

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**

**Анастасия Иванова Орманджиева**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация**  
**за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”**  
**на тема**

**ИМУНОМОДУЛИРАНЕ НА РАКОВИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ ОТ НЛА**

**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, д.м.**  
**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.

*Забележка: Поредните номера на таблиците и фигурите в автореферата не отговарят на тези в дисертационния труд.*

## Съдържание:

<b>Използвани съкращения:</b> .....	6
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	9
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	10
I. МАТЕРИАЛИ .....	10
II. МЕТОДИ .....	11
1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв .....	11
2. Измерване концентрацията на ДНК с Qubit флуорометър .....	12
3. Методи за HLA типизиране с NGS .....	14
3.1. GenDx NGSgo .....	14
3.2. AlloSeq Tx 17 .....	20
4. Статистически методи .....	29
<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	31
I. Оценка на методи за NGS на класически и неklasически HLA гени .....	31
1. Оценка на GenDx метод за NGS с платформа Ion Torrent .....	31
2. Оценка на AlloSeq Tx17 метод за NGS с протокол за ранно обединяване на пробите .....	34
II. Изследване на равновесието на Харди-Вайнберг .....	38
III. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при HNSCC .....	38
1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при здрави индивиди и при пациентите с HNSCC .....	38
1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация .....	38
1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с HNSCC .....	39
2. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с HNSCC .....	40
3. Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC .....	41
4. Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с HNSCC .....	42
IV. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на устната кухина и ларинкса – сравнителен анализ .....	43
1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при пациентите с OSCC и LSCC .....	43
1.1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC .....	43
1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC .....	43

1.3.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при двете групи пациенти ...	44
2.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при двете групи пациенти .....	46
3.	Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при двете групи пациенти.....	47
V.	Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при OSCC .....	47
1.	Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC .....	47
2.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с OSCC .....	48
3.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с OSCC .....	50
4.	Сравнителен анализ на HLA три-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC .....	51
VI.	Роля на HLA полиморфизми при LSCC .....	52
1.	Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при LSCC .....	52
1.1.	Изследване на алелния полиморфизъм на HLA клас I и клас II гени при пациентите с LSCC	52
1.2.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC .....	53
1.3.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC.....	54
1.4.	Сравнителен анализ на HLA клас I и клас II три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC.....	55
2.	Роля на неklasическите HLA Ib и MIC полиморфизми при плоскоклетъчен карцином на ларинкса.....	55
2.1.	Изследване на алелния полиморфизъм на неklasическите HLA клас Ib и MIC гени при здрави индивиди и пациентите с LSCC .....	55
2.1.1.	Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация.....	55
2.1.2.	Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC .....	56
2.2.	Сравнителен анализ на неklasическите HLA клас Ib и MIC алелните честоти при здравите контроли и пациентите с LSCC .....	56
2.3.	Сравнителен анализ на неklasически HLA Ib и MIC дву-локусни хаплотипи при здрави контроли и пациенти с LSCC.....	58
	<b>ДИСКУСИЯ</b> .....	60
1.	HLA типизиране с NGS .....	60
2.	Ролята на HLA при HNSCC – предразположеност и протективен ефект.....	63
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	70
	<b>ИЗВОДИ</b> .....	71

<b>ПРИНОСИ.....</b>	<b>72</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>73</b>
<b>НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА И ФИНАНСИРАЩИ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>73</b>
<b>УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....</b>	<b>74</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>75</b>
<b>ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА АВТОРСТВО.....</b>	<b>76</b>

## 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
MHC	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 reaction	полимеразна верижна реакция
SNP	single nucleotide polymorphisms	единични нуклеотидни полиморфизми
TCR	T cell receptor	T клетъчен рецептор

### На кирилица:

АТФ	аденозин трифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
ЕР	ендоплазмен ретикулум
АК	аминокиселина

## 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 ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

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 (Statton et al., 2009).

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 ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). 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 (Fares et al., 2020).

Главният комплекс за тъканна съвместимост (МНС) 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 (Cabrerera et al., 2003).

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 резистентни (Woulde et al., 2001). 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 (Garrido et al., 1993), води до затруднения и предизвикателства при разработването на ефективни и целенасочени терапии (Cabello et al., 1998).

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 (Shina et al., 2009). *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 (Kennedy et al., 2017). 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.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи ролята на полиморфизма на класическите и неklasически *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 устна кухина и ларинкса) и здравите контроли.
4. Сравнителен анализ между двете групи пациенти с плоскоклетъчни карциноми на устна 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 неklasически *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 1). От изследваните 47 пациенти с OSCC, 31 са жени, 16 са мъже, със средна възраст  $65 \pm 10$  години. Изследваните пациенти с LSCC са 48, от които 45 са мъже и 3 жени със средна възраст  $64 \pm 9$ . 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 неklasически 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 (Ivanova et al., 2021; Ivanova et al., 2019). Генетичните изследвания са извършени след получаване на писмено информирано съгласие от пациентите. Тестовите са извършени съобразно Декларация от Хелзинки на Световната Медицинска Асоциация за етични правила при медицински изследвания върху хора.

Таблица 1. Пациенти и здрави контроли, включени в дисертационния труд

Параметър	Проби за анализ на класически HLA				Контролна група за асоциативен анализ на неklasически HLA (n=63)
	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

<i>p</i> -стойност (Хи-квадрат)	<0.001	0.004	<0.001* <0.001		
<b>Възраст</b>					
Средна възраст	65±9	65±10	64±9	38±11	58±24
Възрастов диапазон	41-90	43-90	41-83	18-64	20-99
<i>p</i> -стойност (t-тест)	<0.001	<0.001	<0.001* 0.084		
<b>Статистическа сила на анализа</b>	0.865	0.806	0.808* 0.428		
<b>Стадий на развитие на тумора (TNM)</b>					
I	9	5	4		
II	14	12	2		
III	15	10	5		
IV	17	4	13		
неопределен	40	16	24		
<b>Диференциация на карцинома (G)</b>					
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 ресуспендира 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 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 внимава 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 рН, 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. Обогадените 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 рН, която се дължи 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
<b>Общ обем</b>	<b>10 µl</b>

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

Брой цикли	Температура	Време
1	95° C	3 мин.
35	95° C	15 сек.
	65° C	30 сек.
	67° C	3 мин.
1	67° C	10 мин.
1	15° 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: 
$$\frac{\text{първоначален обем } (\mu\text{l})}{\text{еквимоларно съотношение}} \times \text{екв. съотношение}$$

### 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 4°C 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 $\mu\text{l}$
NGSgo-LibrX end prep буфер	3.25 $\mu\text{l}$
NGSgo-LibrX фрагментазен ензим	1.5 $\mu\text{l}$
NGSgo-LibrX end prep ензим	1.5 $\mu\text{l}$

H <sub>2</sub> O	варира
<b>Общ обем</b>	<b>32.5 µl</b>

Използва се следната PCR програма:

Стъпка	Време	Температура
Фрагментация и end-repair	20 мин.	25° C
dA-tailing*	10 мин.	70° C
Охлаждане	∞	15° 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
<b>Общ обем</b>	<b>8 µl</b>

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

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

Плаката се вортексирва и центрофугира, след което се поставя на PCR апарат, с програма, нагласена на 20°C 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 вортексирва. 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

б) 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 бедрите, 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<sub>2</sub>O 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-binding), 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 pM, използваме следната формула:

$$\frac{(\text{концентрация в } ng/\mu l)}{(660 \text{ g/mol} \times \text{среден размер на библиотеката в bp})} \times 10^6 = \text{концентрация в pM}$$

След това ДНК библиотеката се разрежда двукратно: до достигане на концентрация от 1 pM 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. Анализът 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. хибридационна 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 хибридация 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 грт, и отново се центрофугира.

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

Температура	Време
55°C	5 мин.
10°C	2 мин.

б) 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 грт. 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 Индексирание, с предварително загрян капак до 105°C и обем на реакцията 50 µl:

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

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

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 индексирание, 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 температура, за да се изпари етанола

11) Епруветката се отстранява от статива и се добавят 37  $\mu\text{l}$  ресуспендиращ буфер, за да се елуират таргетните фрагменти

12) Епруветката се разбърква и се инкубира за 5 минути на стайна температура. 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  $\mu\text{l}$  от супернатантата, които се прехвърлят в нова 1.5 ml епруветка.

*След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 1 месец между  $-15^{\circ}\text{C}$  и  $-25^{\circ}\text{C}$ . Очакваният добив на библиотеката е около 30  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , но може да варира според качеството на ДНК на пробите. Концентрация  $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$

b. AlloSeq Tx Probe Panel: 10  $\mu\text{l}$

c. Хибридизационен буфер 1: 50  $\mu\text{l}$

d. Хибридизационен буфер 2: 10  $\mu\text{l}$ .

3) С пипета, нагласена на 70  $\mu\text{l}$ , се разбърква 10 пъти и се центрофугира

4) PCR епруветката се поставя в PCR апарата със зададена хибридизационна програма, температура на капака  $100^{\circ}\text{C}$  и обем на реакцията 100  $\mu\text{l}$ :

Температура	Време	Брой цикли
$98^{\circ}\text{C}$	5 мин.	1
$98^{\circ}\text{C}$ - $62^{\circ}\text{C}$ , спадаща с $2^{\circ}\text{C}$ на цикъл	по 1 мин. на цикъл	19
$62^{\circ}\text{C}$	60 мин.	1
$62^{\circ}\text{C}$	$\leq 18$ 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 58°C преди работа в Нубех (SciGene, USA) темпериращ 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 58°C за 15 минути на Нубех 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 Нубех системата на 58°C)*
    - a. Епруветката се премахва от магнитния статив. Добавят се 200 µl от затопления Capture Wash Buffer (58°C)
    - b. Епруветката се разбърква, но не се центрофугира. Инкубира се на 58°C за 5 минути
    - c. Центрофугира се и веднага се поставя на магнитния статив за 30 секунди. Супернатантата се изхвърля
    - d. Стъпки а-с се повтарят още два пъти, за общо три миенета
  - 5) Епруветката се отстранява от магнитния статив. Добавят се 200 µl затоплен Capture Wash Buffer (58°C), 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 58°C в Нубех 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) Елуирацията мастър микс, приготвен по-рано, се разбърква и се добавят 23  $\mu$ l 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  $\mu$ l в PCR епруветка и се добавят 4  $\mu$ l Capture Elution Buffer 2. Разбърква се с пипета 6-8 пъти, като крайният обем е 25  $\mu$ l

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

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  $\mu$ l от PCR праймерите се добавят към PCR епруветката от предходната стъпка на протокола. Добавят се 20  $\mu$ l 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 105°C и обем на реакцията 50  $\mu$ l:

Температура	Време	Брой цикли
98°C	30 сек.	1
98°C	1 мин.	17
60°C	30 сек.	
72°C	3 мин.	
72°C	5 мин.	1
10°C	$\infty$	1

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

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  $\mu$ l 100% етанол и 120  $\mu$ l стерилна вода
- 3) В нова 1.5 ml епруветка се поставят 27  $\mu$ l пречистващи микросфери. В нея се прехвърлят и 45  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l от супернатантата.  
*След тази стъпка, библиотеката може да се съхранява до 1 месец на температура от -15°C до -25°C градус*
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  $\mu$ l за стандарт 1 и стандарт 2 и се смесват с по 10  $\mu$ l от всеки стандарт. Правят се две измервания на пробата, като към 199  $\mu$ l микс се добавя по 1  $\mu$ l 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  $\mu$ l стерилна вода с 5  $\mu$ l 2N NaOH

3) Разреждане на ДНК библиотеката до 1 nM

След въвеждане на концентрацията на ДНК библиотеката в excel 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  $\mu$ l от 1 nM библиотеката, 5  $\mu$ l 0.1 N NaOH, разбърква се, центрофугира се и се инкубира на стайна температура за 5 минути. След това се добавят 5  $\mu$ l стерилна вода. Отново се разбърква и центрофугира. Добавят се 985  $\mu$ l студен хибридизационен HT1 буфер.

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

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  $\mu$ l.

Смесват се 192  $\mu$ l от 5 pM библиотека с 408  $\mu$ l от HT1 буфер, разбърква се без вортекс и се поставят 600  $\mu$ l 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 заредената 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) (SPSS Inc, 2007), за възрастта - посредством  $p$  стойност (двустранен Т – тест, независими проби с различна дисперсия) с Microsoft Excel, версия 2013 (Microsoft Corporation). Статистическата сила на анализите е изчислена със статистически пакет *rwr* за R (v. 1.3-0) с  $p$  стойност равна на 0.05 и слаба сила на ефекта на Cohen ( $f^2$ ), която представлява разликата между двете групи (Champely et al., 2020). 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) (Excoffier et al., 2010).

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 (Fan et al., 2017).

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 използва

генерализирано линейно моделиране, с цел изготвяне на асоциативни модели, включващи количествени и качествени параметри. Включването на корекция за променливи (covariates), подобрява точността на резултата. На получената  $p$ -стойност за алелите е приложена корекцията на Бонферони за множественост (Bonferroni correction), като за статистически значими се приемат коригирани  $P$ с със стойности равни или по-малки от 0.05.

Анализът на хаплотипните асоциации се извърши със статистически пакет *haplo.stats* за R (v. 1.8.9). Определяне на хаплотипните скорове се извърши със статистически пакет със съобразяване на разликите във възрастта и пола на контролните групи и пациентите (Sinnwell, 2024). 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 ( $-\log_{10}$ ) 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) (Excoffier et al., 2010).

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

# 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 дълговерижан PCR за амплификация на дълги фрагменти, целящ пълното покритие на HLA гените.

Средната ДНК концентрация на пробите беше 71.3 ng/μl със средно съотношение на чистотата на ДНК  $A^{260}/A^{280} = 1.7$ . От всичките 77 проби, две бяха с концентрация под 20 ng/μl и 16 със  $A^{260}/A^{280}$  между 1.5 и 1.7. Бяха необходими общо 462 ( $77 \times 6$ ) PCR реакции за секвенирането на шесте HLA гена на всички проби. 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.

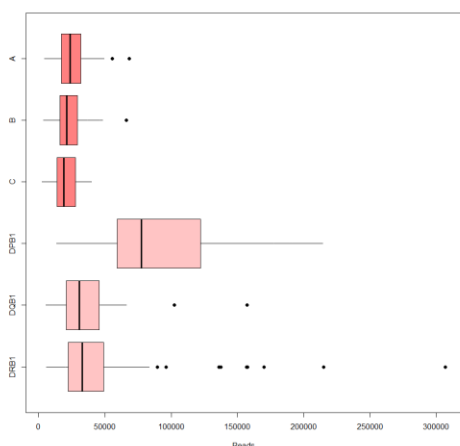
За оценка на HLA секвенциите се отчитат два основни показателя за качество – дълбочина на покритието и качество на прочитите. В статистическата обработка на резултатите бяха включени следните най-важни качествени показатели: качество на прочитите, покритие, големина на фрагментите, алелен баланс при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

Броят прочити, генерирани от всички секвенирани 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. 1).

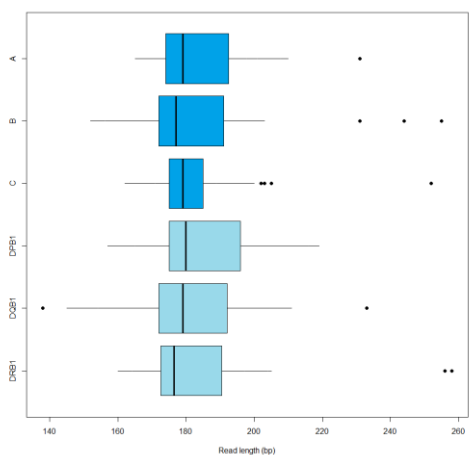
Подравняването на прочитите зависи от дължината им, тъй като прочитите трябва да са достатъчно дълги, за да се подравнят спрямо референтния геном. Дължината на прочитите изобразена на фиг. 2 е подобна за всички гени – средно 183 bp, със средно 77% подравняване.

Средната дълбочина на прочитите е представена на фиг. 3 като броя прочити е най-голям за HLA-DPB1. Алелният баланс при хетерозиготните проби е представен на фиг. 4. Балансираната амплификация на двата алела при хетерозиготните проби се определя от процента данни за втория алел (фиг. 4). От установените 394 хетерозиготни генотипове, 96.9% са без алелен дисбаланс, при които вторият алел е >30%, докато 3.1% от типизираната имаха по-голям дисбаланс с вариация на втория алел между 15% и 29%). 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%.

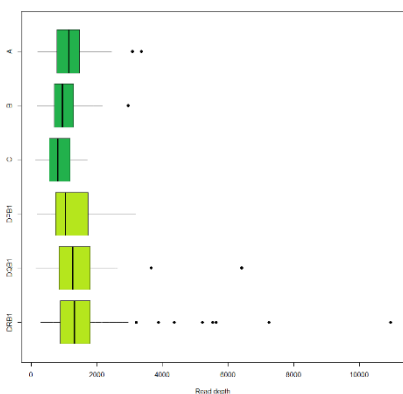
Последният NGS параметър, който използвахме за оценка на GenDx протокола за HLA типизиране е честотата на получените неразграничими алелни комбинации (фиг. 5). Получаването на неразграничими комбинации в HLA-DRB1 и -DQB1 очаквано е в най-голям процент (24% и 19%) поради непълното покритие на секвенциите на гените при GenDx метода. Единични неразграничими алелни комбинации се откриват и при гените HLA-B, -C и -DPB1.



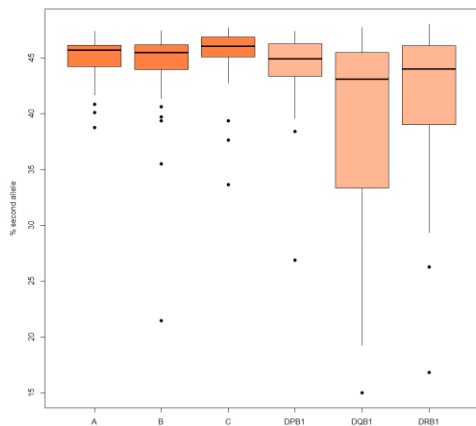
Фиг. 1. Boxplot графика, изобразяваща броя прочити (reads) за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot“ изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности в рамките на  $1,5 \times$  интерквантилния диапазон. Извънграничните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



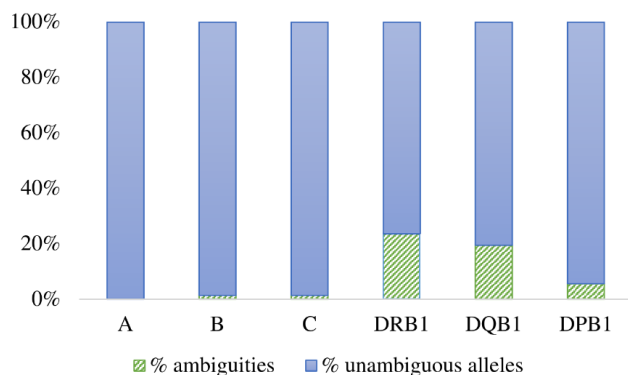
Фиг. 2. Boxplot графика, изобразяваща дължината на прочитите (read length), за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „boxplot“ изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на  $1,5 \times$  интерквантилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 3. *Boxplot* графика, изобразяваща дълбочината на прочитите (*read depth*), за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „*boxplot*” изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности в рамките на 1,5 × интерквантилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 4. *Box plot* графика, изобразяваща процентът установен втори алел, при хетерозиготните проби (% *second allele*). Графиката тип „*boxplot*” изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на 1,5 × интерквантилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 5. Съотношение на разграничимите (*unambiguous*) и неразграничимите (*ambiguities*) алелни комбинации, получени при секвениране с *GenDx NGSgo* (*GenDx, USA*)

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

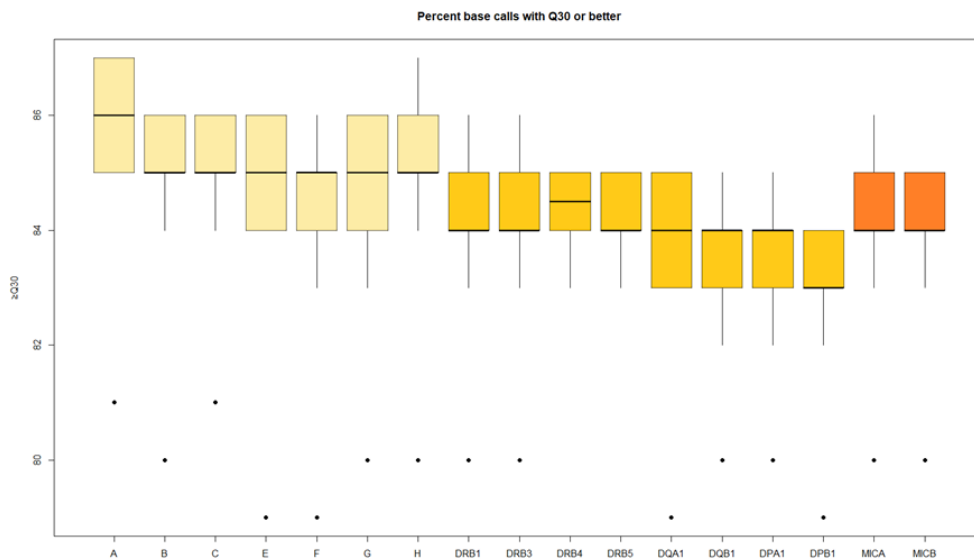
За целите на настоящия дисертационен труд беше въведена нова версия на протокола AlloSeq Tx17 (CareDx, USA), за подготовка на ДНК библиотеки, за секвениране от ново поколение (*next generation sequencing* - NGS), посредством платформата на Illumina – MiniSeq. Новата версия на AlloSeq Tx17, с ранно обединяване 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 неklasически (HLA-E, -F, -G, -H, -MICA, -MICB).

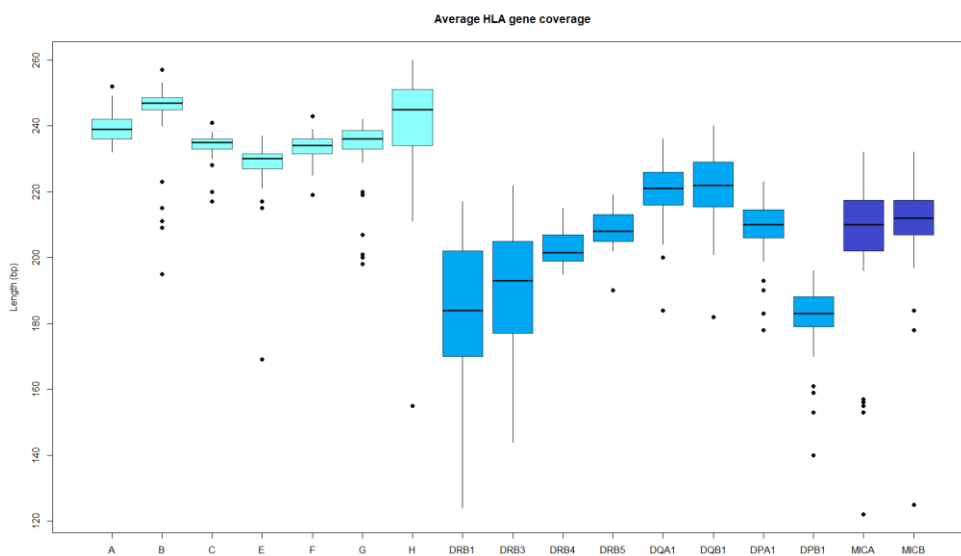
С този протокол секвенирахме пробите на пациентите (n=95). Трите критерия, за приемане на първичните данни от NGS, които изследвахме, са плътност на клъстерите, процент клъстери преминаващи през филтъра, и процент бази с определено качество ( $\geq$  Q30).

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%).

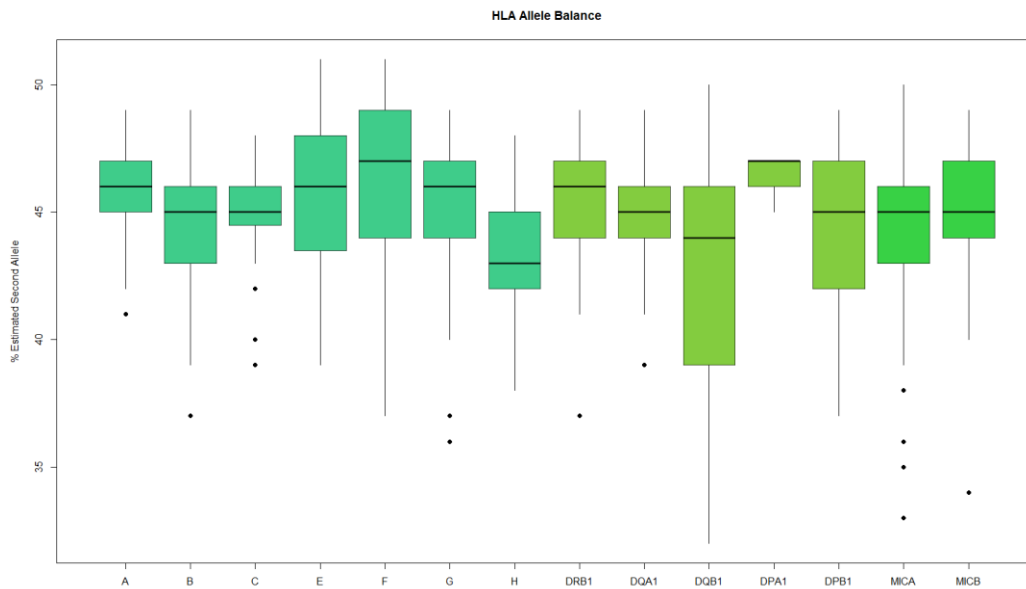
На фиг. 6 е представен процентът бази с Q30 и нагоре, при отделните HLA гени. На фиг. 7 е представена дължината на прочитите за всеки от изследваните гени, като най-голяма вариация се наблюдава при HLA-DRB1, която се дължи на дългите интронни последователности на този ген. На фиг. 8 е представен средният алелен баланс, като всички изследвани гени се характеризират с висок процент (около 45%). Последният изследван NGS параметър е процентът на неразграничимите алелни комбинации. Неразграничимите алелни комбинации се получават при наличие на различия извън секвенираните региони (фиг. 9).



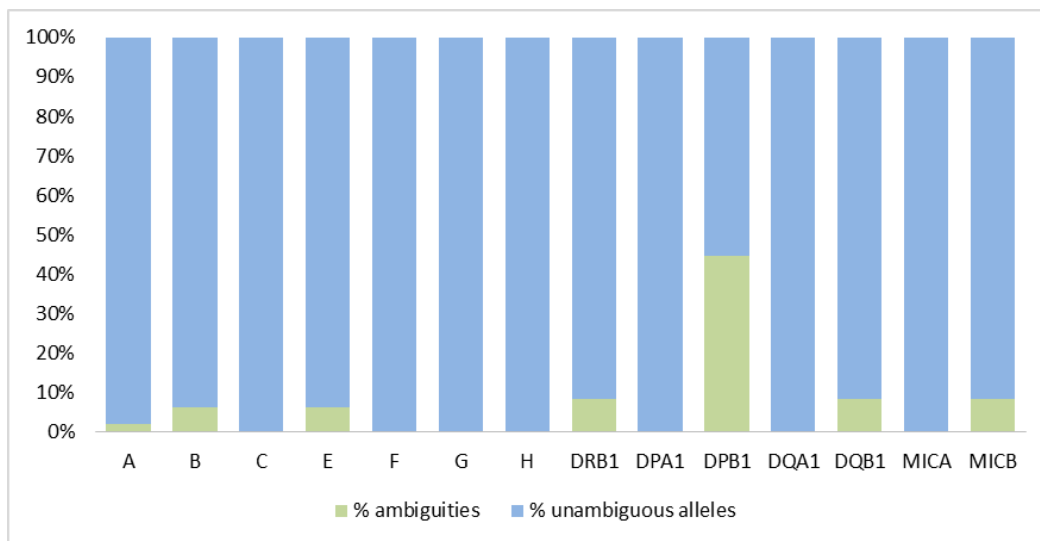
Фиг. 6. *Boxplot* графика, изобразяваща процента бази  $\geq Q30$ , за изследваните HLA гени. Графиката тип „*boxplot*” изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на  $1,5 \times$  интерквантилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 7. *Boxplot* графика, изобразяваща дължината на ДНК фрагментите, за всеки изследван HLA ген. Графиката тип „*boxplot*” изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на  $1,5 \times$  интерквантилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 8. Boxplot графика, изобразяваща алелния баланс на хетерозиготните проби, за всеки отделен HLA ген. Графиката тип „boxplot“ изобразява първия квантил, медианата и третия квантил на данните. Горната и долната граници са минималните и максималните стойности, в рамките на  $1,5 \times$  интерквартилния диапазон. Извънграничните стойности са представени като черни точки



Фиг. 9. Процент разграничими (unambiguous) и неразграничими (ambiguities) алелни комбинации, получени при секвениране с AlloSeq Tx17 (CareDx, USA)

## 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 2).

Таблица 2. Изследване на равновесието на Харди-Вайнберг при здравите контролни групи

HLA ген	Брой изследвани здрави индивиди от българската популация	Наблюдавана хетерозиготност	Очаквана хетерозиготност	<i>p</i> 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

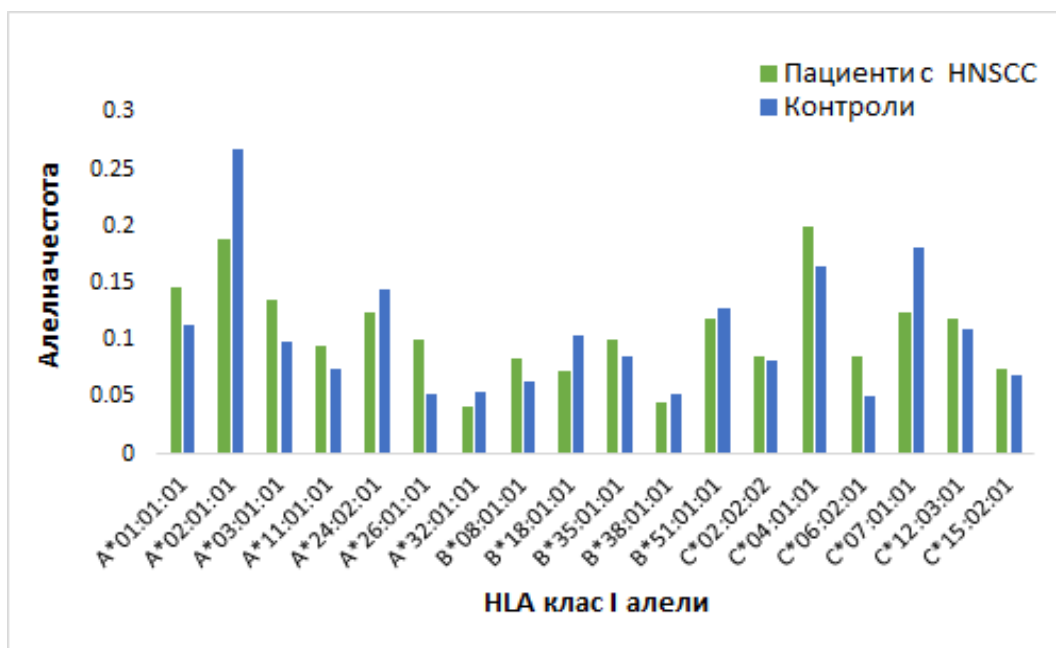
#### 1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

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. 10). Сред класическите HLA клас II гени, най-високата степен на полиморфизъм се установява

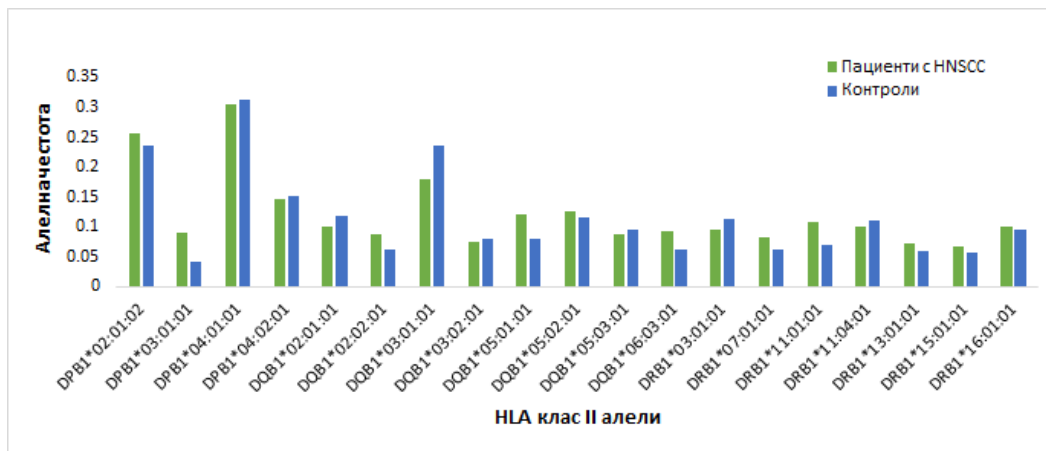
при HLA-DRB1 гена, с 36 алела. Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1\*11:04:01 (11,0%), DQB1\*03:01:01 (23,5%), DPB1\*04:01:01 (31,3%) (фиг. 11). Честотата на срещане на тези алели е съпоставима с предходни HLA антропологични изследвания на българската популация (Naumova et al., 2006; Zlatev et al., 2008; Ivanova et al., 2002).

## 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. 10). 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. 11).



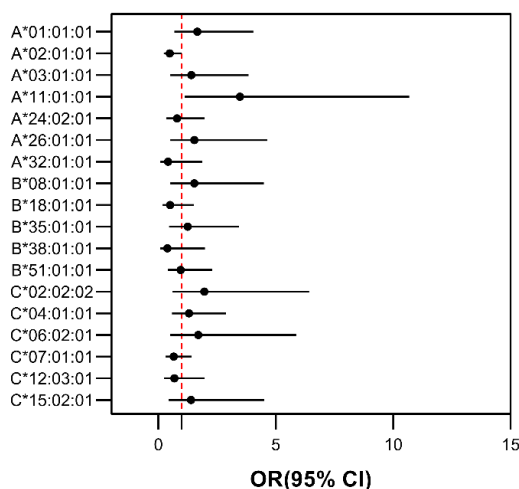
Фиг. 10. Алелна честота на HLA клас I алелите на здравите контроли и пациентите с HNSCC



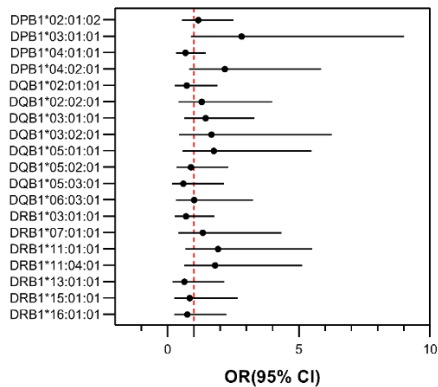
Фиг. 11. Алелна честота на HLA клас II алелите на здравите контроли и пациентите с HNSCC

## 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. След прилагане на корекция за множественост на Bonferroni при HLA-A\*02:01:01 ( $p=0.0429$ ,  $P_c=0.3001$ ,  $OR=0.4802$ ) и A\*11:01:01 ( $p=0.0300$ ,  $P_c=0.2102$ ,  $OR=3.4714$ ), статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи.



Фиг. 12. Асоциация на HLA клас I алелите с HNSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)

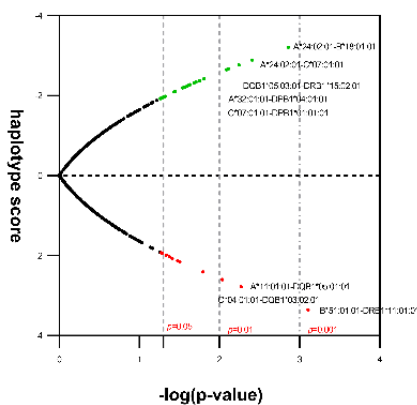


Фиг. 13. Асоциация на HLA клас II алелите с HNSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)

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

Поради силната неравновесна връзка (linkage disequilibrium – 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. 14).



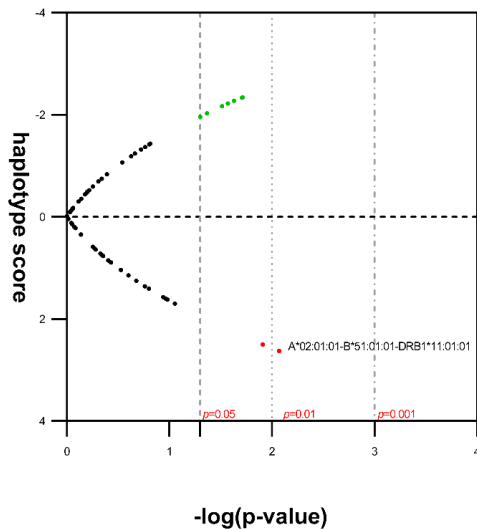
Фиг. 14. Разпределение на HLA дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с HNSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

В състава на дву-локусните хаплотипи, преобладаващи HLA алели (срещани 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 ( $p \leq 0,05$ ) (фиг. 15).

В състава на три-локусните хаплотипи, B\*51:01:01 отпада като преобладаващ 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.



Фиг. 15. 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

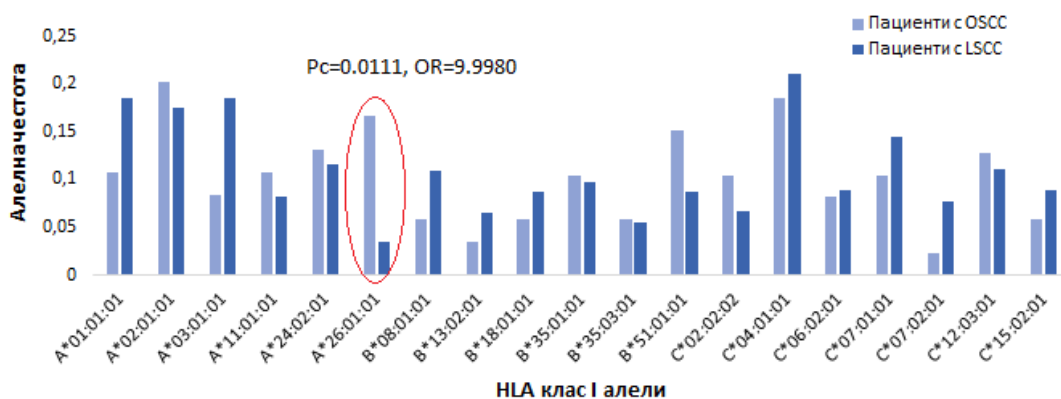
### 1. Изследване на алелния полиморфизъм на класическите HLA клас I и клас II гени при пациентите с OSCC и LSCC

#### 1.1. Алелен полиморфизъм при пациенти с OSCC

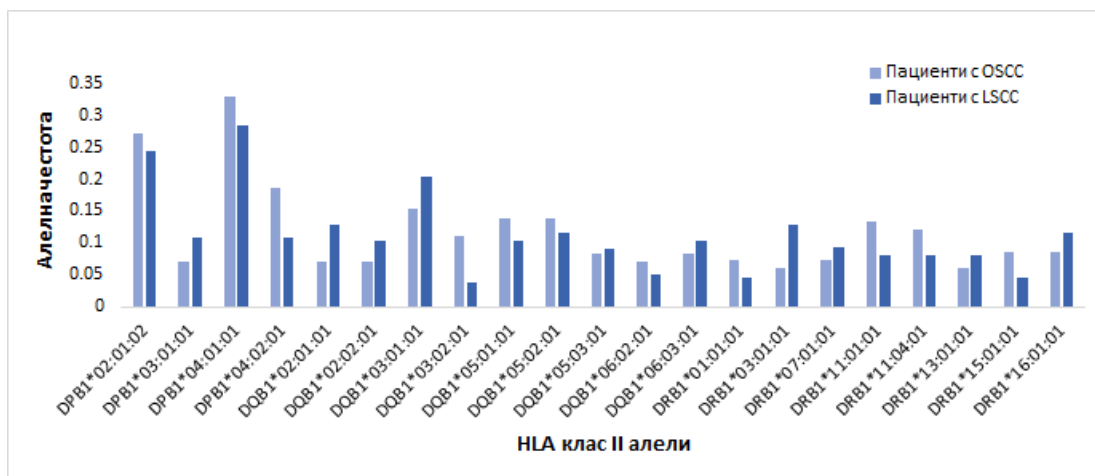
В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на класическите HLA клас I гени при 47 пациента диагностицирани с OSCC от българската популация. Най-честите класически HLA клас I алели са: A\*02:01:01 (20,2%), B\*51:01:01 (15,1%) и C\*07:01:01 (10,5%) (фиг. 16). Най-честите класически HLA клас II алели са: DRB1\*11:04:01 (12,2%), DQB1\*03:01:01 (15,3%), DPB1\*04:01:01 (32,9%) (фиг. 17).

#### 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. 16). 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. 17).



Фиг. 16. Алелна честота на HLA клас I алелите на двете групи пациенти



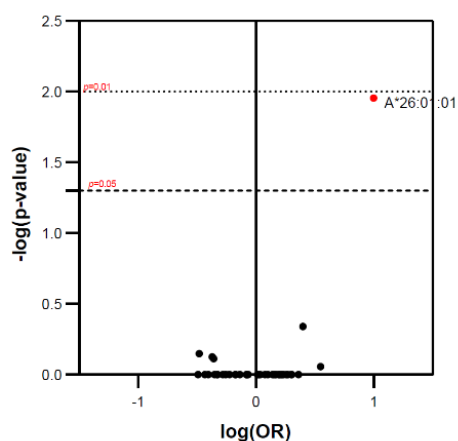
Фиг. 17. Аелна честота на HLA клас II аелите на двете групи пациенти

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

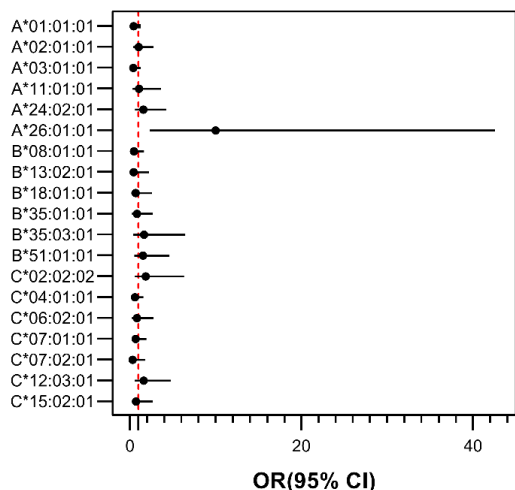
При извършения сравнителен анализ, между двете групи пациенти, с логистична регресия с вариабилни пол и възраст, се установяват статистически значими различия в аелното разпределение на класическите HLA. Аелът HLA-A\*26:01:01 е със статистически значима силно повишена честота при групата на пациентите с OSCC ( $P_c=0.0111$ ,  $OR=9.9980$ ) (Таблица 3, фиг. 18, 19, 20).

Таблица 3. Сравнителен анализ между двете групи пациенти с OSCC и LSCC. АЧ – аелна честота, OR (odd ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница),  $P_c$  – коригирана  $p$ -стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

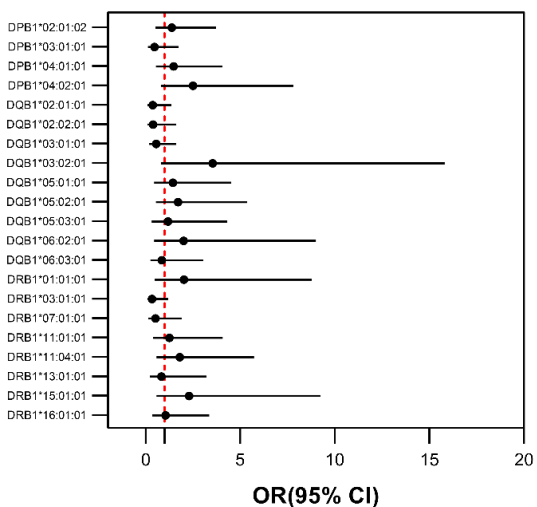
HLA аел	$p$ -стойност	OR	95% CI	$P_c$
A*26:01:01	0.0018	9.9980	2.3466-42.5979	<b>0.0111</b>



Фиг. 18. 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)



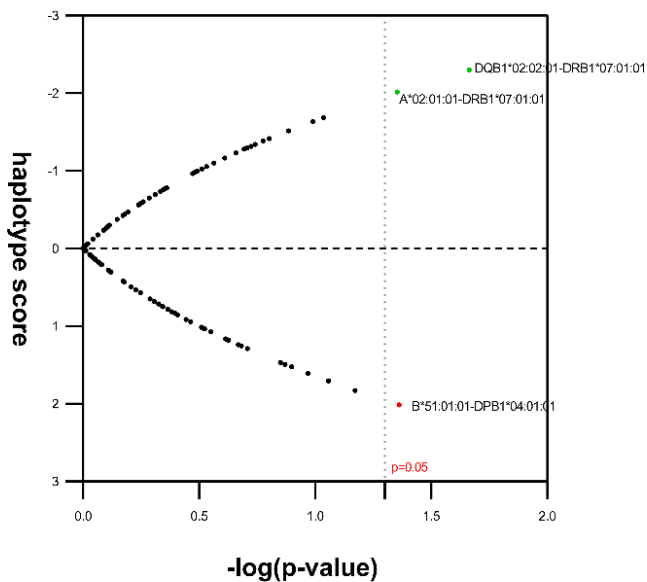
Фиг. 19. Асоциация на HLA клас I алелите с OSCC и LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)



Фиг. 20. Асоциация на HLA клас II алелите с OSCC и LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)

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

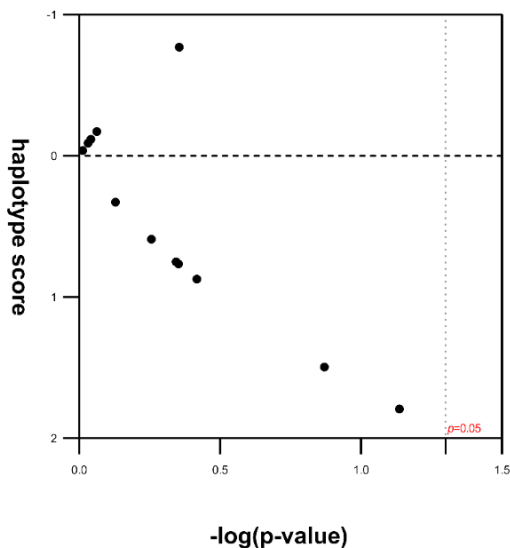
След извършения сравнителен анализ на двете групи пациенти се установяват 3 класически HLA клас дву-локусни хаплотипа със статистически значима повишена честота ( $p \leq 0,05$ ) (фиг. 21). Трябва да се отбележи, че и тук се наблюдава алелът A\*02:01:01 и B\*51:01:01 алелите в състава на установените дву-локусни хаплотипи с повишена честота, подобно на обединения анализ на групите пациенти.



Фиг. 21. Разпределение на HLA клас дву-локусните хаплотипи при двете групи пациенти. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо  $p$ -стойностите ( $p\text{-value}$ )

### 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. 22).

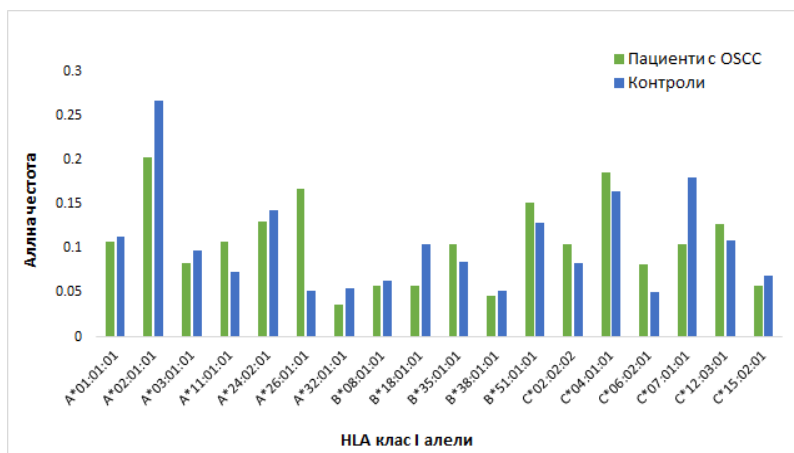


Фиг. 22. Разпределение на HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1 три-локусните хаплотипи при пациентите с OSCC и LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо p-стойностите (p-value)

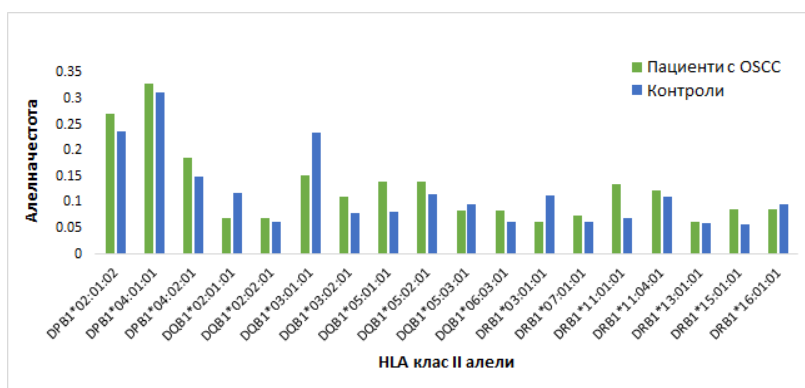
## V. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при OSCC

### 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. 23). 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. 24).



Фиг. 23. Алелна честота на HLA клас I алелите на здравите контроли и пациентите с OSCC



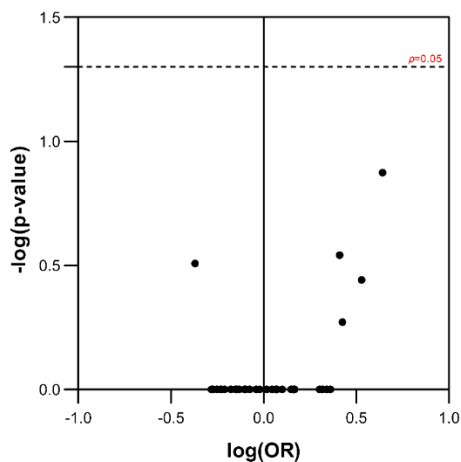
Фиг. 24. Алелна честота на HLA клас II алелите на здравите контроли и пациентите с OSCC

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

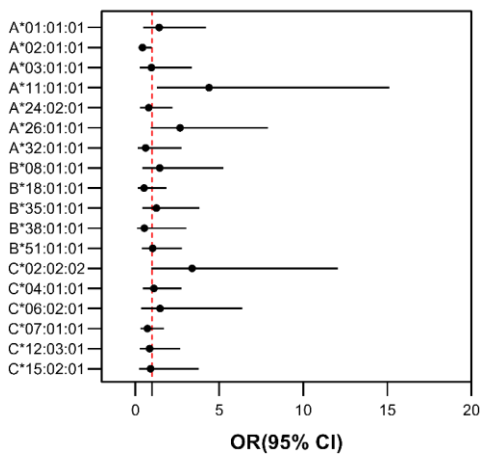
При извършения асоциативен анализ, между контролната група и групата на пациентите, с логистична регресия с вариабилни пол и възраст, не се установяват статистически значими различия в алелното разпределение на класическите HLA (таблица 4, фиг. 25, 26, 27). Резултатите ни показват потенциална протективна 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 4. 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), P<sub>c</sub> – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

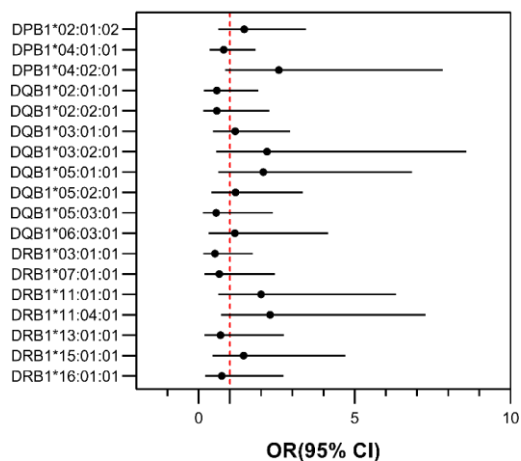
HLA алел OSCC	p-стойност	OR	95% CI	P <sub>c</sub>
A*02:01:01	<b>0.0444</b>	0.4268	0.1861-0.9789	0.3107
A*11:01:01	<b>0.0191</b>	4.3904	1.2741-15.1290	0.1336



Фиг. 25. 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)



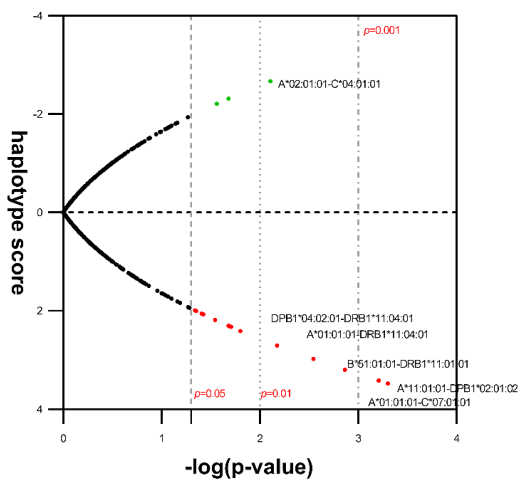
Фиг. 26. Асоциация на HLA клас I алелите с OSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)



Фиг. 27. Асоциация на HLA клас II алелите с OSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния 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 ( $p \leq 0,05$ ) (фиг. 28).

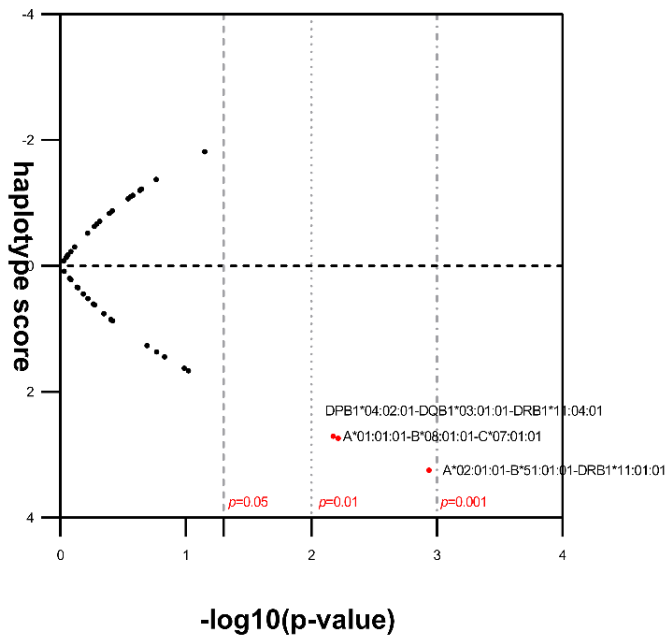


Фиг. 28. Разпределение на HLA клас I и клас II дву-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на шансовете (OR) спрямо  $p$ -стойностите ( $p$ -value)

В състава на дву-локусните хаплотипи, преобладаващи 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. 29).



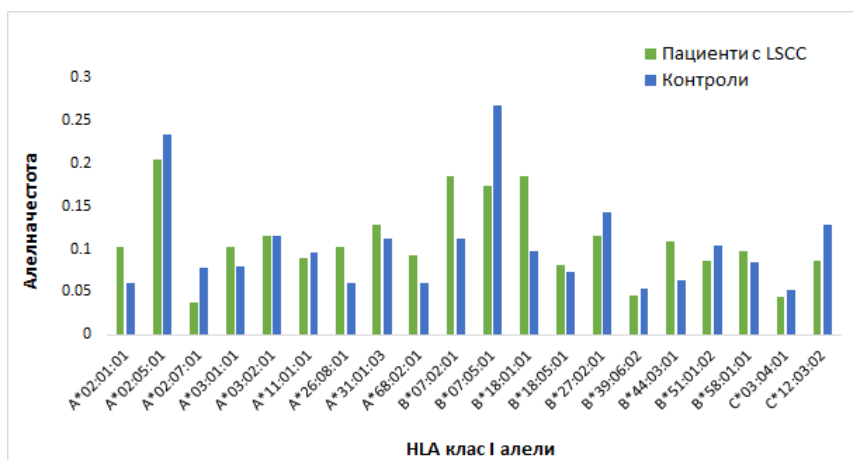
Фиг. 29. Разпределение на HLA-A-B-C, HLA-A-B-DRB1, HLA-DPB1-DQB1-DRB1 три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с OSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (*haplotype score*) спрямо  $p$ -стойностите ( $p\text{-value}$ )

## VI. Роля на HLA полиморфизми при LSCC

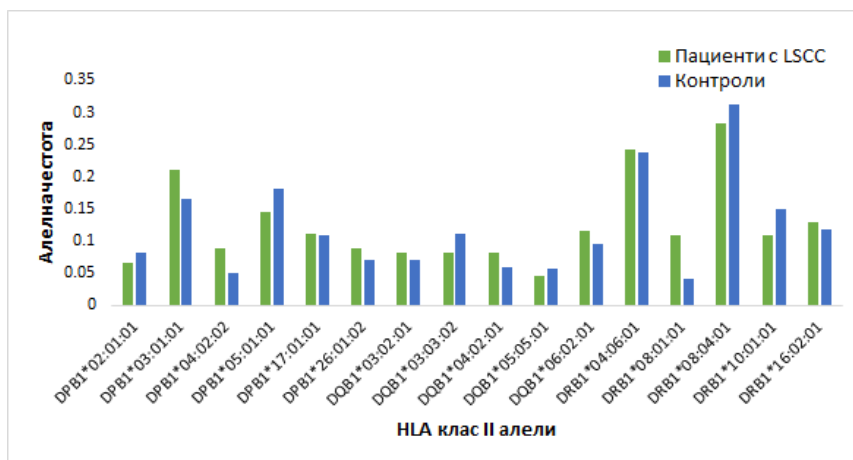
### 1. Роля на HLA клас I и клас II полиморфизми при LSCC

#### 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. 30). 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. 31).



Фиг. 30. Алелна честота на HLA клас I при здравите контроли и пациентите с LSCC



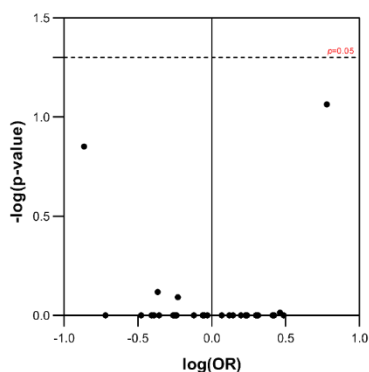
Фиг. 31. Алелна честота на HLA клас II при здравите контроли и пациентите с LSCC

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

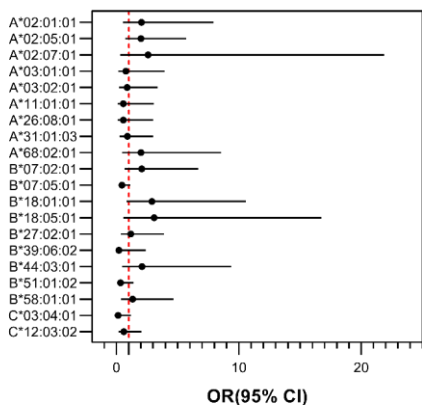
При извършения сравнителен анализ между контролната група и групата на пациентите, с логистична регресия, линеарен модел, за разлика от пациентите с OSCC, се установява повишена честота на HLA клас II алела DRB1\*08:01:01 ( $p=0.0173$ ,  $OR=6.0174$ ), но значимостта на наблюдаваната разлика се губи след прилагане на корекция за множественост на Bonferroni ( $P_c=0.0863$ ) (Таблица 5, фиг. 32, 33, 34).

Таблица 5. Сравнителен анализ между групите на пациентите с LSCC и здравите контроли. OR (odds ratio) – съотношение на шансовете, 95% CI – доверителен интервал (горна-долна граница),  $P_c$  – коригирана  $p$ -стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

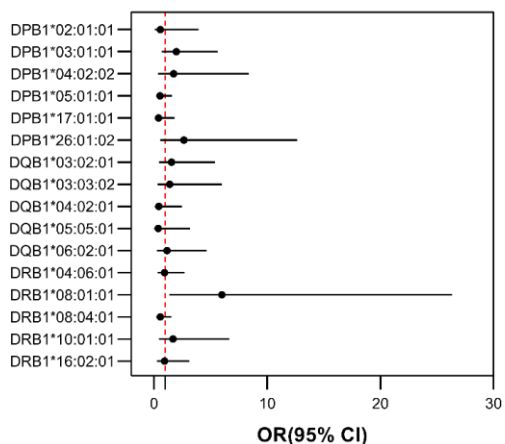
HLA алел LSCC	$p$ -стойност	OR	95% CI	$P_c$
DRB1*08:01:01	<b>0.0173</b>	6.0174	1.3738-26.3578	0.0863



Фиг. 32. 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)



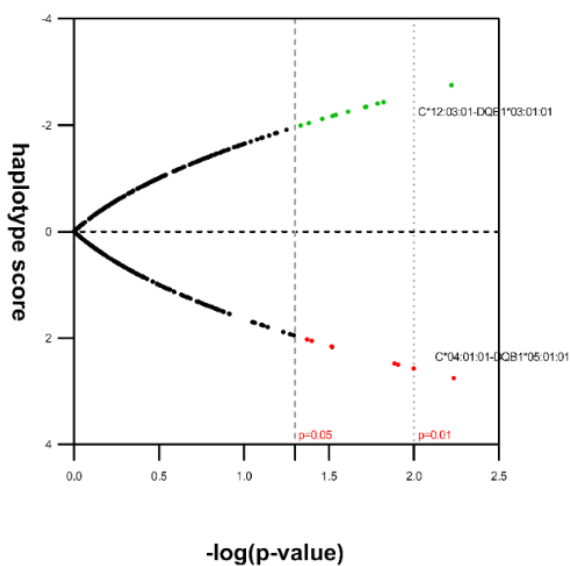
Фиг. 33. Асоциация на HLA клас I алелите с LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)



Фиг. 34. Асоциация на HLA клас II алелите с LSCC. Forest plot графиката изобразява съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)

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

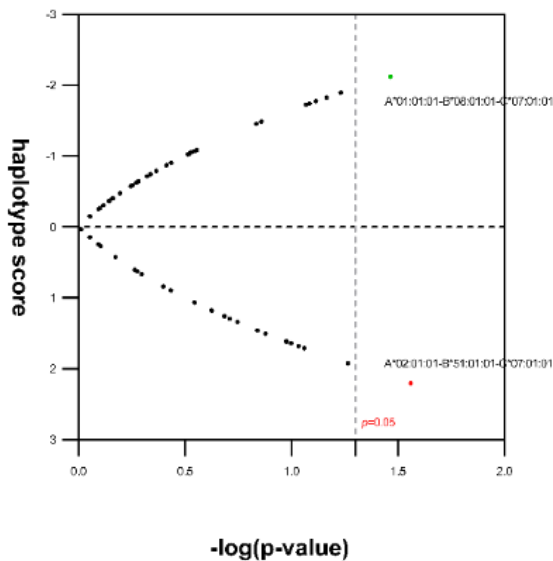
След извършения сравнителен анализ, при здравите контроли, се установяват 22 класически HLA клас I и клас II дву-локусни хаплотипи със статистически значима повишена честота ( $p \leq 0.05$ ) (фиг. 35). Интересно е, че DRB1\*08:01:01 не е част от установените хаплотипи.



Фиг. 35. 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. 36).



Фиг. 36. Разпределение на HLA три-локусните хаплотипи при здрави контроли и пациентите с LSCC. Volcano plot графиката представя съотношението на хаплотипния скор (haplotype score) спрямо  $p$ -стойностите ( $p$ -value)

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

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

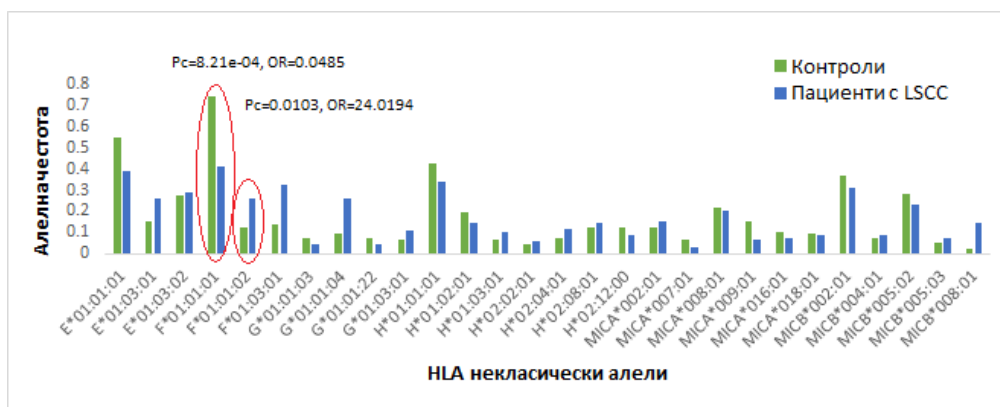
#### 2.1.1. Алелен полиморфизъм при здрави индивиди от българската популация

В настоящия дисертационен труд изследвахме разпределението на неklasическите 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 неklasически 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. 37).

### 2.1.2. Алелен полиморфизъм при пациенти с LSCC

Допълнително изследвахме разпределението на неklasическите 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 неklasически 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. 37).



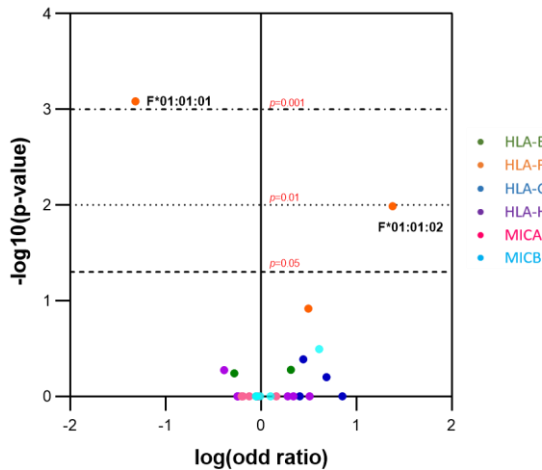
Фиг. 37. Алелна честота на неklasически HLA Ib и MIC алели при здравите контроли и пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса

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

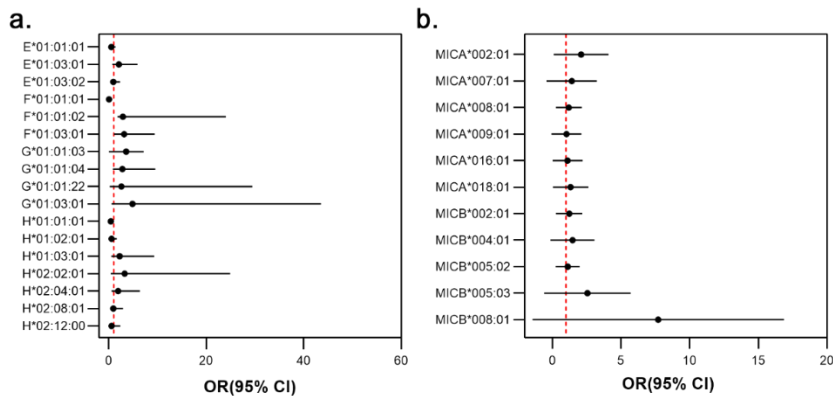
При извършения сравнителен анализ между контролната група и групата на пациентите с логистична регресия, линеарен модел се установяват две статистически значими различия в алелното разпределение на неklasическите HLA Ib гени (таблица 6, фиг. 38 и 39). След прилагане на корекция за множественост на Bonferroni, HLA-F\*01:01:01 се отличава със статистически значима повишена честота при здравите контроли ( $P_c=8.21e-04$ ,  $OR=0.0485$ ), а HLA-F\*01:01:02 с повишена честота при пациентите с плоскоклетъчен карцином на ларинкса ( $P_c=0.0103$ ,  $OR=24.0194$ ). При HLA-F\*01:03:01 статистическата значимост на наблюдаваната разлика се губи ( $p=0.0402$ ,  $P_c=0.1205$ ,  $OR=3.1422$ ).

Таблица 6. 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), P<sub>c</sub> – коригирана p-стойност (корекция на Bonferroni за множественост)

Алел LSCC	p-стойност	OR	95% CI	P <sub>c</sub>
F*01:01:01	2.74E-04	0.0485	0.0095-0.2474	<b>8.21E-04</b>
F*01:01:02	0.0034	24.0194	1.7842-2.8591	<b>0.0103</b>



Фиг. 38. Разпределение на неklasическите 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. 39. Асоциация на HLA неklasическите алели с LSCC. Forest plot графиките изобразяват съотношението на шансовете (OR) и горната и долната граница на доверителния интервал (95% CI)

След провеждане на тест за зиготност (с точен тест на Фишер) (таблица 7), се установява че HLA-F\*01:01:01 се асоциира с протективен ефект в хомозиготно състояние ( $p=4.10e-08$ , OR=0.0129).

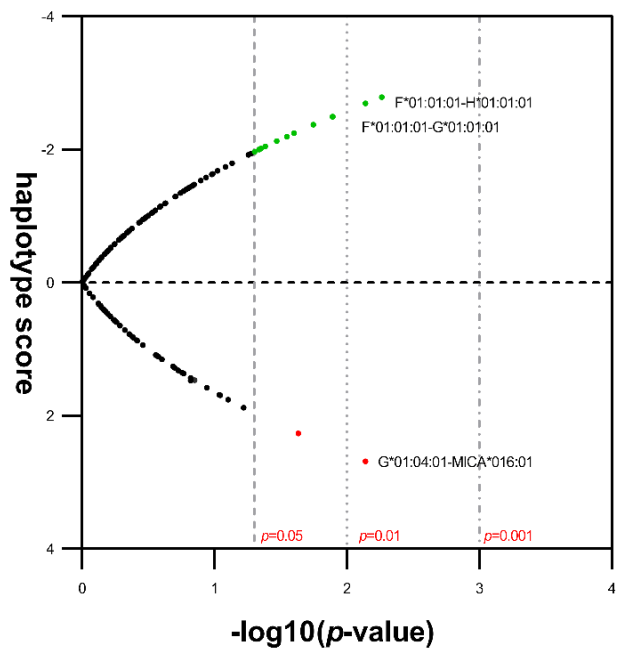
Таблица 7. Тест за зиготност на алелите асоциирани с LSCC

HLA алел	<i>p</i> -стойност хомозиготи	<i>p</i> -стойност хетерозиготи	OR хомозиготи	OR хетерозиготи	<i>p</i> -стойност зиготност	OR зиготност
F*01:01:01	<b>4.10e-08</b>	1.0000	0.0129	0.9184	<b>2.06e-04</b>	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 неklasически 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. 40. 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.40. Разпределение на изследваните HLA хаплотипи в контролната група и пациентите с LSCC. Volcano plot визуализира корелацията между хаплотипния скор и p-стойността

# 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 оборудване, 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 изключение 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 кодиращи 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 установява 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. 5). 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.

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. 3 е представена дълбочината на покритие на гените, като в настоящото изследване с най-вариабилна дълбочина на покритието е *DRB1*. На фиг. 4 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%.

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  $\text{mm}^2$ ) 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  $240 \text{ K/mm}^2$ , 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.

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 ( $Q30 \geq 84\%$ ) (фиг. 6).

Въпреки че настоящият протокол позволява покритие само на екзонните области от HLA клас II гените се наблюдават под 10% неразграничени алелни комбинации при всички изследвани гени (фиг. 9), 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 (Ferris et al., 2015). Известно е и че туморният растеж е резултат от дисбаланс в имунитета на гостоприемника (Ferris et al., 2015) и поради тази причина е от голяма необходимост да се определят прогностични фактори и биомаркери, които да предскажат отговора и изхода от имунотерапиите (Bradford et al., 2020). 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 (Bradford et al., 2020). Множество изследвания се фокусират върху ролята на имунната регулация при канцерогенезата и лечението на HNSCC (Wang et al., 2020). Въпреки това, понижаването на смъртността и увеличението на оцеляването до 5 години след поставяне на диагноза, остава неразрешен проблем (Song et al., 2020). Изясняването на молекулярните характеристики и механизми на прогресията на HNSCC чрез методи като геномика, транскриптомика и белтъчен анализ, ще позволи установяването на вероятни таргети за прогностични и терапевтични цели (Bradford et al., 2020).

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 неklasически HLA. В допълнение, повечето изследвания са свързани с нивата на експресия на неklasическите HLA молекули (основно HLA-E и -G) при туморна тъкан от HNSCC. 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 (Bertaina, 2018). Подобро оцеляване на пациентите може да се дължи на представяне на тумор-асоциираните антигени и неоантигени, след което Т клетъчното разпознаване и цитотоксичната активност се повишава (Bertaina et al., 2018).

Широко разпространена е теорията, 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 (Yarchoan et al., 2017).

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 проведенният 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 ( $p=0.0429$ ,  $P_c=0.3001$ ,  $OR=0.4802$ ). 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 (2022) 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.

Установено е, че CD8<sup>+</sup> 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 (Albers et al., 2018). 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<sup>+</sup> 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 (Niens et al., 2007).

Tisch и сътрудници (2002) установяват, че немски пациенти с HNSCC, носители на HLA-A\*11 са с ниска преживяемост, 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 (1993) 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 (2007) 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.

В изследване на Wichmann G. и сътрудници (2017), 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.

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. Хаплотипът 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 (Nakamura et al., 2019; Capitini et al., 2021). 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 р-стойността за можественост. Въпреки това, алелът HLA-B\*51:01:01 е преобладаващ в установените статистически 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 (Hidesheim et al., 2002; Lu et al., 2003).

От HLA клас II алелите, преобладаващ в анализа на дву-локусните хаплотипи е DPB1\*04, който е позитивно асоцииран с остра левкемия в изследването на Williams и сътрудници (2022) при пациенти англичани.

Алелът HLA-DRB1\*11, участващ в редица хаплотипи предразполагащи към HNSCC и OSCC в настоящия дисертационен труд, е описан при тромботична тромбоцитопенична пурпура (ТТП). 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. ТТР може да е с вторичен произход като един от предразполагащите фактори е наличието на раково заболяване (Zoure et al., 2021).

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 ( $p=0.0173$ ,  $P_c=0.0863$ ,  $OR=6.0174$ ). DRB1\*08 е описан като увеличаващ риска от развитието на назофарингеален карцином при азиатски пациенти (Yang et al., 2016).

От асоциативния анализ се установяват асоциации с някои от неklasическите HLA гени и хаплотипи. Сврхекспресията 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 (Silva et al., 2011). Високата експресия на HLA-G се наблюдава при премалигнени лезии в ларинкса и е понижена при малигнени, поради тази причина липсата ѝ се приема като биомаркер/индикатор за малигнени лезии (Silva, 2011). Данни за клиникопатологичното значение на HLA-F са по-ограничени, но се предполага че тази молекула има подобна имunosупресивна роля на HLA-E и -G. Наличието на неklasически HLA Ib молекули предполага лоша прогноза (Kochan et al., 2013).

HLA-H е псевдоген 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 функция и участва в имунната хомеостаза, подобно на HLA-E, -F и -G (Kochan et al., 2013).

По отношение на MIC асоциациите с раковите заболявания, MICA е най-изследваната молекула. MICA е известна като най-полиморфния неklasически HLA клас I ген (Wichmann et al., 2018). Нивата на експресия на MICA са изследвани при различни видове тумори, включително HNSCC (Wichmann et al., 2018). 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 (Salih et al., 2006).

Резултатите от настоящия дисертационен труд показват силна асоциация на LSCC с HLA-F\*01:01:02 алела ( $P_c=0.0103$ ,  $OR=24.0194$ ), а F\*01:01:01 е установен като алел с протективна роля ( $P_c=8.21e-04$ ,  $OR=0.0485$ ). 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 трансляцията или ко-трансляцията на белтъчното нагъване. Според Sharma и сътрудници (2019), синонимните замени могат да повлияят на нивото на експресия на белтъците, дори нагъването. След като синонимните замени имат функционален ефект, ние предполагахме 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-С, 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-С промотор свързва транскрипционните фактори по различен начин от другите HLA-F промотори. Индивидите, носещи хаплотипа F\*дистален-С, изглежда имат по-високи нива на експресия на HLA-F иРНК (Buttura et al., 2019).

Zhang и сътрудници (2013) установяват, че повишените нива на HLA-F корелират с понижен шанс за оцеляване при пациенти от Китай с ESCC. 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 G. и сътрудници (2019) съобщават че N-терминалният край на пептидите не се закачва за пептид свързващото място. Те установяват и че взаимодействието с KIR3DS1 рецептора на НК клетките води до забавяне на развитието на заболяването (в контекста на инфекция с HIV вирус), 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 НК клетките) и ILT-4 (експресирани на Т и В клетките) и други имунни клетки (моноцити, макрофаги и дендритни клетки) (Sato, 2005). Zhang и сътрудници (2013) изказват хипотезата, че това свързване може да има директен инхибиторен ефект върху имунните клетки и да влияе на тяхната функция в различни етапи на имунния отговор.

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 статистически 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 НК клетките, установено от Sullivan L. и сътрудници (2008).

Barakat G. и сътрудници (2021) изследват асоциацията на LSCC с HLA-G полиморфизми при пациенти от Египет (Barakat et al., 2021). HLA-G има 8 екзона и 14-bp инсерция или делеция в 3' нетранслирания участък (UTR), отговорна за стабилността и сплайсинга на мРНК изоформите. Те установяват асоциация между 14-bp делеция на HLA-G с LSCC. В нашето изследване, HLA-G алелите не се асоциират със заболяването, но HLA-G участва в няколко статистически значими асоциирани хаплотипа. HLA-G е част от хаплотипа HLA-F\*01:01:01-G\*01:01:01 ( $p=0.0072$ ).

MICA полиморфизмите, асоциирани с HNSCC са основно изследвани в контекста на STR (Reinders et al., 2006; Reinders et al., 2007). 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 М. и сътрудници (2021) изследват MHC полиморфизма асоцииран с OSCC при пациенти от българската популация. 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**

Плоскоклетъчният карцином на устната кухина представлява около 95% 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 инициране на антиген-специфичен имуноен отговор, избягването на тумора от имуноен 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 плоскоклетъчният 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 преобладаващите 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 преобладаващите 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 преобладаващите 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 неklasическите 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 неklasически 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, дефинирани 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 СВЪРЗАНИ 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 неklasическите 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 Nediaalkova, Iina 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

## БЛАГОДАРНОСТИ

Отправлям 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 1 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 представения 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 