

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**TIPAREA ALELELOR HLA SPECIFICE ÎN
LIMFOPROLIFERĂRILE CRONICE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CONSTANTINESCU ILEANA

Student-doctorand:

TIZU (căș. IONESCU-LUPEANU) MARIA

2025

CUPRINS

Lista de lucrări științifice publicate	3
Introducere	4
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	5
1. Date generale privind limfoproliferările cronice	5
1.1. Prevalența limfoproliferărilor cronice	5
1.2. Clasificarea bolilor limfoproliferative cronice	5
1.3. Diagnosticul limfoproliferărilor cronice	6
2. Răspunsul imun în limfoproliferările cronice	7
2.1. Rolul genelor HLA în răspunsul imun.....	7
2.2. Aspecte genetice și mutații asociate limfoproliferărilor cronice.....	8
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	9
3. Scopul și obiectivele studiului.....	9
4. Pacienți și Metode.....	10
4.1. Loturi de pacienți	10
4.2. Metode	11
4.2.1. Izolarea ADN genomic	11
4.2.2. Secvențierea genelor HLA	11
4.2.3. Analiza citomorfologică	12
4.2.4. Analiza markerilor de biochimie	12
4.2.5. Citometrie în flux	12
5. Rezultate și Discuții	13
5.1. Expresia genelor HLA la pacienții români cu Leucemie Limfocitară Cronică	13
5.1.1. Rezultate.....	13
5.1.2. Discuții.....	14
5.2. Corelarea expresiei clusterelor de diferențiere și a genelor HLA la pacienții români cu Leucemie Limfocitară Cronică	17
5.2.1. Rezultate.....	17
5.2.2. Discuții.....	18
5.3. Expresia genelor HLA la pacienții români cu Limfoproliferări Cronice.....	20
5.3.1. Rezultate.....	20
5.3.2. Discuții.....	21
6. Concluzii și contribuții personale	24
Bibliografie	25

Lista de lucrări științifice publicate

Articole publicate în reviste indexate ISI

1. **Tizu M**, Calenic B, Hârza M, Cristea BM, Maruntelu I, Caragea AM, Talangescu A, Dima A, Constantinescu AE, Constantinescu I. “HLA Gene Polymorphisms in Romanian Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia”. *Genet Res (Camb)*. 2024 Feb 28;2024:8852876. doi: 10.1155/2024/8852876. PMID: 38449839; PMCID: PMC10917483.

Factor de impact 1.4

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38449839/>

(Capitolul 5, Subcapitolul 5.1)

2. **Tizu M**, Calenic B, Constantinescu AE, Bratei AA, Stoia RA, Popa MC, Constantinescu I. “Cluster of Differentiation Markers and Human Leukocyte Antigen Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: Correlations and Clinical Relevance”. *Curr Issues Mol Biol*. 2024 Sep 11;46(9):10008-10025. doi: 10.3390/cimb46090598. PMID: 39329950; PMCID: PMC11430089.

Factor de impact 2.8

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39329950/>

(Capitolul 5, Subcapitolul 5.2)

Articole publicate în reviste indexate PubMed

1. **Tizu M**, Calenic B, Maruntelu I, Caragea AM, Talangescu A, Ursu L, Rotarescu C, Surugiu M, Constantinescu AE, Constantinescu I. “Immunogenetic Background of Chronic Lymphoproliferative Disorders in Romanian Patients-Case Control Study”. *Med Sci (Basel)*. 2024 Feb 23;12(1):14. doi: 10.3390/medsci12010014. PMID: 38535155; PMCID: PMC10972167.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38535155/>

(Capitolul 5, Subcapitolul 5.3)

Introducere

Bolile limfoproliferative cronice (CLPD) reprezintă una dintre subcategoriile componente ale bolile limfoproliferative (LPD). Sunt un grup divers de cancere de sânge caracterizate de manifestări heterogene și acumulare anormală de limfocite mature [1]. Ele se disting de leucemiile acute prin absența deoxinucleotidil transferazei terminale, o enzimă care se găsește de obicei în limfocitele tinere [2].

Din grupul CLPD fac parte o multitudine de afecțiuni, cum ar fi: Leucemia Limfocitară Cronică (LLC), limfomul difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Burkitt (BL), Limfom periferic cu celule T nespecificat altfel (PTCL-NOS), etc [3]. Pentru că aceste boli sunt atât de diferite, metodele de diagnostic variază de la o patologie la alta. Astfel, amintim că pentru LLC strategia de diagnostic presupune valorilor modificate ale leucocitelor și limfocitelor, urmată de efectuare unui frotiu de sânge periferic [4] în vreme ce în cazul limfomului Burkitt diagnosticul necesită rezultatul anatomo-patologic al biopsiei.

În prezent pe lângă aceste determinări se aplează tot mai mult la efectuarea profilului imunofenotipic care ajută atât în diagnostic cât și în monitorizarea ulterioară [4]. Astfel apare ideea realizării unui profil imunologic amplu ce poate sta la baza unui diagnostic precoce a formelor de gravitate și poate ajuta în elaborarea unor strategii terapeutice personalizate. În acest demers, de mare ajutor este testarea genelor antigenului leucoictar uman (HLA), ca markeri de boală [5].

În momentul de față, cele mai cunoscute asocieri dintre HLA și boală sunt: legătura dintre HLA-B*27 și spondilita anchilozantă, asocierea diabetului zaharat de tip 1 cu alelele HLA-DQB1, influența pe care o exercită HLA-DQ2 și HLA-DQ8 în apariția bolii celiace [6–8] etc. Au fost de asemenea semnalate asocieri între limfoproliferările cronice și genele HLA. Cele mai importante exemple sunt asocierea LLC cu alelele HLA-C*07:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DQB1*04:02, HLA-B*15:01 [9], alelele HLA-DQB1*05:01 și DRB1*01:01 care favorizează apariția DLBCL [10], HLA-A*02, HLA-B*58 și HLA-DQA1*04:01 care sunt întâlnite la pacienții cu limfom Burkitt [11,12] și lista poate continua.

Aceste asocieri ne-au motivat să căutam și în rândul populației din România posibile legături între genele HLA și CLPD. Totodată, aceste date pot contribui la stabilirea alelelor HLA ca și noi markeri de boală ce ar putea, pe viitor, servi atât la diagnosticarea anumitor patologii cât și la stabilirea caraterului de gravitate.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Date generale privind limfoproliferările cronice

1.1. Prevalența limfoproliferărilor cronice

Fiind o categorie amplă de boli, datele epidemiologice cu privire la întregul grup de limfoproliferări cronice, lipsesc, preferându-se raportarea pentru fiecare tip de neoplasm. Această tendință se poate observa nu doar în România ci pentru tot mapamondul.

În Europa, incidența LLC este de 4.2 cazuri: 100.000 locuitori în fiecare an [4] în vreme ce la noi în țară incidența este de 8 cazuri la 100.000 de locuitori pe an [13]. Limfomul difuz cu celule B mari, pe de alta parte, are prevalența estimată în Europa de Vest de aproximativ 45 de cazuri la 100.000 de locuitori [14,15]. Limfomul cu celule de manta este un tip de LMNH cu celule B are o prevalența pentru continentul nostru de 1-9 cazuri noi la 100.000 de locuitori [16]. În Europa 1 din 530.000 de indivizi cu vârste mai mici de 14 ani e diagnosticat cu limfomul Burkitt, în vreme ce pentru adolescenții între 15 și 19 ani poate să apară la 1 din 670.000 de persoane [17].

Un tip de cancer rar, este PTCL-NOS [18]. Acest, reprezintă 35% din cazurile de PTCL din Europa și America de Nord [19]. O altă patologie de asemenea agresivă este Leucemia/ Limfomul cu celule T al adulților (ATLL) [20]. Deși doar la 2-5% dintre purtătorii acestui virus putem vorbi de apariția ATLL [21], un studiu realizat pe populația din România arată o prevalență de 5.33 infecții diagnosticate la 10.000 de potențiali donatori de celule stem [22].

1.2. Clasificarea bolilor limfoproliferative cronice

Patologiile limfoproliferative cronice au fost pentru prima dată aduse în discuție de către Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) care începând cu anul 1956 își propune să clasifice nu doar aceste patologii ci toate tipurile de tumori [23,24], având drept principiu de clasificare localizarea și aspectul histologic specific tumorilor.

Limfoproliferările cronice cu celulă B matură se împart în: proliferari limfocitare preneoplazice și neoplazice mici, limfoame și leucemii cu celule B splenice, limfom limfoplasmocitar, limfom din zonă marginală, limfom folicular, limfom cutanat al centrului folicular, limfom cu celule de manta, transformări ale limfoamelor cu celule B indolente,

limfoame cu celule B mari, limfom Burkitt, limfoame și proliferare limfoide cu celule B asociate KSHV/HHV8, proliferări și limfoame asociate cu deficiență imună și dereglare și limfom Hodgkin [3]. Fiecare dintre aceste categorii cuprinde la rândul său mai multe patologii, care pot fi văzute în Anexe-Tabel Suplimentar 1 preluat din ghidul OMS [3].

Cancerle cu celulă matură T sau NK sunt la rândul lor divizate în: leucemii cu celulă matură T sau NK, limfoame cutanate primare cu celule T, proliferări și limfoame limfoide ale celulelor T intestinale și celulelor NK, limfom hepatosplenic cu celule T, limfom anaplastic cu celule mari[3]. Aceste categorii reunesc fiecare mai multe tipuri de neoplasme, după cum se poate observa în Anexe-Tabel Suplimentar 2, toate aceste patologii fiind regăsite în ghidul OMS[3].

1.3. Diagnosticul limfoproliferărilor cronice

În România, Ghidul de practică medicală din 2021 aprobat prin Ordinul nr.219 din 23 februarie 2021[4,25], prevede stabilirea diagnosticului de LLC conform criteriilor Societății Europene pentru Oncologie Medicală (ESMO) 2016 [4]. Astfel, un număr al limfocitelor care depășește $5 \times 10^9/L$ indicând o limfocitoză monoclonală este primul indiciu ce ridică suspiciunea acestui diagnostic[4]. Aceste modificări se corelează cu identificare pe frotiul de sânge periferic a limfocite de dimensiuni reduse, citoplasmă puțină și nucleu cu cromatină densă[4]. În procesul de diagnostic citometria ajută prin identificarea clusterilor de diferențiere (CD) specifice pt linia limfocitară B cum sunt CD19, CD20, CD79b, CD5, etc asociat cu expresia scăzută a lanțurilor de tip kappa sau lambda[4].

În cazul limfomului Burkitt pentru stabilirea diagnosticului este necesară analiza anatomo-patologică a biopsiei [26], la fel ca și în cazul Limfoamelelor periferice cu celulă T, dintre care face parte și PTCL-NOS[27]. Ghidul ESMO din 2015 stabilește ca standard de aur în diagnosticul DLBCL este de asemenea biopsia care oferă informații importante despre arhitectura tumorală și tipul de celule implicate [28].

MCL este una dintre malignitățile pentru care diagnosticul va fi pus pe baza examenului anatomo-patologic [29], iar pentru Limfomul respectiv leucemia cu celule T la adulți, cele mai utile teste diagnostice vor urmări determinarea morfologiei celulelor T și a fenotipului acestora și biopsierea țesuturilor afectate în vederea determinării histologiei acestora [30].

2. Răspunsul imun în limfoproliferările cronice

2.1. Rolul genelor HLA în răspunsul imun

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) este o componentă esențială pentru buna funcționare a sistemului imun adaptativ [31,32]. Importanța acestor molecule rezidă în implicarea lor în procesul de prezentare al antigenului către limfocitul T, fără de care activarea acestor celule imune nu s-ar putea realiza [32].

HLA și bolile autoimune

Întrucât moleculele MHC au o contribuție atât de importantă în buna desfășurare a răspunsului imun, studiile de specialitate au ajuns la concluzia că anumite variante ale genelor HLA pot favoriza apariția anumitor boli [32].

Una dintre cele mai bine stabilite legături este între spondilita anchilozantă (SA) și alelele HLA-B*27 [6]. Se consideră că în momentul de față peste 85% dintre pacienții cu SA sunt purtători ai acestei alele [33,34]. În timp ce HLA-B*27 rămâne cel mai proeminent factor de risc genetic, alte alele HLA, cum ar fi HLA-B*60, au fost, de asemenea, implicate în creșterea susceptibilității de a dezvolta SA [6].

O altă patologie amplu documentată în vederea stabilirii unei posibile asocieri este diabetul zaharat de tip 1 (T1D), boală autoimună cu o bază genetică complexă [35]. Studiile au arătat că regiunea HLA, în special genele HLA-DR și HLA-DQ, joacă un rol crucial în determinarea susceptibilității la T1D [36,37].

HLA și transplantul

În ultimii ani, s-au înregistrat progrese semnificative în înțelegerea impactului nepotrivirilor HLA asupra rezultatelor transplantului alogen de celule stem hematopoietice (HSCT). Potrivirea HLA este o componentă critică a HSCT, asigurând compatibilitatea dintre donator și primitor pentru a preveni respingerea grefei și boala grefă contra gazdă (GVHD) [38].

Transplantul de organe oferă un tratament salvator pentru multe persoane cu insuficiență de organ [39]. Potrivirea HLA este un factor critic în succesul transplantului de organe, deoarece reduce semnificativ riscul de respingere a grefei și îmbunătățește rezultatele pe termen lung [40].

2.2. Aspecte genetice și mutații asociate limfoproliferărilor cronice

Limfoproliferările cronice sunt un grup amplu de boli ce reunește sub același eșidă unele dintre cele mai cunoscute și întâlnite patologii cum sunt LLC, limfomul Burkitt, PTCL-NOS, etc [1]. Totuși, datorită faptului că aceste patologii au afectare celulară diferită, manifestări diferite și per total nu se aseamăna prin modul de evoluție al bolii[1], am considerat că trebuie analizate individual.

În cazul LLC, tehnologia FISH a ajutat semnificativ la înțelegerea acestei boli [41]. Aproximativ 80% dintre tumorile LLC prezintă anomalii cromozomiale specifice, inclusiv deleții la nivelul cromozomilor 13 și 11, trisomia 12 și ștergerea brațului scurt al cromozomului 17 [41].

Pentru DLBCL literatura deocumentează o varietate de modificări genetice implicate în apariția bolii. Întrucât DLBCL este format din două subcategorii GCB-DLBCL (cu celula B din centrul germinativ) și ABC-DLBCL (cu celula B activată) [42]. Mutațiile comune în GCB DLBCL au inclus BCL2, GNA13, EZH2, TNFRSF14, BCL6, MYC și PTEN, în timp ce ABC DLBCL a fost asociat frecvent cu mutații în TNFAIP3, MYD88, CDKN2A, BCL2, PRDM1, CD79A/B și CARD111 [42,43].

Semnul distinctiv al limfomului Burkitt este, din punct de vedere genetic, exprimarea aberantă a oncogenei c-MYC [44]. Această supraexpresie este determinată de translocațiile cromozomiale care fuzionează c-MYC cu genele de imunoglobuline [44]. Cea mai frecventă translocație, t(8;14), implică gena imunoglobulinei lanțului greu, în timp ce t(2;8) și t(8;22) implică genele imunoglobulinei lanțului ușor [44].

Unul dintre cele mai bine reprezentate neoplasme cu celulă T, PTCL-NOS, pare să aibă de asemenea o componentă genetică importantă [45]. Analiza expresiei genice a relevat o clasificare moleculară a PTCL-NOS funcție de expresia uneia dintre genele GATA3 sau TBX21 [45].

Toate aceste modificări genetice, întâlnite atât pentru patologiiile cu celulă T cât și pentru cele cu celulele B, au implicații importante pentru progresia și tratamentul bolii. Cercetarea și identificarea acestor markeri a adus răspunsuri despre mecanismele de acțiuniile întâlnite în cazul unor neoplasme. De asemenea, identificarea acestor modificări este în unele dintre cazuri patognomonică și ajută la stabilirea unor noi markeri de boală.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

3. Scopul și obiectivele studiului

Această cercetare contribuie la înțelegerea profundă a limfoproliferărilor cronice, oferind date valoroase pentru optimizarea strategiilor terapeutice și îmbunătățirea prognosticului pacienților. Printr-o analiză detaliată a caracteristicilor clinice și biologice, lucrarea își propune să pună piatra de temelie pentru noi direcții de cercetare și abordări terapeutice personalizate.

Prin urmare, studiul nostru are ca scop întregirea tabloului imunologic specific acestei vaste categorii de boli, reprezentate de limfoproliferările cronice. De asemenea, ne dorim să aducem o contribuție atât în domeniul imunologiei cât și al hematologiei, cu potențialul de a influența pozitiv managementul clinic al pacienților cu limfoproliferări cronice.

Următoarele obiective specifice au fost formulate pentru atingerea acestui țel:

- O.S.1: Colectarea de date de la pacienți diagnosticați cu diferite tipuri de limfoproliferări cronice. Numărul de pacienți incluși în studiu trebuie să depășească 100 de pacienți pentru relevanță clinică. Datele avute în vedere sunt: genul, vârsta, diferiți factori genetici ce pot duce la apariția bolii, comorbidități asociate, valorile anumitor markeri biochimici, hematologici și imunofenotipici;
- O.S.2: Investigarea asocierii dintre genele HLA și limfoproliferările cronice, analizate ca și grup unitar
- O.S.3: Investigarea asocierii dintre genele HLA și diferite tipuri de limfoproliferări cronice, analizate individual
- O.S.4: Investigarea asocierii dintre genele HLA și Leucemia Limfocitară Cronică
- O.S.5: Investigarea asocierii dintre genele HLA și Leucemia Limfocitară Cronică, având în vedere genul pacienților
- O.S.6: Conturarea profilului imunologic pentru pacienții cu Leucemia Limfocitară Cronică care să aibă în vedere atât markeri deja existenți pentru această boală, cât și genele HLA indentificate specific pentru această patologie

4. Pacienți și Metode

4.1. Loturi de pacienți

Această lucrare de doctorat își propune să monitorizeze un grup de 41 de femei și 63 de bărbați, rezultând un total de 104 pacienți diagnosticați cu limfoproliferări cronice, în Clinica de Hematologie a Institutului Clinic Fundeni, ce au fost comparați cu 100 de voluntari sănătoși, care nu au prezentat afecțiuni hematologice, infecții active acute sau cronice sau alte tipuri de neoplazii.

Prezentul studiu se concentrează pe identificarea genelor HLA de clasa I și II, ce joacă un rol în apariția limfoproliferărilor cronice și pot influența prognosticul și managementul terapeutic al pacienților diagnosticați cu una dintre malignitățile din acest grup de boli. Au fost investigate asocierile dintre polimorfismul genelor HLA de clasă I și II și 7 tipuri de limfoproliferări cronice: Leucemia limfocitară cronică (LLC), Limfom cu celule T periferice - nespecificat altfel (PTCL-NOS), Limfomul difuz cu celule B mari (DLBCL), Limfom Burkitt, Limfomul cu celule T al adultului (ATLL), Limfomul cutanat cu celule T, Limfomul cu celule de manta (MCL).

Criterii de includere în studiu

Au fost incluși în studiu pacienți diagnosticați cu limfoproliferări cronice care au îndeplinit următoarele criterii de elegibilitate: să aibă minim de 18 ani, capacitate de a oferi consimțământ informat, să nu aibă anomalii cromozomiale, să nu aibă infecții acute sau cronice, să nu aibă alte tipuri de cancer asociate sau boli în care prognosticul este rezervat (mai mic de 5 ani), absența bolilor autoimune, alergiilor și a tulburărilor mintale. În cazul femeilor un criteriu important avut în considerare a fost absența sarcinii în momentul includerii în studiu și a prelevării probelor.

Criterii de excludere din studiu

Pacienții care nu au îndeplinit criteriile de includere, au fost excluși din prezentul studiu. Astfel, dintr-un total de 164 de pacienți care au fost cooptați inițial pentru lucrarea de față, au fost excluși 60 din cauza nerespectării criteriilor de includere, rezultând lotul de 104 participanți pe care l-am studiat.

Toți pacienții care au participat la studiu și-au dat consimțământul pentru utilizarea probelor biologice prin semnarea unui formular de consimțământ informat, respectând

principiile etice susținute de Declarației de la Helsinki. De asemenea, studiul a fost aprobat de Comitetul de Bioetică al Institutului Clinic Fundeni din România (nr. 41066).

4.2. Metode

4.2.1. Izolarea ADN genomic

Pentru a putea analiza genele HLA, într-o primă etapă ADN-ul genomic a fost extras din sângele integral utilizând kit-ul QIAamp DNA Blood Mini kit. Astfel, ADN-ul a fost izolat din sângele utilizând coloane speciale cu membrane de dioxid de siliciu.

Procesul de extracție presupune amestecarea unui volum de 200 μ l de sânge integral cu protează și cu soluție de liză cu scopul distrugerii membranelor celulare și eliberării ADN-ului din nucleu, urmând ca într-un pas imediat următor sângele lizat să fie trecut printr-un tub cu membrană de siliciu, membrană de care se va prinde ADN-ul pe baza diferenței de sarcină. După ce membrana de siliciu este spălată în vederea îndepărtării eventualelor impurități, se va adăuga soluția de eluție care va determina ADN-ul să se desprindă de membrană.

4.2.2. Secvențierea genelor HLA

Pentru determinarea alelelor specifice, a fost aleasă ca metoda de genotipare, secvențierea de nouă generație folosind reactivi Immucor (Mia Fora NGS Flex, Norcross, Statele Unite) pentru construirea bibliotecii de lucru împreună cu kituri Illumina (San Diego, Statele Unite) pentru secvențierea propriu-zisă. Kiturile ajută la secvențierea a 11 dintre genele HLA și anume HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 și HLA-DRB5. Analiza acestor gene s-a realizat integral, pentru fiecare fiind secvențiați toți exonii cât și toți intronii.

Deși tehnica duce la obținerea unei vaste informații presupune multiple etape. Prima etapă în construirea bibliotecii de secvențiere este amplificarea ADN -ului prin PCR de tip long-range. După terminarea acestei amplificări, se poate trece la construcția bibliotecii de secvențiere sau produșii PCR pot fi stocați în siguranță timp de 4 zile la -20° C.

A doua etapă presupune scindarea enzimatică a produșilor de amplificare, urmată de repararea capetelor acestor fragmente, cu atribuirea unei nucleotide de tip adenina (A) la capătul 3', proces numit A-tailing. După terminarea acestei amplificări, produșii de amplificare nu pot fi stocați, ci este obligatorie purificarea ampliconilor folosind bile

magnetice. Pe baza diferenței de sarcină ADN-ul se va lega de de bile. După îndepărtarea supernatantului, bilele vor fi spalate cu etanol 80% după care se va adauga soluție Tris-HCl 10 mM pH8,0 pentru a facilita desprinderea ADN-ului de pe bile.

Produsul de amplificare curățat, fragmentat, reparat, având o adenina la capătul 3' pot trece direct la etapa următoare, cea de ligarea adaptorului de tip index. Prin această etapă fragmentele de ADN vor putea fi identificate în funcție de proba de la care provin și în funcție de gena de care aparțin. După terminarea amplificării, se va realiza imediat purificarea produselor obținuți, tot cu ajutorul bilelor magnetice.

Dintre fragmentele de ADN ligate și curățate, trebuie selecționate cele cu o dimensiune cuprinsă între 500 și 900bp (perechi de baze). Selecția fragmentelor de dimensiunea potrivită se realizează folosind metoda Pippin Prep. Această metodă are la bază electroforeza realizată cu ajutorul unei casete cu gel de agaroză 1,5%). Eluatul obținut prin selecția Pippin Prep trece printr-o ultimă amplificare, urmată de purificarea cu bile magnetice urmând ca la sfârșit, concentrația bibliotecii de lucru să fie măsurată folosind fluometrul Qubit. În funcție de concentrația afișată se va realiza diluția bibliotecii pre-secvențiere. Biblioteca va fi adusă la o concentrație de 1nM prin diluții succesive după care va fi denaturată cu NaOH. Ulterior concentrația va fi scăzută la 1.3pM folosind buffer-ul special de hibridizare din kit-ul Illumina. Când biblioteca este pregătită de amplificare, poate fi pipetată în cartușul Illumina, ce va fi ulterior introdus în secvențiatorul MiniSeq.

4.2.3. Analiza citomorfologică

Pentru realizarea unei hemoleucograme complete, utilizând analizorului SYSMEX XN-2000, fiecărui pacient i-au fost recoltați 5 mL de sânge integral.

4.2.4. Analiza markerilor de biochimie

Pentru determinarea CRP s-a folosit analizorul ABBOTT ALINITY, în vreme ce pentru determinarea LDH, a fost utilizat analizorul SIEMENS ATEL-LICA CH.

4.2.5. Citometrie în flux

Pentru analiza extensivă a profilului imunologic al pacienților cu LLC s-a realizat analiza imunofenotipică a clusterelor de diferentier specifice acestei boli, dintre care amintim: CD45, CD5, CD20, CD43, CD22, CD19, CD79b, CD23, CD81, CD38, CD11c, lanțuri ușoare kappa și lambda, FMC7 și CD200.

5. Rezultate și Discuții

5.1. Expresia genelor HLA la pacienții români cu Leucemie Limfocitară Cronică

5.1.1. Rezultate

Dintre pacienții incluși în lotul de studiu, 66 au fost diagnosticați cu LLC. Dintre aceștia 38 sunt bărbați și 28 sunt femei. Pentru a putea analiza posibilele asocieri dintre această patologie și genele HLA, a fost ales un lot control de 100 de voluntari sănătoși. Întrucât fiecare persoană prezintă câte două alele pentru fiecare dintre genele HLA analizate, a rezultat un total de 132 de alele analizate în rândul pacienților cu LLC și 200 de alele pentru subiecții din lotul control. Datele demografice pentru acești pacienți sunt menționate în Tabelul 5.1[46]. Pentru acești pacienți, au fost analizate prin secvențiere de noua generație 11 dintre genele HLA după cum am menționat în Capitolul 4.

Analiza frecvențelor alelelor HLA (la nivel de 6 cifre) a evidențiat patru alele protectoare și două predispozante asociate cu leucemia limfocitară cronică (LLC). În ciuda reprezentării mai scăzute a genelor HLA clasa I, a fost observat un efect protector puternic pentru HLA-A*24:02:01. În plus, alela HLA-DQA1*05:05:01 ($p = 0,01$, $OR = 0,56$) și alela HLA-DQB1*03:02:01 ($p = 0,03$, $OR = 0,4$), au fost, de asemenea, identificate ca protectoare. Dintre genele HLA-DRB3/4/5 s-a remarcat în mod specific, HLA-DRB4*01:03:01 ($p = 0,03$, $OR = 0,54$) care a prezentat o expresie scăzută în grupul de pacienți, dar a fost identificată la majoritatea voluntarilor din lotul control. Nu în ultimul rând, am reușit să evidențiem importanța genelor HLA-DRB1 în dezvoltarea leucemiei limfocitare cronice (LLC), prin identificarea asocierii pozitive dintre alela HLA-DRB1*04:02:01 și LLC ($p = 0,009$, $OR = 1,03$). Alela HLA-DRB3*02:01:01 a demonstrat, de asemenea, o asociere semnificativă statistic cu LLC ($p = 0,009$).

Au fost de asemenea analizate frecvențele alelelor HLA pentru pacienții cu LLC, ținând cont de gen. Grupul de pacienți cu LLC de sex feminin ($n=28$, 56 de alele) a fost comparat cu grupul de femei din lotul control ($n=45$, 90 de alele). La femeile cu LLC, HLA-B*39:01:01 ($p=0,019$, $OR=1,077$) și HLA-DRB3*02:01:01 ($p=0,019$, $OR=1,077$) au fost asociate cu boala, în timp ce HLA-A*03:01:01 ($p=0,03$, $OR=0,365$), HLA-B*35:01:01 ($p=0,021$, $OR=0,228$) și HLA-DQA1*05:05:01 ($p=0,036$, $OR=0,487$) au rol protector. La bărbați doar alela HLA-DRB1*04:02:01 ($p = 0,011$, $OR = 1,070$) a fost asociat semnificativ cu LLC.

5.1.2. Discuții

Numeroase studii conduse de echipe de cercetători români, au reușit să demonstreze existența mai multor asocieri între genele HLA și anumite boli, pentru populația noastră. Astfel până în prezent, s-a stabilit existența unei legături între Diabetul Zaharat de tip 1 și HLA-DQB1 [7]. De asemenea, au fost descoperite și alele predispozante ce favorizează apariția Insuficienței Renale Cronice cum sunt HLA-B*40, HLA-C*12 și HLA-DRB1*14 [47]. Pe lângă aceste descoperiri, poate unul dintre cele mai importante studii este cel condus de Marunțelu et al. [48] care vorbește de relația de cauzalitate dintre prezența alelelor HLA-DQA1*05:01, HLA-DQB1*02:01 și HLA-DQB1*02:02 și apariția bolii celiace.

Poate cel mai relevant rezultat al acestui studiu se referă la identificarea rolului predispozant al alelelor HLA-DRB1*04:02:01 ($p=0,001$, OR de 1,05) în apariția bolii. [46]. Rezultatul a fost concludent pentru întregul lot de pacienți cu LLC, dar și separat, pentru bărbații din lotul de studiu ($p = 0,011$, OR = 1,070) [46]. La aceeași concluzie a ajuns și echipa condusă de Gragert et al [9] care a consemnat implicarea acestei alele în apariția LLC pentru populația de evrei din Statele Unite ale Americii dar și pentru populația de americani. Într-un alt studiu, HLA-DRB1*04:02 este menționat de Scally și colab. pentru puternicul său rol protector în poliartrita reumatoidă [49].

O altă asociere pozitivă constatată de noi a fost între HLA-DRB3*02:01:01 și CLL ($p = 0,009$, OR = 1,03). Această asociere a fost identificată în mod particular și pentru grupul de femei cu LLC ($p = 0,019$, OR = 1,077). Mai multe rapoarte se concentrează pe genele HLA-DRB3 și pe implicarea și asocierea lor cu diferite patologii, deși rolul lor exact nu a fost încă stabilit. De exemplu, Mueller et al. [50] a găsit o expresie ridicată a alelei HLA-DRB3*01:01 în rândul femeilor cu LLC. Mai mult, Le et al. [51] a discutat despre implicarea HLA-DRB3*02:02 în apariția nefropatiei membranoase asociate cu PLA2R.

Prima alelă HLA protectoare pe care am identificat-o a fost HLA-A*24:02:01. Această constatare este similară cu cea a grupului condus de Cuttner și colab. [52] care a sugerat că alelele HLA-A24 sunt asociate pozitiv cu LLC în populația evreiască ashkenazi. Deși, ipoteza lor nu a fost susținută statistic, studiul nostru a reușit să confirme această premisă. Un scenariu similar a fost observat într-un studiu ulterior care a observat o incidență mai mare a alelelor HLA-A24 în rândul pacienților cu LLC, dar asocierea nu a fost semnificativă statistic [53]. Mai multe studii au identificat HLA-A*01:01 ca o alelă puternică

de protecție împotriva LLC [54]. În plus, a fost raportată pe scară largă o asociere puternică între alela HLA-A*02:01 și LLC [9,55].

Gragert et al. [9] subliniază legătura dintre prezența HLA-DQB1*03:02:01 și riscul crescut de a dezvolta LLC, o asociere raportată și la pacienții germani cu LLC [56]. Alte rapoarte indică un risc ridicat de progresie de la limfocitoza B monoclonală cu număr mare, la LLC, la pacienții cu mutații IGHV și HLA-DQB1*03 prezente [53]. Cu toate acestea, studiul nostru a arătat o frecvență ridicată a HLA-DQB1*03:02:01 în grupul de control, ceea ce ne conduce să atribuim un rol protector acestei alele. Aceste constatări sunt susținute de rolul protector al aceleiași alele în leucemia limfoblastică acută [57].

O altă legătură descoperită de Machulla et al. [56] este predispoziția de a dezvolta LLC dată de prezența HLA-DRB4*01:03 în rândul pacienților cu LLC. Această constatare este reconfirmată de aceeași echipă, într-un studiu ulterior ce detaliază legătura dintre HLA-DRB4*01:03 și boală, indiferent de vârsta și sexul pacienților [50]. Pe lângă aceste asocieri Zhao et al. amintește asocierea pozitivă dintre această alelă și diabetul zaharat [58]. În pofida acestor constatări, rezultatele noastre indică un rol puternic protectiv oferit de HLA-DRB4*01:03:01 împotriva apariției LLC. De asemenea, cercetarea noastră arată că prezența acestei alele este însoțită de prezența HLA-DQB1*03:02:01, într-o manieră similară celei din studiile anterioare.

Altă asociere semnificativă statistic identificată de echipa noastră a fost între HLA-DQA1*05:05:01 și LLC. Acest rezultat trebuie analizat în strânsă legătură cu un alt rezultat al studiului și anume, rolul protector pe care această alelă îl are în rândul populației feminine. Despre această variantă a genei HLA-DQA1 mai multe studii au stipulat implicarea acesteia în apariția anumitor patologii. Un exemplu relevant este studiul condus de Wang et al. [59] care investigând factorii ce influențează apariția și evoluția carcinom cutanat cu celule scuamoase au identificat alela HLA-DQA1*05:05 ca fiind responsabilă de apariția bolii. De asemenea, Schwarm et al. [60] au observat o asociere pozitivă între pemfigoidul bulos apărut în rândul populației germanice și HLA-DQA1*05:05, iar Nowak et al. [61] au identificat o legătură puternică între prezența HLA-DQA1*05 și colită ulceroasă extinsă întâlnită la copii.

Toate rezultatele enumerate mai sus, având semnificație statistică, au fost însoțite de o serie de alte descoperiri în materie de alele HLA, care deși nu depășesc limita semnificației statistice trebuie avut în vedere pentru studii desfășurate pe cohorte mai mari. Dintre aceste

alele amintim de: HLA -DPA1*02:02:02, HLA-DRB1*11:01:01, HLA-A*03:02:01 și HLA-DQA1*01:02:01. De asemenea, o altă alelă importantă care însă nu a trecut limita semnificației statistice pentru lotul întreg de pacienți cu LLC este HLA-B*35:01:01 ($p = 0,057$). Am indentificat însă această alelă pentru rolul ei protector în rândul populației feminine cu LLC. Despre antigenul HLA-B35, un studiu realizat în 1994 vorbește pentru prima dată de incidența ridicată a acestui antigen în rândul evreilor proveniți din Europa dar și în rândul caucazienilor cu LLC [52]. În cazul nostru, alela HLA-B care are un puternic rol predispozant în rândul femeilor este HLA-B*39:01:01. Acest rezultat este congruent cu descopererire lui Hojjat-Farsangi et al. [54] care a identificat două alele HLA-B (HLA-B*53:01 și HLA-B*65:01) cu rol protector în rândul bărbaților și alela HLA-B*35:01 cu o incidență ridicată la pacienții cu LLC, indiferent de gen.

Apropiindu-se de limita semnificației statistice, HLA-DRB1*11:01:01 ($p = 0.057$) este unul dintre rezultatele importante obținute. Acest rezultat este congruent cu identificarea legăturii dintre HLA-DRB1*11:01 și LLC de către DiBernardo et al. [55] deși, ca și în cazul nostru, fără relevanță statistică. Rolul pe care HLA-DRB1*11:01 îl are în apariția diverselor tipuri de cancer a fost amintit în cadrul a numeroase studii. Spre exemplu, Aureli et al.[62] a raportat că alela anterior menționată este un potențial factor de risc pentru cancerul de sân. Arons et al.[63] vorbește despre importanța HLA-DRB1*11:01 în apariția leucemiei cu celule păroase. Totodată, Rossman et al.[64] a documentat o incidență crescută de apariție a sarcoidozei la pacienții cu această alelă. Unul dintre puținele studii care vorbește de rolul protector al HLA-DRB1*11:01, este cel condus de Rezaieyazdi et al.[65], care în artrita idiopatică juvenilă a identificat această alelă într-un procent crescut la pacienți sănatoși, asta oferindu-i valența protectivă.

Subcapitolul 5.1. reprezintă o traducere, adaptare și extindere a rezultatelor și discuțiilor publicate anterior de doctorand în articolul "*HLA Gene Polymorphisms in Romanian Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*"[46] ca ceriță parțială în îndeplinirea tezei de doctorat.

5.2. Corelarea expresiei clusterelor de diferențiere și a genelor HLA la pacienții români cu Leucemie Limfocitară Cronică

5.2.1. Rezultate

Pentru lotul nostru de pacienți cu LLC, am dorit să vedem dacă asocierea genelor HLA poate fi corelată cu alți markeri preexistenți. Astfel, am căutat asocieri între genele HLA și CD-urile testate în mod uzual în cazul acestor bolnavi. De asemenea am analizat și: PCR (proteina C reactivă), LDH și hemoleucograma [66].

Cunoscând că atât hemoleucograma cât și imunofenotiparea prezintă tablouri specifice la pacienții cu această patologie am asociat acești markeri și i-am analizat simultan. Am identificat astfel că pacienții la care CD38 este pozitiv, numărul de leucocite depășește în general 55000/ μ l ($p=0.019$, $OR=4.1$). De asemenea, CD79b este mai frecvent pozitiv la pacienții care au peste 27000/ μ l de leucocite ($p=0.1965$, $OR=2,23$). Un alt marker important este CD81 care atunci când este pozitiv, se asociază cu creșteri ale leucocitelor de până la 18500/ μ l ($p=0.1144$, $OR=2.75$). CD38 pozitiv se corelează de asemenea și cu valori ale limfocitelor ce depășesc 45000/ μ l ($p=0.0087$, $OR=7$). Într-o manieră similară, prezența lui CD22 este de cele mai multe ori însoțită de valori ale limfocitelor peste limita normală dar care nu depășesc 6500/ μ l ($p=0.171$, $OR=4.05$).

Valorilor LDH au depășit 470 U/L pentru pacienții CD23 a fost negativ, în vreme ce la pacienții cu CD43 a fost intens pozitiv, nivelurile LDH au depășit 360 U/L ($OR=3.48$). De asemenea, s-a observat ca pacienții CD22 pozitivi au prezentat mai frecvent valori ale CRP > 5 mg/L ($p=0.074$, $OR=4.643$).

Acestor asocieri li se adaugă corelarea expresiei genelor HLA cu profilul imunofenotipic. Astfel, am observat că 50% dintre pacienții au expresie puternică a CD20 au și una dintre alelele HLA-DRB1*11:04:01 sau HLA-B*49:01:01 prezentă. Pe de altă parte, HLA DRB1*15:02:01 este asociat cu o expresie diminuată a CD20.

Expresia CD79b este corelată pozitiv cu HLA-DPA1*02:01:02 și HLA-B*08:01:01, deoarece 57,14% dintre pacienții CD79b puternic pozitivi au asociat cel puțin unul dintre cele două alele. Dintre cele patru alele care au fost corelate pozitiv cu expresia CD22 (HLA-B*49:01:01, HLA-C*07:01:01, HLA-DPB1*02:01:02 și HLA-DRB1*11:01:01), s-a observat că 85,71% dintre pacienții cu expresie CD22 puternică au asociat cel puțin două din cele patru variante HLA.

În ceea ce privește exprimarea CD81, s-a observat că 57,14% dintre pacienții cu CD81 negativ sau cu expresie slabă, asociază cel puțin una dintre cele două alele (HLA-DPB1*04:02:01 și HLA-DRB4*01:03:01). În comparație, niciunul dintre pacienții cu expresie puternică de CD81 nu prezintă aceste variante ale genelor HLA menționate.

5.2.2. Discuții

Unul dintre markerii avuți în vedere este CD22, asociat în special cu leucemia limfoblastică acută [67] dar care este prezent și în LLC, mai ales în formele atipice [68] și în formele cu o afectare importantă a țesutului limfoid secundar, cu apariția limfadenopatiei și a splenomegaliei la pacienții la care este identificat [69]. În lotul nostru de pacienți, CD22 a fost asociat cu următoarele alele HLA-B*49:01:01, HLA-C*07:01:01, HLA-DPB1*02:01:02 și HLA-DRB1*07:01:01. Aceste alele au fost anterior descoperite pentru că intervin în apariția diferitelor patologii: HLA-C*07 crește riscul de apariție al leucemiei mieloide acută [70], HLA-B*49:01:01 s-a evidențiat la persoanele cu anemie aplastică [71], iar HLA-DPB1*02:01 este des întâlnit la copii cu leucemia limfoblastică acută forma comună [72]. În concluzie, pozitivitatea CD22 asociată cu anumite alele HLA apare sugestiv în leucemiile acute, chiar dacă nu sunt exclusiv pentru acest tip de cancer.

Cunoscut și sub numele de antigen limfocitar comun, CD45, este unul din markerii distinctivi al leucocitelor fiind specific pentru mielomul multiplu și leucemia limfoblastică acută [73]. Prezența acestui marker în bolile limfoproliferative cronice a fost de a distinge între formele tipice și atipice de LLC [74,75]. În urma efectuării testelor statistice am ajuns la concluzia că între CD45 și HLA-DQA1*05:01:01, HLA-C*07:01:01 și HLA-DQA1*01:02:02 avem corelații statistic semnificative. Studiile arată că dintre aceste alele HLA-C*07:01 [9] intervine în apariția LLC, în vreme ce HLA-DQA1*01:02:01 a fost aproape de limita semnificației statistice [46] tot în cazul pacienților cu LLC.

Un dintre cei mai importanți markeri de suprafață prezent pe limfocitele B este CD20 [76], el fiind unul dintre antigenele țintă pentru care au fost elaborate diverse terapii [77–79]. În majoritatea cazurilor de LLC, expresia antigenului CD20 este redusă sau absentă [80], conform literaturii de specialitate și întărit de observațiile noastre.

CD43, a fost asociat de-a lungul timpului și cu alte afecțiuni hematologice cum ar fi LLC sau patologii ale liniei mieloide [81–84]. CD43 este unul dintre markerii avuți în vedere

în LLC datorită pozitivării sale în special în formele atipice ale acestei boli [85]. Observațiile noastre semnaleză pozitivitatea CD43 la puțini pacienți, la care, de altfel a fost însoțit de prezența alelei HLA-DRB1*15:01:01 indicând forme atipice de LLC.

CD23 ajută în diferențiere SLL/CLL de limfomul MALT [86,87]. Acest marker a fost asociat semnificativ statistic cu alelele HLA-A*11:01:01 și HLA-B*39:01:01. Deși majoritatea pacienților noștri au prezentat expresie CD23, faptul că alelele HLA-B*39:01:01 și HLA-A*11:01:01, au fost găsite în principal la pacienții cu expresie CD23 redusă în cohorta noastră, în ciuda prevalenței ridicate a CD23, subliniază nevoia unor studii suplimentare pentru a înțelege mai bine rolul acestor markeri în LLC.

Având rol structural la nivelul receptorului antigenic prezent la suprafața limfocitelor B, CD79 este format din două subunități: CD79a și CD79b[88], dintre care CD79b este specific pacienților cu LLC. Am observat o asociere între absența expresiei CD79b și prezența alelei HLA-A*32:01:01, precum și o asociere între expresia CD79b și alela HLA-DPA1*02:01:02 în cohorta noastră de pacienți. Literatura ne indică o evoluție nefavorabilă a pacienților cu CD79b intens pozitiv [89,90], concluzie reproductibilă și pentru pacienții noștri ce îndeplinesc această condiție.

Un marker util datorită proprietății sale de a distinge patologia limfocitară de cea mieloidă este CD81 [91,92]. Pentru lotul de pacienți cu LLC, am găsit o legătură semnificativă statistic între CD81 și HLA-DRB1*14:01:01, HLA-DQA1*01:04:01, HLA-DPB1*04:02:01 și HLA-DQB1*05:03:01. Despre HLA-DRB1*14:01:01 literatura documentează prezența sa la pacienții cu ALL [93], iar HLA-DQB1*05 conferă protecție împotriva apariției limfomului Hodgkin alături de HLA-DPB1*04:01 [94,95].

Asemenea rezultatelor obținute de echipa noastră și alte studii certifică prezența CD38 pozitiv în cazurile agresive de LLC [96,97]. Rezultatele noastre indică un risc semnificativ mai mare de evoluție rapidă a bolii la pacienții CD38+ cu un număr de leucocite peste 55.000/ μ l ($p=0,0193$, $OR=4,1$) și un număr de limfocite peste 45.000/ μ l ($p=0,0087$, $OR=7$). Acești pacienți ar putea beneficia de o inițiere mai precoce a tratamentului.

Subcapitolul 5.2. reprezintă o traducere, adaptare și extindere a rezultatelor și discuțiilor publicate anterior de doctorand în articolul "*Cluster of Differentiation Markers and Human Leukocyte Antigen Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: Correlations and Clinical Relevance*" [66] ca ceriță parțială în îndeplinirea tezei de doctorat.

5.3. Expresia genelor HLA la pacienții români cu Limfoproliferări Cronice

5.3.1. Rezultate

Pe lângă studierea legăturii dintre HLA și LLC, am dorit să analizăm și potențiala legătură dintre alte tipuri de limfoproliferări cronice și genele HLA. Astfel am avut în vedere următoarele malignități: DLBCL, MCL, Limfomul cutanat primar cu celule T, Limfom Burkitt, PTLCL-NOS și ATLL [98].

Pentru cei 38 de pacienți diagnosticați cu alte tipuri de limfoproliferări cronice am observat expresia celor mai importante 6 gene HLA. Datele provenite de la acești pacienți au fost comparate cu rezultatele a 50 de pacienți sănătoși din totalul de 100 ai lotului control. Am considerat necesară adaptarea numărului de pacienți ai lotului control astfel încât rezultatele statistice să fie concludente. Astfel, am analizat un număr de 76 de alele în grupul de pacienți și 100 de alele în grupul de control.

Probele acestor pacienți au fost genotipate și analizate prin două metode diferite. Într-o primă etapă s-a realizat secvențierea utilizând metoda SSP (Sequence-Specific Primers). Raportarea a fost realizată la 4 digits și datele au fost analizate și publicate în articolul autorului intitulat *Immunogenetic Background of Chronic Lymphoproliferative Disorders in Romanian Patients-Case Control Study* [98]. Ulterior am ales să utilizăm tehnica NGS, și să analizăm aceleași date la 6 digits pentru a oferi unitate rezultatelor acestei cercetări de doctorat. După ce am crescut rezoluția, am remarcat că toate asocierile semnalate la 4 digits s-au păstrat și în cazul raportării la 6 digits dar pe lângă acestea am identificat și noi asocieri.

Evaluând frecvențele alelelor la nivel de patru cifre, am identificat șase alele protectoare (HLA-A*11:01 - $p = 0,010$, HLA-B*35:02 - $p = 0,037$, HLA-B*81:01 - $p = 0,037$, HLA-C*07:02 - $p = 0,036$, HLA-DRB1*11:01 - $p = 0,021$ și HLA-DRB1*13:02 - $p = 0,03$) și două predispozante (HLA-C*02:02 - $p = 0,002$ și HLA-C*12:02 - $p = 0,002$) pentru întregul grup de pacienți cu tulburări limfoproliferative cronice.

Totodată, am evaluat alelele HLA pentru fiecare dintre patologii din lotul de studiu. Pentru populația PTLCL-NOS au fost stabilite două asocieri importante, HLA-C*12:02 ($p = 0,0001$, OR = 1,231) a fost asociată pozitiv cu boala, în vreme ce HLA-A*11:01 ($p = 0,009$, OR = 0,128) are rol protectiv. În cazul DLBCL am stabilit rolul protector al HLA-B*39:01 ($p = 0,003$, OR = 0,06). Pentru pacienții cu limfom Burkitt, am descoperit următoarea alelă

tot cu rol protectiv HLA-C*06:02 ($p = 0,047$, $OR = 0,233$) . Pentru restul patologiilor nu au fost semnalate asocieri semnificative statistic.

În urma realizării secvențierii prin NGS, în cazul pacienților PTLC-NOS au fost identificate cele doua alele întâlnite și în cazul analizei cu rezoluție de 4 cifre. Este vorba de HLA-A*11:01:01 ($p=0.009$, $OR=0.128$) cu rol protector și HLA-C*12:02:01 ($p=0.000$, $OR=1.231$) cu rol predispozant. Pe lângă acestea, o noua alelă a fost remarcată pentru protecția pe care o oferă pacienților și anume HLA-DRB1*11:01:01 ($p=0.03$, $OR=0.160$).

Pentru pacienții cu DLBCL, alela HLA-B*39:01 își păstrează rolul protector chiar și după analiza la nivel de 6 cifre, HLA-B*39:01:01 ($p=0.03$, $OR=0.060$). De asemenea a mai fost identificată o alelă de asemenea cu rol protector HLA-B*38:01:01 ($p=0.03$, $OR=0.060$).

În cazul Limfomului Burkitt încă o alelă cu semnificație statistică a fost identificată suplimentar de alela HLA-C*06:02:01 ($p=0.047$, $OR=0.233$). Este vorba de HLA-DQA1*04:01:01 ($p=0.023$, $OR=0.250$) cu rol protector. Pacienții cu ATLL s-au evidențiat pentru asocierea bolii cu HLA-A*11:01:01 ($p=0.027$, $OR= 0.08$) care în acest caz are un important rol protectiv.

Analiza noastră a evidențiat o asociere semnificativă între Limfomul Cutanat și alelele HLA-A*26:01:01 ($p=0.043$, $OR=0.120$), HLA-C*07:02:01 ($p=0.013$, $OR=0.133$) HLA-C*15:02:01 ($p=0.027$, $OR=0.080$) și HLA-DRB1*16:01:01 ($p=0.025$, $OR=0.187$) sugerând ca aceste alele oferă protecție. Profilul genetic al pacienților cu MCL se caracterizează prin predispoziția de a dezvolta boala, dată de HLA-C*02:02:02 ($p=0.003$, $OR=1.500$) dar și de protecția conferită de HLA-DPB1*13:01:01 ($p=0.008$, $OR=0.030$).

5.3.2. Discuții

În momentul de față în literatura de specialitate găsim multe referiri la asocierea dintre tulburări limfoproliferative cronice și genele HLA, din câte știm noi, pentru populația românească nu au fost efectuate astfel de studii până în prezent [99–102]. Astfel, la baza deciziei noastre de a cerceta aceste asocieri stă necesitate stabilirii unor rezultate pentru populația autohtonă.

Unul dintre cele mai promițătoare rezultate este reprezentat de HLA-C*02:02 și HLA-C*12:02, alele asociate pozitiv cu limfoproliferările studiate de noi. Dintre acestea, HLA-C*12:02 este responsabil de apariția PTLC-NOS, în vreme ce HLA-C*06:02 are rol

protector împotriva dezvoltării limfomului Burkitt. Deloc surprinzător în momentul tipării la 6 cifre, prin NGS, aceste rezultate se păstrează (HLA-C*06:02:01 și HLA-C*12:02:01) și mai mult decât atât pe lângă ele au mai fost identificate și alele HLA-C*07:02:01 și HLA-C*15:02:01 protective pentru pacienții cu limfom cutanat și alele HLA-C*02:02:02 care predispune la apariția MCL. Literatura amintește de o alelă din grupul HLA-C*12 implicată în apariția DLBCL la populația caucazoidă, aparținând haplotipului HLA-A*2601~C*1203~B*3801~DRB1*0402~DQB1*0302 [99].

Alte alele cu rol protectiv pentru toți pacienții cu limfoproliferări, sunt HLA-B*35:02 și HLA-B*81:01, la care se adaugă efectul protector al HLA-B*39:01:01 și HLA-B*38:01:01 doar pentru pacienții cu DLBCL. Acest rol protector al HLA-B*35 a fost amintit de-a lungul timpului de mai multe studii, cum este spre exemplu cel elaborat de Wang și colab. [103] care vorbește despre faptul că alela HLA-B*35:03 este asociată cu un risc scăzut de apariție al LMNH. Aceste date nu sunt însă confirmate de Brazzelli et al. [101] care asociază prezența HLA-B*35 cu micoza fungoide. Desigur că au fost identificate și patologii pentru care alele din acest grup cresc riscul de apariție al unor patologii, după cum este cazul HLA-B*35:01 întâlnit predominant la pacienții cu leucemie limfocitară cronică(13). Tot pentru pacienții cu HLA-B*35 prezent, Benencio și colab. [104], raportează o creștere a riscului de apariție al mielopatiei/paraparezii spastice tropicale pentru pacienții care prezintă totodată și infecții cu HTLV-1. Am identificat și studii care vin cu o opinie diferită față de constatările echipei noastre, este vorba despre HLA-C*07:02 identificată de noi pentru rolul său protector, descoperire contrazisă de identificarea alelelor din grupul HLA-C*07 pentru susceptibilitatea crescută de apariție a ATLL pentru populația purtătoare [104]. Alte studii vorbesc despre rolul protector oferit de HLA-Cw*08, la pacienți cu mielopatie și HTLV-1 pozitiv (93), iar Wang și colab. [105] identifică alela HLA-C*07:02 pentru că intervine în cursul evoluției mielomului multiplu.

O expresie crescută a HLA-A*11:01 în cadrul lotului control asociată cu expresia scăzută a acestei alele în rând pacienților cu PTLC-NOS a indicat rolul protectiv al acestei variante genice. Asocierea își păstrează validitatea și la rezoluție de 6 cifre (HLA-A*11:01:01) și în urma tipării NGS apar și alte rezultate semnificative statistic. Dintre acestea amintim rolul protectiv oferit de aceeași alelă HLA-A*11:01:01 pacienților cu ATLL și protecția dată de HLA-A*26:01:01 persoanelor diagnosticate cu limfom cutanat. Varianta serologică a acestei alele, HLA-A11, a fost raportată de asemenea ca fiind protectivă însă de această dată la pacienții cu limfom Hodgkin [10,106]. Gavioli și colab.

[107] vorbesc despre importanța HLA-A*11 în scăderea expresiei limfomului Burkitt. De asemenea alelele din grupul HLA-A*11 sunt amintite pentru protecția pe care o oferă populației coreene împotriva dezvoltării DLBCL [108].

De asemenea au fost identificate alelele HLA-DRB1*13:02 ($p = 0,037$, OR = 0,940) și HLA-DRB1*11:01 ($p = 0,021$, OR = 0,190) pentru expresia lor crescută în lotul control, indicând un efect protector împotriva dezvoltării limfoproliferărilor. În urma tipării NGS, acestor alele li se adaugă alelele HLA-DRB1*11:01:01 ce oferă protecție celor diagnosticați cu PTLC-NOS și HLA-DRB1*16:01:01, identificată pentru protecția oferită în limfomul cutanat. Aceste rezultate sunt similare cu cele ale Wang și colab. [103] care în cazul limfomului folicular au descoperit protecția oferită de HLA-DRB1*13 în rândul purtătorilor.

Nu în ultimul rând, HLA-DRB1*13 și HLA-DQB1*03 protejează atât împotriva limfomului Hodgkin cât și a celui non-Hodgkin, conform studiului condus de Galleze et al. [109] În mod similar rezultatele au fost reproduse pentru infecție virală cu hepatită B la pacienții din Iran [110] pentru finlandezii cu scleroză multiplă [111] dar și la populația cu artrită reumatoidă [112,113]. O altă documentare este pentru HLA-DRB1*04:01 care protejează împotriva apariției DLBCL [103].

Alte două alele identificate în urma secvențierii NGS, sunt HLA-DQA1* 04:01:01 cu rol protector în limfomul Burkitt și HLA-DPB1*13:01:01 ce oferă protecție pacienților cu MCL. Chiar dacă asocierea menționată anterior dintre HLA-DPB1 și MCL nu este amintită până în prezent în literatură, se pare că alela HLA-DPB1*13:01:01 a fost identificată la pacienții infectați cu SARS-CoV-2 pentru că împiedică instalarea formelor severe de boală [114], dovedindu-și astfel rolul protector. În cazul alelei HLA-DQA1* 04:01:01, aceasta a fost amintită în literatură pentru creșterea riscului de apariție a limfomului Burkitt la copii [115].

Subcapitolul 5.3. reprezintă o traducere, adaptare și extindere a rezultatelor și discuțiilor publicate anterior de doctorand în articolul *“Immunogenetic Background of Chronic Lymphoproliferative Disorders in Romanian Patients-Case Control Study [98]”* ca ceriță parțială în îndeplinirea tezei de doctorat.

6. Concluzii și contribuții personale

Lucrarea de față este printre singurele care analizează implicarea genelor HLA în limfoproliferările cronice, la nivel internațional. De asemenea, din cunoștințele noastre până în prezent nu a mai fost elaborat niciun alt studiu similar pentru populația românească.

Mai mult decât atât, pentru studierea genelor HLA în cazul acestui grup de patologii, am apelat la cea mai avansată metodă de secvențiere utilizată în momentul de față și anume NGS. Astfel, am realizat o genotipare de rezoluție înaltă cu raportarea rezultatelor la nivel de 6 cifre. Am obținut în acest fel informații detaliate despre genele implicate atât în procesul de protecție împotriva apariției unuia dintre limfoproliferările cronice, cât și despre genele care cresc riscul de apariție al acestor patologii.

Mai mult decât atât, pentru un eșantion din lotul de pacienți, am realizat secvențiere de rezoluție înaltă prin două metode și am putut efectua raportarea la nivel de 4 cifre și ulterior la nivel de 6 cifre. Asta ne-a dat ocazia să descoperim trei aspecte foarte importante: 1) există diferențe între raportarea la 4 cifre respectiv la 6 cifre; 2) testând 6 dintre genele HLA prin ambele metode am identificat mai multe asocieri semnificative statistic pentru pacienții tipați NGS, cu rezultate raportate la rezoluție de 6 cifre; 3) genotipând cu ajutorul NGS mai multe gene HLA am identificat asocieri noi între boală și genele netestate anterior.

Pentru pacienții cu LLC, care au reprezentat cea mai mare pondere a lotului nostru, am încercat să realizăm un profil imunologic care să cuprindă atât markeri deja cunoscuți și folosiți cum sunt markerii imunofenotipici, valorile leucocitelor și limfocitelor, valorile LDH și CRP, cât și potențiali noi markeri de boala cum sunt alelele HLA. Toate aceste date ne-au ajutat să creionăm un tablou imunologic amplu pentru pacienții noștri și am reușit să punctăm trăsăturile paraclinice definitorii ale pacienților cu LLC atipică. Acest lucru reprezintă o premieră ce poate deschide noi orizonturi spre o abordare terapeutică diferită în viitor.

Limfoproliferările cronice sunt un grup heterogen de boli, de aceea există necesitatea unei mai bune caracterizări a acestui grup de patologii în vederea elaborării unor strategii terapeutice performante. Lucrarea de față nu reprezintă decât un prim pas în realizarea unui tablou imunologic complex, introducând pentru prima oară în prim plan genele HLA ca marker de boală cât și asocierea HLA-CD ce indică forme atipice de LLC, pentru o mai bună caracterizare a pacienților cu această boală.

Bibliografie

- [1] Vaillant AAJ, Stang CM. Lymphoproliferative Disorders. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology 2023;334–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801368-7.00016-8>.
- [2] Faber J, Kantarjian H, Roberts WM, Keating M, Freireich E, Albitar M. Terminal deoxynucleotidyl transferase-negative acute lymphoblastic leukemia. Arch Pathol Lab Med 2000;124:92–7. <https://doi.org/10.5858/2000-124-0092-TDTNAL>.
- [3] Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Leukemia 2022;36:1720–48. <https://doi.org/10.1038/S41375-022-01620-2>.
- [4] Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kater AP, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology 2021;32:23–33. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.09.019>.
- [5] Trabace S. HLA and disease association. The Journal of Headache and Pain 2000 1:2 2000;1:S109–13. <https://doi.org/10.1007/S101940070003>.
- [6] Hanson A, Brown MA. Genetics and the causes of ankylosing spondylitis. Rheum Dis Clin North Am 2017;43:401. <https://doi.org/10.1016/J.RDC.2017.04.006>.
- [7] Guja C, Guja L, Nutland S, Rance H, Sebastien M, Todd JA, et al. Type 1 diabetes genetic susceptibility encoded by HLA DQB1 genes in Romania. J Cell Mol Med 2004;8:249. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2004.TB00280.X>.
- [8] Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. American Journal of Gastroenterology 2019;114:1587–92. <https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000000310>.
- [9] Gragert L, Fingerson S, Albrecht M, Maiers M, Kalaycio M, Hill BT. Fine-mapping of HLA associations with chronic lymphocytic leukemia in US populations. Blood 2014;124:2657–65. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-02-558767>.
- [10] Zhong C, Cozen W, Bolanos R, Song J, Wang SS. The role of HLA variation in lymphoma aetiology and survival. J Intern Med 2019;286:154–80. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12911>.
- [11] Kirimunda S, Verboom M, Otim I, Ssenono M, Legason ID, Nabalende H, et al. Variation in the human leukocyte antigen (HLA) system and risk for endemic Burkitt Lymphoma in Northern Uganda. Br J Haematol 2020;189:489. <https://doi.org/10.1111/BJH.16398>.
- [12] Liu Z, Luo Y, Kirimunda S, Verboom M, Onabajo OO, Gouveia MH, et al. Human Leukocyte Antigen Contributes to Childhood Endemic Burkitt Lymphoma in Eastern Africa: A Case-Control Association Study. Blood 2022;140:9233–5. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2022-169911>.

- [13] Leucemia limfocitară cronică – cel mai frecvent tip de leucemie n.d. <https://cancer-plan.ro/leucemia-limfocitara-conica-cel-mai-frecvent-tip-de-leucemie/> (accessed October 28, 2024).
- [14] Kanas G, Ge W, Quek RGW, Keeven K, Nersesyan K, Arnason JEA. Epidemiology of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) in the United States and Western Europe: population-level projections for 2020-2025. *Leuk Lymphoma* 2022;63:54–63. <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1975188>.
- [15] Pacis S, Bolzani A, Heuck A, Gossens K, Kruse M, Fritz B, et al. Epidemiology and Real-World Treatment of Incident Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL): A German Claims Data Analysis. *Oncol Ther* 2024;12:293–309. <https://doi.org/10.1007/S40487-024-00265-8/FIGURES/3>.
- [16] Orphanet: Mantle cell lymphoma n.d. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/52416> (accessed November 3, 2024).
- [17] Orphanet: Burkitt lymphoma n.d. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/543> (accessed November 2, 2024).
- [18] Weiss J, Reneau J, Wilcox RA. PTCL, NOS: An update on classification, risk-stratification, and treatment. *Front Oncol* 2023;13. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1101441>.
- [19] Oluwasanjo A, Kartan S, Johnson W, Alpdogan O, Gru A, Mishra A, et al. Peripheral T-Cell Lymphoma, not Otherwise Specified (PTCL-NOS). *Cancer Treat Res* 2019;176:83–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99716-2_4.
- [20] Marchi E, O'Connor OA. The rapidly changing landscape in mature T-cell lymphoma (MTCL) biology and management. *CA Cancer J Clin* 2020;70:47–70. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21589>.
- [21] Shah UA, Shah N, Qiao B, Acuna-Villaorduna A, Pradhan K, Adrianzen Herrera D, et al. Epidemiology and survival trend of adult T-cell leukemia/lymphoma in the United States. *Cancer* 2020;126:567–74. <https://doi.org/10.1002/CNCR.32556>.
- [22] Tanase AD, Colita A, Craciun OG, Lipan L, Varady Z, Stefan L, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma—Romanian Experience. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol 9, Page 2417 2020;9:2417. <https://doi.org/10.3390/JCM9082417>.
- [23] WCT: Objective and Historical perspective n.d. <https://whobluebooks.iarc.who.int/about/objective-and-historical-perspective/> (accessed October 20, 2024).
- [24] Attygalle AD, Chan JKC, Coupland SE, Du MQ, Ferry JA, Jong D de, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of mature lymphoid and stromal tumors – an overview and update. *Leuk Lymphoma* 2024;65:413–29. <https://doi.org/10.1080/10428194.2023.2297939>.
- [25] GHID 23/02/2021 - Portal Legislativ n.d. <https://legislatie.just.ro/public/DetaliuDocument/238478> (accessed November 4, 2024).
- [26] Graham BS, Lynch DT. Burkitt Lymphoma. *StatPearls* 2023.

- [27] d'Amore F, Gaulard P, Trümper L, Corradini P, Kim WS, Specht L, et al. Peripheral T-cell lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2015;26:v108–15. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV201>.
- [28] Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2015;26:vii78–82. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV304>.
- [29] Dreyling M, Campo E, Hermine O, Jerkeman M, Le Gouill S, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2017;28:iv62–71. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX223>.
- [30] Ishitsuka K. Diagnosis and management of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Semin Hematol* 2021;58:114–22. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINHEMATOL.2021.02.005>.
- [31] Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya J-M. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation 2013.
- [32] Mosaad YM. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *Scand J Immunol* 2015;82:283–306. <https://doi.org/10.1111/SJI.12329>.
- [33] Ankylosing spondylitis: MedlinePlus Genetics n.d. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/ankylosing-spondylitis/#references> (accessed November 16, 2024).
- [34] Paladini F, Fiorillo MT, Tedeschi V, Cauli A, Mathieu A, Sorrentino R. Ankylosing spondylitis: A trade off of HLA-B27, ERAP, and pathogen interconnections? Focus on Sardinia. *Front Immunol* 2019;10:435127. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00035/BIBTEX>.
- [35] Sticht J, Álvaro-Benito M, Konigorski S. Type 1 Diabetes and the HLA Region: Genetic Association Besides Classical HLA Class II Genes. *Front Genet* 2021;12:683946. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.683946/BIBTEX>.
- [36] Nguyen C, Varney MD, Harrison LC, Morahan G. Definition of High-Risk Type 1 Diabetes HLA-DR and HLA-DQ Types Using Only Three Single Nucleotide Polymorphisms. *Diabetes* 2013;62:2135–40. <https://doi.org/10.2337/DB12-1398>.
- [37] Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2011;11:533. <https://doi.org/10.1007/S11892-011-0223-X>.
- [38] Geo JA, Ameen R, Al Shemmari S, Thomas J. Advancements in HLA Typing Techniques and Their Impact on Transplantation Medicine. *Medical Principles and Practice* 2024;33:215–31. <https://doi.org/10.1159/000538176>.
- [39] Mahdil B mutar. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clin Transl Med* 2013;2:6. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-6>.
- [40] Zachary AA, Leffell MS. HLA mismatching strategies for solid organ transplantation - a balancing act. *Front Immunol* 2016;7:221588. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00575/BIBTEX>.

- [41] Montague AM, Pathak S. Chronic Lymphocytic Leukemia With Variant Genetics. *StatPearls* 2023.
- [42] Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018;131:2307–19. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-11-764332>.
- [43] Bakhshi TJ, Georgel PT. Genetic and epigenetic determinants of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/S41408-020-00389-W>.
- [44] Jamil A, Mukkamalla SKR. Lymphoma. *Essential Paediatric Surgery: A Practical Guide* 2023:344–7. <https://doi.org/10.1201/9781003182290-64>.
- [45] Sandell RF, Boddicker RL, Feldman AL. Genetic Landscape and Classification of Peripheral T Cell Lymphomas. *Curr Oncol Rep* 2017;19:28. <https://doi.org/10.1007/S11912-017-0582-9>.
- [46] Tizu M, Calenic B, Hârza M, Cristea BM, Maruntelu I, Caragea AM, et al. HLA Gene Polymorphisms in Romanian Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Genet Res (Camb)* 2024;2024:8852876. <https://doi.org/10.1155/2024/8852876>.
- [47] Măruntelu I, Cristea BM, Omer S, Preda CM, Constantinescu I. Relevance of HLA gene polymorphisms in Romanian patients with chronic renal insufficiency undergoing renal transplantation. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e24075. <https://doi.org/10.1002/JCLA.24075>.
- [48] Maruntelu I, Preda CM, Sandra I, Istratescu D, Chifulescu AE, Manuc M, et al. HLA Genotyping in Romanian Adult Patients with Celiac Disease, their First-degree Relatives and Healthy Persons. *J Gastrointest Liver Dis* 2022;31:191–7. <https://doi.org/10.15403/JGLD-4187>.
- [49] Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2013;210:2569–82. <https://doi.org/10.1084/JEM.20131241>.
- [50] Mueller LP, Machulla HKG. Increased frequency of homozygosity for HLA class II loci in female patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1013–9. <https://doi.org/10.1080/10428190290021588>.
- [51] Le WB, Shi JS, Zhang T, Liu L, Qin HZ, Liang S, et al. HLA-DRB1*15:01 and HLA-DRB3*02:02 in PLA2R-related membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017;28:1642–50. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016060644>.
- [52] Cuttner J, Skerrett D, Rosina O, Troy KM, Wallenstein S, Spivack M. Increased incidence of HLA antigen B35 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1994;18:565–7. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0145-2126(94)90037-X).
- [53] María GÁ, Miguel A, Miriam LP, Noemí P, Alicia A, Ana B, et al. HLA specificities are associated with prognosis in IGHV-mutated CLL-like high-count monoclonal B cell lymphocytosis. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0172978>.
- [54] Hojjat-Farsangi M, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Frequency analysis of HLA class I alleles in Iranian patients with progressive and non-progressive chronic lymphocytic leukemia. *Hum Immunol* 2014;75:170–5. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2013.11.003>.

- [55] Di Bernardo MC, Broderick P, Harris S, Dyer MJS, Matutes E, Dearden C, et al. Risk of developing chronic lymphocytic leukemia is influenced by HLA-A class I variation. *Leukemia* 2013;27:255. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.173>.
- [56] Association of chronic lymphocytic leukemia with specific alleles of the HLA-DR4:DR53:DQ8 haplotype in German patients - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11291046/> (accessed August 10, 2024).
- [57] Abdul-Rahman MT, Al-Ammar NS, Kreyenberg H. HLA-DQA1 and -DQB1 Alleles as Risk Factors for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iranian Journal of War and Public Health* 2022;14:185–95. <https://doi.org/10.29252/IJWPH.14.2.189>.
- [58] Zhao LP, Alshiekh S, Zhao M, Carlsson A, Larsson HE, Forsander G, et al. Next-Generation Sequencing Reveals That HLA-DRB3, -DRB4, and -DRB5 May Be Associated With Islet Autoantibodies and Risk for Childhood Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2016;65:710–8. <https://doi.org/10.2337/DB15-1115>.
- [59] Wang W, Ollila HM, Whittemore AS, Demehri S, Ioannidis NM, Jorgenson E, et al. Genetic variants in the HLA class II region associated with risk of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67:1123–33. <https://doi.org/10.1007/S00262-018-2168-2>.
- [60] Schwarm C, Gola D, Holtsche MM, Dieterich A, Bhandari A, Freitag M, et al. Identification of two novel bullous pemphigoid- associated alleles, HLA-DQA1*05:05 and -DRB1*07:01, in Germans. *Orphanet J Rare Dis* 2021;16. <https://doi.org/10.1186/S13023-021-01863-9>.
- [61] Nowak JK, Glapa-Nowak A, Banaszkiwicz A, Iwańczak B, Kwiecień J, Szaflarska-Popławska A, et al. Hla-dqa1*05 associates with extensive ulcerative colitis at diagnosis: An observational study in children. *Genes (Basel)* 2021;12. <https://doi.org/10.3390/GENES12121934>.
- [62] Aureli A, Canossi A, Del Beato T, Buonomo O, Rossi P, Roselli M, et al. Breast Cancer Is Associated with Increased HLA-DRB1*11:01 and HLA-DRB1*10:01 Allele Frequency in a Population of Patients from Central Italy. *Immunol Invest* 2020;49:489–97. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1737539>.
- [63] Arons E, Adams S, Venzon DJ, Pastan I, Kreitman RJ. Class II human leucocyte antigen DRB1*11 in hairy cell leukaemia patients with and without haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol* 2014;166:729–38. <https://doi.org/10.1111/BJH.12956>.
- [64] Rossman MD, Thompson B, Frederick M, Maliarik M, Iannuzzi MC, Rybicki BA, et al. HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet* 2003;73:720–35. <https://doi.org/10.1086/378097>.
- [65] Rezaieyazdi Z, Kochakzadeh M, Hatef MR, Esmaily H, Malek A, Valizadeh N, et al. Protective role of HLA-DRB1*11 against juvenile idiopathic arthritis living in North Eastern Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21:564–8. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.25022.6215>.
- [66] Tizu M, Calenic B, Constantinescu AE, Bratei AA, Stoia RA, Popa MCG, et al. Cluster of Differentiation Markers and Human Leukocyte Antigen Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: Correlations and Clinical Relevance. *Curr Issues Mol Biol* 2024;46:10008–25. <https://doi.org/10.3390/CIMB46090598>.

- [67] Lanza F, Maffini E, Rondoni M, Massari E, Faini AC, Malavasi F. CD22 Expression in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biological Significance and Implications for Inotuzumab Therapy in Adults. *Cancers (Basel)* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12020303>.
- [68] Robak T, Krawczyńska A, Cebula-Obrzut B, Urbaniak M, Iskierka-Jażdżewska E, Robak P. Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia—The Current Status. *Cancers* 2023, Vol 15, Page 4427 2023;15:4427. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15184427>.
- [69] Kimby E, Mellstedt H, Björkholm M, Holm G. Clonal cell surface structures related to differentiation, activation and homing in B-cell chronic lymphocytic leukemia and monoclonal lymphocytosis of undetermined significance. *Eur J Haematol* 1989;43:452–9. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.1989.TB00335.X>.
- [70] Solanki H, Mishra V, Tiwari A, Kakkar N, Vashisht N, Raina V, et al. Human leukocyte antigen associations with acute leukemia: An indian perspective. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 2020;41:850–8. https://doi.org/10.4103/IJMPO.IJMPO_195_20.
- [71] Olson TS, Frost BF, Duke JL, Dribus M, Xie HM, Prudowsky ZD, et al. Pathogenicity and impact of HLA class I alleles in aplastic anemia patients of different ethnicities. *JCI Insight* 2022;7. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.163040>.
- [72] Malcolm Taylor G, Dearden S, Ravetto P, Ayres M, Watson P, Hussain A, et al. Genetic susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia is associated with polymorphic peptide-binding pocket profiles in HLA-DPB1*0201. *Hum Mol Genet* 2002;11:1585–97. <https://doi.org/10.1093/HMG/11.14.1585>.
- [73] Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PCL. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 2001;166:1308–13. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.2.1308>.
- [74] Rizzo D, Lotay A, Gachard N, Marfak I, Faucher JL, Trimoreau F, et al. Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival. *Am J Hematol* 2013;88:747–53. <https://doi.org/10.1002/AJH.23494>.
- [75] Usefulness of CD45 density in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15985726/> (accessed August 27, 2024).
- [76] Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* 2012;3. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00302>.
- [77] Maeshima AM, Taniguchi H, Fujino T, Saito Y, Ito Y, Hatta S, et al. Immunohistochemical CD20-negative change in B-cell non-Hodgkin lymphomas after rituximab-containing therapy. *Ann Hematol* 2020;99:2141–8. <https://doi.org/10.1007/S00277-019-03853-1>.
- [78] Katchi T, Liu D. Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas. *Biomark Res* 2017;5. <https://doi.org/10.1186/S40364-017-0088-5>.
- [79] Dinner S, Liedtke M. Antibody-based therapies in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2018;2018:9–15. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2018.1.9>.
- [80] Zhang X, Aguilera N. New immunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1666–72. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2014-0058-RA>.

- [81] Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R, Kupper TS. CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. *Blood* 2006;107:1421–6. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-05-2112>.
- [82] Gillissen MA, De Jong G, Kedde M, Yasuda E, Levie SE, Moiset G, et al. Patient-derived antibody recognizes a unique CD43 epitope expressed on all AML and has antileukemia activity in mice. *Blood Adv* 2017;1:1551. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2017008342>.
- [83] Hsieh YC, Lin CL, Tsao CJ, Hsieh PP, Tzeng CC, Chuang SS. Aberrant expression of CD19 and CD43 in a patient with therapy-related acute myeloid leukemia and a history of mantle cell lymphoma. *Kaohsiung J Med Sci* 2009;25:389–94. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70532-7](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70532-7).
- [84] Kurtin PJ, Hobday KS, Ziesmer S, Caron BL. Demonstration of distinct antigenic profiles of small B-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1999;112:319–29. <https://doi.org/10.1093/AJCP/112.3.319>.
- [85] Falay M, Öztürk BA, Güneş K, Kalpakçı Y, Dağdaş S, Ceran F, et al. The Role of CD200 and CD43 Expression in Differential Diagnosis between Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma. *Turkish Journal of Hematology* 2018;35:94. <https://doi.org/10.4274/TJH.2017.0085>.
- [86] Naeim F, Rao PN, Song SX, Phan RT. Principles of Immunophenotyping. *Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches, Second Edition* 2018:29–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809843-1.00002-4>.
- [87] Dorfman DM, Shahsafaei A, Alonso MA. Utility of CD200 immunostaining in the diagnosis of primary mediastinal large B cell lymphoma: comparison with MAL, CD23, and other markers. *Mod Pathol* 2012;25:1637–43. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2012.129>.
- [88] Tkachenko A, Kupcova K, Havranek O. B-Cell Receptor Signaling and Beyond: The Role of Ig α (CD79a)/Ig β (CD79b) in Normal and Malignant B Cells. *Int J Mol Sci* 2024;25. <https://doi.org/10.3390/IJMS25010010>.
- [89] Poeta G Del, Principe MI Del, Zucchetto A, Buccisano F, Simotti C, Maurillo L, et al. High CD79b Expression Predicts a Poor Outcome in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). *Blood* 2008;112:1054–1054. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V112.11.1054.1054>.
- [90] Allan JN, Bhavsar EB, Vaisitti T, Sarno V, Liu Y, Arruga F, et al. CD79b Expression in Richter's Transformation. *Blood* 2019;134:4279–4279. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2019-128305>.
- [91] Falay M, Serdar MA, Dalgali H, Uçar MA, Dagdaş S, Özet G. Which Markers Should the used for Diagnostic Chronic Lymphocytic Leukemia Immunophenotyping Scoring System by Flow Cytometry? *Clin Lab* 2019;65:2049–55. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2019.190316>.
- [92] Afacan-Öztürk HB, Falay M, Albayrak M, Yıldız A, Öztürk Çiğdem P, Maral S, et al. CD81 Expression in the Differential Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lab* 2019;65. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2018.180802>.

- [93] Zhou M, Qiu H, Chen T, Xiao R, Yang J, Cen L, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1*14 is associated with a high incidence of acute lymphocytic leukemia. *Onkologie* 2012;35:268–71. <https://doi.org/10.1159/000338480>.
- [94] Kazemi MH, Momeni-Varposhti Z, Roshandel E, Sankanian G, Hosseini Rouzbahani N, Ghorban K, et al. Association of HLA alleles with hematologic malignancies. *Gene Rep* 2021;25:101346. <https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2021.101346>.
- [95] A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen-DPB alleles in Hodgkin's disease - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7923125/> (accessed August 11, 2024).
- [96] Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1999;94:1840–7. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.6.1840>.
- [97] Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023–9. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.3.1023>.
- [98] Tizu M, Calenic B, Maruntelu I, Caragea AM, Talangescu A, Ursu L, et al. Immunogenetic Background of Chronic Lymphoproliferative Disorders in Romanian Patients-Case Control Study. *Med Sci (Basel)* 2024;12:14. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI12010014/S1>.
- [99] Zhong C, Gragert L, Maiers M, Hill BT, Garcia-Gomez J, Gendzekhadze K, et al. The association between HLA and non-Hodgkin lymphoma subtypes, among a transplant-indicated population. *Leuk Lymphoma* 2019;60:2899–908. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1617858>.
- [100] Jeffery KJM, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol* 2000;165:7278–84. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.165.12.7278>.
- [101] Brazzelli V, Rivetti N, Badulli C, Carugno A, Grasso V, De Silvestri A, et al. Immunogenetic factors in mycosis fungoides: can the HLA system influence the susceptibility and prognosis of the disease? Long-term follow-up study of 46 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1732–7. <https://doi.org/10.1111/JDV.12391>.
- [102] Lin WY, Fordham SE, Sunter N, Elstob C, Rahman T, Willmore E, et al. Genome-wide association study identifies risk loci for progressive chronic lymphocytic leukemia. *Nature Communications* 2021 12:1 2021;12:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20822-9>.
- [103] Wang SS, Abdou AM, Morton LM, Thomas R, Cerhan JR, Gao X, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles in non-Hodgkin lymphoma etiology. *Blood* 2010;115:4820–3. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-01-266775>.
- [104] Benencio P, Fraile Gonzalez SA, Ducasa N, Page K, Berini CA, Biglione MM. HLA-B*35 as a new marker for susceptibility to human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) in patients living in Argentina. *Retrovirology* 2020;17. <https://doi.org/10.1186/S12977-020-00536-Y>.

- [105] Wang X, An G, Wang J, Zhang Y, Li Q, Wei H, et al. The association of HLA-C alleles with multiple myeloma in Chinese patients. *Exp Hematol Oncol* 2018;7:19. <https://doi.org/10.1186/S40164-018-0112-Y>.
- [106] Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994;43:18–27. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0039.1994.TB02291.X>.
- [107] Gavioli R, De Campos-Lima PO, Kurilla MG, Kieff E, Klein G, Masucci MG. Recognition of the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigens EBNA-4 and EBNA-6 by HLA-A11-restricted cytotoxic T lymphocytes: implications for down-regulation of HLA-A11 in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5862. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.13.5862>.
- [108] Choi HB, Roh SY, Choi EJ, Yoon HY, Kim SY, Hong YS, et al. Association of HLA alleles with non-Hodgkin's lymphoma in Korean population. *Int J Hematol* 2008;87:203–9. <https://doi.org/10.1007/S12185-008-0040-4>.
- [109] Galleze A, Raache R, Amroun H, Cherif N, Fadli M, Meçabih F, et al. HLA Polymorphism in Algerian Children With Lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015;37:e458–61. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000419>.
- [110] Ramezani A, Hasanjani Roshan MR, Kalantar E, Eslamifar A, Banifazl M, Taeb J, et al. Association of human leukocyte antigen polymorphism with outcomes of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1716–21. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2008.05482.X>.
- [111] Laaksonen M, Pastinen T, Sjöroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti ML, et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis - A Finnish family study. *J Neuroimmunol* 2002;122:140–5. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00456-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00456-8).
- [112] Van Der Woude D, Lie BA, Lundström E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Protection Against Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis Is Predominantly Associated With HLA-DRB1*1301 A Meta-Analysis of HLA-DRB1 Associations With Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive and Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis in Four European Populations. *Arthritis Rheum* 2010;62:1236–45. <https://doi.org/10.1002/art.27366>.
- [113] Wysocki T, Olesińska M, Paradowska-Gorycka A. Current Understanding of an Emerging Role of HLA-DRB1 Gene in Rheumatoid Arthritis-From Research to Clinical Practice. *Cells* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/CELLS9051127>.
- [114] Farias TDJ, Brugiapaglia S, Croci S, Magistroni P, Curcio C, Zguro K, et al. HLA-DPB1*13:01 associates with enhanced, and KIR2DS4*001 with diminished protection from developing severe COVID-19. *HLA* 2024;103. <https://doi.org/10.1111/TAN.15251>.
- [115] Liu Z, Luo Y, Kirimunda S, Verboom M, Onabajo OO, Gouveia MH, et al. Human leukocyte antigen-DQA1*04:01 and rs2040406 variants are associated with elevated risk of childhood Burkitt lymphoma. *Communications Biology* 2024 7:1 2024;7:1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05701-5>.