69. http://dx.doi.org/10.1038/nri3254

29. Neefjes J, Jongsma M, Paul P, et al. Towards a systems understanding of MHC class i and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(12):823–36. http://dx.doi.org/10.1038/nri3084

30. Bertaina A, Andreani M. Major histocompatibility complex and hematopoietic stem cell transplantation: Beyond the classical HLA polymorphism. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2):1–14.

31. Williams T. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagnostics*. 2001; 3(3):98–104.

32. Edgerly C, Weimer E. The past, present, and future of HLA typing in transplantation. *Methods Mol Biol*. 2018; 1802:1–10.

33. Tinckam K. Basic Histocompatibility Testing Methods. *Core Concepts Ren Transplant*. 2012; 21–42.

34. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol*. 2012; 882:9–25.

35. Voorter C, Palusci F, Tilanus M. Sequence-Based Typing of HLA: An Improved Group-Specific Full-Length Gene Sequencing Approach. *Methods Mol Biol*. 2014; 1109:101–14.

36. Bravo-Egana V, Sanders H, Chitnis N. New challenges, new opportunities: Next generation sequencing and its place in the advancement of HLA typing. *Hum Immunol*. 2021; 82(7):478–87. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.01.010

37. Brown N, Merkens H, Rozemuller E, et al. Reduced PCR-generated errors from a hybrid capture-based NGS assay for HLA typing. *Hum Immunol*. 2021; 82(4):296–301.

38. Liu C. A long road/read to rapid high-resolution HLA typing: The nanopore perspective. *Hum Immunol*. 2021; 82(7):488–95. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.04.009

39. Dendrou, C, Petersen J, Rossjohn, J, et al. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18:325–339 https://doi.org/10.1038/nri.2017.143

40. Marino F, Semilietof A, Michaux J, et al. Biogenesis of HLA Ligand Presentation in Immune Cells Upon Activation Reveals Changes in Peptide Length Preference. *Front. Immunol*. 2020; 11:1981. doi: 10.3389/fimmu.2020.01981

41. Liu B, Shao Y, Fu R. Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immunity, Inflammation and Disease.* 2021; 9(2):340-350. https://doi.org/10.1002/iid3.416

42. Harrath A, Yacoubi B, Troudi W, et al. HLA class II polymorphism: Protective or risk factors to breast cancer in Tunisia? *Pathol Oncol Res*. 2006; 12(2):79-81.

43. Bonamigo R, Raquel V, Sebastiani Z, et al. *HLA and skin cancer*. 2012; 87(1):9-18.

44. Tertipis N, Villabona L, Nordfors C, et al. HLA-A-02 in relation to outcome in human papillomavirus positive tonsillar and base of tongue cancer. *Anticancer Res*. 2014; 34(5):2369-76.

45. Hu P, Zhou B, Luan A, et al. Polymorphisms of HLA-A and HLA-B genes in genetic susceptibility to esophageal carcinoma in Chaoshan Han Chinese. *Esophagus*. 2010; 23(1):46-52.

46. Hu J, Li L, Pang L, et al. HLA-DRB1*15:01 and HLA-DQB1*03:01 alleles are positively associated with HPV16 infection-related Kazakh esophageal squamous cell carcinoma in Xinjiang China. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(11):2135-41.

47. Yang H, Yu K, Zhang R, et al. The HLA-DRB1 allele polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol*.2016; 37(6):7119-28.

48. Lin Z, Xin Y, Dong Q, et al. Association between HLA-DRB1 alleles polymorphism and hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2010; 10:1-10.

49. Ma S, Wu J, Wu Z, et al. Relationship between HLA-DRB1 allele polymorphisms and familial aggregations of hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol*. 2016; 23(1): 1-7.

50. Ishigami, S, Arigami, T, Uenosono Y, et al. Cancerous HLA class I expression and regulatory T cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; (61)1663–1669. https://doi.org/10.1007/s00262-012-1225-5

51. Kocak B, Saribas S, Demiryas S, et al. Association between polymorphisms in HLA-A, HLA-B, HLA-DR, and DQ genes from gastric cancer and duodenal ulcer patients and cagL among cagA-positive Helicobacter pylori strains: The first study in a Turkish population. *Infect Genet Evol*. 2020; 82:1-41.

52. Tong F, Yu W, Liu H. Efficient association analysis between colorectal cancer and allelic polymorphisms of HLA DQB1 by comparison of age of onset. *Oncol Lett.* 2012; 3(3):517-9.

53. Gun F, Ozturk O, Polat A, et al. HLA class-II allele frequencies in Turkish breast cancer patients. *Med Oncol.* 2012; 29(2):466-71.

54. Mahmoodi M, Nahvi H, Mahmoudi M, et al. HLADRB1,- DQA1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in female patients with early onset breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2012; 18(1):49-55.

55. Qiu X, Zhang F, Chen D, et al. HLA-B*07 is a high risk allele for familial cervical cancer. *Asian Pacific J CancerPrev.* 2011; 12(10):597-600.

56. Liu Y, Zhang J, Jia Z, et al. The correlation between HLA-DRB1 and HLA-DQB1 gene polymorphisms and cytokines in HPV16 infected women with advanced cervical cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(7):11490-11495.

57. Howell W, Calder P, Grimble R. Symposium on Nutrition in the post-genomic era Plenary session 4: Genetic variation and diet-related disease. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61(4):447-56.

58. Gragert L, Fingerson S, Albrecht M, et al. Fine-mapping of HLA associations with chronic lymphocytic leukemia in US populations. *Blood.* 2014; 124(17):2657-65.

59. Beksac M, Gragert L, Fingerson S, et al. HLA polymorphism and risk of multiple myeloma. *Leukemia*. 2016; 30(11):2260-4.

60. Alcoceba M, Sebasti E, Mar L, et al. HLA specificities are related to development and prognosis of diffuse large Bcell lymphoma. *Blood*. 2016; 122(8):1448-55.

61. Thurin M, Cesano A. Biomarkers for Immunotherapy of Cancer. *Springer*. 2020; 325-350.

62. Cai L, Michelakos T, Yamada T, et al. Defective HLA class I antigen processing machinery in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2018; 67:999–1009. https://doi.org/10.1007/s00262-018-2131-2

63. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2002: 12(1):3-13. https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0404

64. del Campo A, Carretero J., Aptsiauri N, et al. Targeting HLA class I expression to increase tumor immunogenicity. *Tissue Antigens*. 2012; 79(2):147-154. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01831.x

65. Brown S. et al. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res*. 2014; 24:743–750.

66. Shukla A, Rooney M, Rajasagi M, et al. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(11):1152–8.

67. Menon A, Van Rhijn C, Morreau H, et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest*. 2004; 84:493–501.

68. Blom D, Luyten G, Mooy C, et al. Human leukocyte antigen class I expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38:1865–72.

69. Zia A, Schildberg F. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2001; 93:566–70.

70. Levin I, Klein T, Kuperman O, et al. The expression of HLA class I antigen in prostate cancer in relation to tumor differentiation and patient survival. *Cancer Detect Prev.* 1994; 18:443–5.

71. Cosman D, Mullberg J, Sutherland C, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 2001; 14:123.

72. Ormandjieva A. Immunomodulation of cancer by HLA molecules. *Bulgarian Journal Of Clinical Immunology*. 2020; 13(2): 35-45.

73. Seliger B, Kloor M, Ferrone S. HLA class II antigen-processing pathway in tumors: Molecular defects and clinical relevance. *Oncoimmunology.* 2017; 6(2):1–10. http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1171447

74. Ting JP TJ. Genetic control of MHC class II expression. Cell. 2002;109:S21-33.

75. Rosenzweig S. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005; 203:38-47.

76. Surmann E, Voigt A, Michel S, et al. Association of high CD4-positive T cell infiltration with mutations in HLA class II-regulatory genes in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Immunol*. 2015 ;64(3):357-66. doi: 10.1007/s00262-014-1638-4

77. Tomasi T, Magner W, Wiesen J, et al. MHC class II regulation by epigenetic agents and microRNAs. *Immunol Res*. 2010; 46:45-58.

78. Tomasi T, Magner W, Wiesen J, et al. MHC class II regulation by epigenetic agents and microRNAs. *Immunol Res*. 2010; 46:45-58.

79.Epidemiology and risk factors for head and neck cancer - UpToDate. https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-risk-factors-for-head-and-neck-cancer

80. Leemans C, Snijders P, Brakenhoff R. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(5):269–82. http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.11

81. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halec G, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108(6):1–12.

82. Seiwert T, Zuo Z, Keck M, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(3):632.

84. Brouns E, Baart J, Karagozoglu K,et al. Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. *Oral Dis*. 2014; 20(3):19–24.

85. Zhang L, Poh C, Williams M, et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles-validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res*. 2012; 5(9):1081–9.

86. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017; 355(6331):1330–4.

87. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010; 70(23):9969–78.

88. Faber A, Barth C, Hörmann K, et al. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2011; 26(2):321–6.

89. Partlová S, Bouček J, Kloudová K, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2015; 4(1):965570. https://doi.org/104161/21624011.2014.965570

90. Ward M, Thirdborough S, Mellows T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2014; 110(2):489–500.

91. Yu S, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol*. 2020; 235(1):65–73.

92. Zhang Q, Shi S, Yen Y, et al. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010; 289(2):151–60.

93. Ferris R, Whiteside T, Ferrone S. Immune Escape Associated with Functional Defects in Antigen-Processing Machinery in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(13):3890–3895. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2750

94. Kim H, Ha S, Hong M, *et al.* PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep.* 2016*;* **6**:36956. https://doi.org/10.1038/srep36956

95. Costa N, Valadares M, Souza P, et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013; 49(3):216–23.

96. Moy J, Moskovitz J, Ferris R. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2017; 76:152–66.

97. Canning M, Guo G, Yu M, et al. Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7(APR):52.

98. Ivanova M, Al Hadra B, Yordanov S, et al. Associations of high-resolution-typing-defined MICA and MICB polymorphisms, and the levels of soluble MICA and MICB with Oral Squamous Cell Carcinoma in Bulgarian patients. *J Oral Pathol Med*. 2021;50(8):758-765. doi: 10.1111/jop.13185

99. Ivanova M, Creary L, Al Hadra B, et al. 17th IHIW component "Immunogenetics of Ageing" – New NGS data. *Human Immunology*. 2019; 80(9):703-713

100. SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.

101. Champely S (2020). pwr: Basic Functions for Power Analysis. R package version 1.3-0, <https://CRAN.R-project.org/package=pwr>.

102. Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.

103. Yanhui Fan, You-Qiang Song. (2016) PyHLA: tests for association between HLA alleles and diseases. BMC Bioinformatics. 2017. 18:90

104. JP S, DJ S (2024). haplo.stats: Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.9.5.1, <https://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>.

105. R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

106. Zlatev A, Ivanova M, Michailova S, Mihaylova A, Naumova E. Bulgarian bone marrow donors registry - Past and future directions. *Cell Tissue Bank*. 2008; 9(4):347–51.

107. 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(6):496–504.

108. Ferris R. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(29):3293–304.

109. Bradford C, Ferlito A, Devaney K, Mäkitie A, Rinaldo A. Prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2020; 5(1):74–81.

110. Wang X, Cao K, Guo E, et al. Assessment of immune status of laryngeal squamous cell carcinoma can predict prognosis and guide treatment. *Cancer Immunol Immunother*. 2022; 71(5):1199–220.

111. Song L, Zhang S, Yu S, et al. Cellular heterogeneity landscape in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2020; 147(10):2879–90.

112. Yarchoan M, Johnson A, Lutz, E, et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2017; 569.

113. Dyckhoff G, Herold-Mende C, Scherer S, et al. Human Leucocyte Antigens as Prognostic Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2022; *14*: 3828. https://doi.org/10.3390/cancers14153828

114. Albers A, Qian X, Kaufmann A, et al. Phenotype of p53 wild-type epitope-specific T cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Sci Rep*. 2018; 8: 10716.

115. Niens M, Jarrett R, Hepkema B. HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007; 110 (9):3310–3315. https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-086934

116. Tisch M, Kyrberg H, Weidauer H, et al. Human leukocyte antigens and prognosis in patients with head and neck cancer: Results of a prospective follow-up study. *Laryngoscope*. 2002; 112:651–657.

117. Konieczna A, Turowski G. HLA-ABC antigens in supraglottic cancer patients and their relationship with incidence and survival. *Mater Med Pol.* 1993; 25(2):73–9.

118. Reinders J, Rozemuller E, Otten H, et al. HLA and MICA associations with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2007; 43(3):232–40.

119. Wichmann G, Herchenhahn C, Boehm A, et al. HLA traits linked to development of head and neck squamous cell carcinoma affect the progression-free survival of patients. *Oral Oncol.* 2017; 69:115–27.

120. Nakamura J, Meguro A, Ishii G. The association analysis between HLA-A*26 and Behçet's disease. *Sci Rep*. 2019; 9:1–8.

121. Capittini C, Rebuffi C, Lenti M, et al. Global Meta-Analysis on the Association between Behcet Syndrome and Polymorphisms from the HLA Class I (A, B, and C) and Class II (DRB1, DQB1, and DPB1) Genes. *Dis Markers.* 2021.

122. Hildesheim A, Apple R, Chen C, et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst.* 2002.

123. Lu C, Chen J, Jin Y, et al. Genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma within the HLA-A locus in Taiwanese. *Int J Cancer*. 2003.

124. Williams, Hawys B, Turner. The novel HLA-DRB1*03:01:01:05 and -DPB1*04:02:01:21 alleles identified in patients with acute leukemia. *HLA: Immune Response Genetics*. 2022; 99(6):650.

125. Zouré A, Amegnona L, Zongo N. Carriage of HLA-DRB1*11 and 1*12 alleles and risk factors in patients with breast cancer in Burkina Faso. *Open Life Sciences*. 2021;16(1): 1101-1110. https://doi.org/10.1515/biol-2021-0113

126. Yang H, Yu K, Zhang R, et al. The HLA-DRB1 allele polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol.* 2016; 37:7119–7128. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5051-9

127. Silva T, Crispim J, Miranda F, et al. Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness. *Histol Histopathol*. 2011; 26(12):1487–97.

128. Kochan G, Escors D, Breckpot K, et al. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology*. 2013;2(11).

129. Wichmann G, Lehmann C, Herchenhahn C, et al. Development of a human leukocyte antigen score to predict progression-free survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Front Oncol.* 2018; 8:1–8.

130. Salih H, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients. *Hum Immunol*. 2006; 67(3):188–95.

131. Sharma Y, Miladi M, Dukare S, et al. A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat Commun*. 2019; 10:2569. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10489-2

132. Buttura R, Ramalho J, Lima T, et al. HLA-F displays highly divergent and frequent haplotype lineages associated with different mRNA expression levels. *Human Immunology*. 2019; 80(2):112-119. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.10.016

133. Zhang X, Lin A, Zhang J. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *IJC*. 2013; 132(1):82-89.

134. Hò G, Heinen F, Huyton T, et al. HLA-F*01:01 presents peptides with N-terminal flexibility and a preferred length of 16 residues. *Immunogenetics*. 2019; 71(5–6):353–60.

135. Sato E, Olson S, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(51):18538–43.

136. Sullivan L, Clements C, Rossjohn J, et al. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*. 2008; 72(5):415–24.

137. Barakat G, Elsharkawy A, Nabiel Y. Human leucocyte antigen–G gene polymorphism in laryngeal squamous cell carcinoma patients in Mansoura University Hospitals. Egypt J Basic Appl Sci [Internet]. 2021;8(1):214–21. Available from: https://doi.org/10.1080/2314808X.2021.1943804

138. Reinders J, Rozemuller E, Otten H, et al. HLA and MICA associations with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007; 43(3):232–40.

139. Reinders J, Rozemuller E, van der Ven K, et al. MHC Class I Chain-Related Gene A Diversity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Hum Immunol*. 2006; 67(3):196–203.

БЛАГОДАРНОСТИ

Отправям най-искрените си благодарности към:

Михаил Ангелов, MSc (Отдел „Молекулярна физиология на стреса“, Център по растителна системна биология и биотехнология, Пловдив) за съветите при работа с програмните езици R и Python.

Зорница Павлова, PhD (Сектор „Молекулярна генетика“, ГМДЛ "Геника", София) за съдействието със статистическите анализи обозначени в Таблица 3 за пол (*p*-стойност (Хи-квадрат) и възраст (*p*-стойност (t-тест).

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА АВТОРСТВО

Декларирам, че представеният дисертационен труд на тема:

„Имуномодулиране на раковите заболявания от HLA“ е моя разработка в качеството ми на редовен докторант към Катедра по Клинична имунология на Медицински факултет при Медицински университет – София, с база за обучение Клиника по Клинична имунология с банка за стволови клетки УМБАЛ „Александровска“-ЕАД.

С научен ръководител:
Проф. Милена Иванова Иванова-Шиварова, д.м.

Всички биологични проби, включени в настоящия дисертационен труд са предоставени от научния ръководител проф. Милена Иванова Иванова-Шиварова, д.м. за изработване на дисертационния труд и публикуване на резултатите в публикациите по темата на дисертационния труд.

Авторът декларира, че всички изследвания, анализи и графичното им представяне са оригинални и извършени лично от докторанта.

Използваните литературни източници са цитирани точно и с означаване на авторството им.

Никаква част от настоящия дисертационен труд не е била представяна в този вид в същата или в друга институция за висше образование или академия за присъждане на образователна или научна степен и по никакъв начин не накърнява чужди авторски права.

Декларатор: Анастасия Иванова Орманджиева