

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

**TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducator de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CONSTANTINESCU ILEANA

Student-doctorand:

CARAGEA ANDREEA MIRELA

ANUL 2025

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA", BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ DE LABORATOR**

**FRECVENȚA ALELELOR ȘI HAPLOTIPURILOR HLA ÎN
POPULAȚIA DIN ROMÂNIA
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CONSTANTINESCU ILEANA

Student-doctorand:

CARAGEA ANDREEA MIRELA

ANUL 2025

Cuprins

Introducere.....	1
I. PARTEA GENERALĂ.....	5
1. Complexul major de histocompatibilitate (CMH) și rolul lui în sistemul imun.....	6
1.1 Sistemul imun – mijloace specifice ale apărării imune.....	6
1.2 Imunitatea înăscută și imunitatea dobândită.....	13
1.3 Complexul major de histocompatibilitate (CMH).....	16
1.4 Genele HLA.....	17
1.4.1 Generalități.....	17
1.4.2 Date demografice.....	19
1.4.3 Genele HLA de clasa I.....	22
1.4.3.1 Genele HLA de clasa I nonclasice.....	23
1.4.3.2 Genele HLA de clasa I clasice.....	26
1.4.4 Genele HLA de clasa a II a.....	32
1.4.5 Nomenclatura alelelor HLA.....	39
2. Transplantul de organe solide și celule stem cu implicarea genelor HLA.....	41
2.1 Rolul potrivirii HLA în transplant.....	41
3. HLA și bolile asociate.....	43
3.1 Boala celiacă.....	43
3.2 Spondilita ankilopoietică.....	43
3.3 Diabetul zaharat tip I.....	44
3.4 Diabetul zaharat de tip II.....	45
3.5 Artrita reumatoidă.....	46
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	47
4. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	48
5. Materiale și metode.....	50
5.1 Lotul de studiu.....	50
5.2 Izolarea și determinarea concentrației ADN.....	50
5.2.1 Izolarea ADN din sânge prin tehnica manuală.....	50
5.2.2 Stabilirea calității (purității) și concentrației ADN cu nanofotometrul IMPLN P300.....	52

5.3 Genotiparea HLA prin Secvențiere de Nouă Generație (NGS).....	54
5.3.1 Long-range PCR.....	55
5.3.2 Pregătirea librăriei primare.....	56
5.3.3 Spălarea bilelor după pregătirea primară.....	57
5.3.4 Ligarea adaptorului de index.....	57
5.3.5 Consolidarea produselor legate cu adaptor.....	58
5.3.6 Selectarea mărimii cu ajutorul Pippin Prep.....	59
5.3.7 Amplificarea librăriei după ce s-a făcut selecția de mărime.....	60
5.3.8 Secvențierea pe MiniSeq, Illumina.....	60
5.4 Interpretarea rezultatelor (soft Mia Fora NGS Registry versiunea 2.0).....	63
5.4.1 Software-ul MIA FORA NGS REGISTRY v.2.0.....	65
5.4.2 Strategia de genotipare.....	65
5.4.3 Analiza datelor.....	67
6. Rezultate.....	73
6.1 Frecvențele alelelor HLA analizate.....	73
6.1.1 Frecvența alelelor HLA-A la nivel de rezoluție înaltă.....	73
6.1.2 Frecvența alelelor HLA-B la nivel de rezoluție înaltă.....	80
6.1.3 Frecvența alelelor HLA-C la nivel de rezoluție înaltă.....	86
6.1.4 Frecvența alelelor HLA-DRB1 la nivel de rezoluție înaltă.....	95
6.1.5 Frecvența alelelor HLA-DPB1 și HLA-DPA1 la nivel de rezoluție înaltă.....	103
6.1.6 Frecvența alelelor HLA-DQB1, -DQA1 la nivel de rezoluție înaltă.....	106
6.2 Frecvența haplotipurilor HLA la nivel de rezoluție înaltă.....	118
7. Discuții.....	140
7.1 Frecvența alelelor HLA de clasa I genotipate la nivel de rezoluție înaltă.....	140
7.2 Frecvența alelelor HLA de clasa a II- a genotipate la nivel de rezoluție înaltă.....	143

7.3 Frecvența haplotipurilor HLA.....	149
8. Concluzii	155
Bibliografie.....	159
Anexe.....	167

Introducere

Antigenul leucocitar uman (HLA) reprezintă complexul major de histocompatibilitate (CMH) la om, localizat pe brațul scurt al cromozomului 6 (regiunea 6p21), și cuprinde peste 200 de gene, dintre care multe extrem de polimorfe.

Sistemul HLA este cel mai polimorf sistem genetic uman, având mii de variante alelice identificate (de exemplu, peste 5000 de alele la locusul HLA-B). Genele HLA se împart în două clase principale cu funcții distincte: moleculele de clasa I (codificate de gene precum HLA-A, -B, -C) se exprimă pe suprafața tuturor celulelor nucleate și prezintă peptide endogene self sau virale către limfocitele T citotoxice CD8⁺; moleculele de clasa II (HLA-DR, -DQ, -DP, exprimate pe celule prezentatoare de antigen specializate) afișează peptide exogene către limfocitele T helper CD4⁺.

Rolul fundamental al acestor molecule este de a permite sistemului imun să discrimineze self de non-self, declanșând răspunsuri imune împotriva agenților patogeni sau celulelor străine. Din cauza variabilității lor ridicate, genele HLA sunt implicate direct în compatibilitatea pentru transplant: diferențele HLA între un donator și un primitor pot duce la recunoașterea alogrefei ca fiind „non-self” și la inițierea respingerii imune a transplantului.

De aceea, testarea pre-transplant a compatibilității HLA este esențială în transplantul de organe solide și de celule stem hematopoietice (TCSH) – nepotrivirea HLA putând cauza fenomene grave precum boala grefă-contra-gazdă în transplantul medular sau rejetul acut în transplantul de organe. În plus, anumite alelomorfi HLA predispun la boli autoimune: de pildă, peste 90% dintre pacienții europeni cu spondilită anchilozantă posedă alela HLA-B*27, evidențiind asocierea strânsă dintre HLA și susceptibilitatea genetică la această boală. Mecanisme similare leagă HLA de alte patologii imune (diabet de tip 1, artrită reumatoidă, boala celiacă ș.a.), HLA reprezentând astfel un factor cheie atât în imunologia transplantului, cât și în imunopatologia bolilor autoimune.

Un aspect important al geneticii HLA îl constituie moștenirea haplotipurilor HLA. Genele HLA de pe același cromozom 6 sunt transmise în bloc ereditar, formând haplotipuri specifice fiecărui părinte. Fiecare individ posedă două seturi haplotipale (matern și patern), iar frații au o probabilitate de 25% să primească același haplotip HLA de la ambii părinți. În consecință, doar aproximativ un sfert dintre frați sunt HLA-identici – aspect crucial în alegerea unui donator familial pentru transplant.

Deoarece ~70% dintre pacienții care necesită un transplant nu au un donator HLA-identic înrudit (frate/soră), a devenit necesară căutarea de donatori neînrușiți compatibili prin intermediul registrelor de donatori voluntari. În România, Registrul Național al Donatorilor Voluntari de Celule Stem Hematopoietice (RNDVCSH) s-a dezvoltat în ultimele două decenii în sprijinul pacienților fără donator familial; până la sfârșitul anului 2019 erau înscrși circa 66.000 de donatori voluntari, dintre care însă doar o parte au fost testați HLA la rezoluție înaltă. Numărul de transplanturi de celule stem hematopoietice de la donatori neînrușiți a crescut exponențial (o creștere cu >400% în decursul anilor 2004–2014 la nivel global), iar în anul 2020 s-au efectuat 252 de transplanturi de acest tip în România.

Diversitatea alelelor HLA în populație ridică provocări majore în identificarea rapidă a unui donator compatibil: cu cât o populație este mai heterogenă din punct de vedere HLA, cu atât șansele de potrivire perfectă scad, impunând baze de date cât mai extinse și cunoașterea profilului imunogenetic al fiecărei populații.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Complexul major de histocompatibilitate (CMH) și rolul lui în sistemul imun

Genele complexului major de histocompatibilitate la oameni, cunoscute și sub numele de genele sistemului HLA, au cel mai mare grad de polimorfism din genomul uman [1-7].

Complexul major de histocompatibilitate (CMH) este un grup de gene localizate pe cromozomul 6 (Fig.1.3.1), în locația citogenetică 6p21.3 [7, 10-15]. Acest termen de complex major de histocompatibilitate se referă la prima funcție biologică a acestui sistem extrem de polimorf, și anume că moleculele codate de acest complex sunt implicate în transplantul de organe și celule [7, 11, 12, 16, 17, 18].

Genele HLA codifică molecule care au rol de receptori pentru peptidele proprii organismului (self) sau peptidele străine organismului (nonself), inițierea răspunsului imun se face prin prezentarea lor către limfocitele T citotoxice sau către limfocitele T helper [7, 11, 19-24].

CMH conține un număr foarte mare de gene implicate în diferite etape ale răspunsului imun, pe lângă genele HLA [24,25].

CMH este împărțit în trei clase și anume:

- Genele de clasă I
- Genele de clasă II
- Genele de clasă III

2. Transplantul de organe solide și celule stem cu implicarea genelor HLA

Determinarea variantelor și haplotipurilor HLA este denumită tipare HLA sau tipare tisulară și este realizată în laboratoarele clinice pentru a ajuta la determinarea histocompatibilității dintre donatorul și primitorul de organe solide sau celule stem [26]. Tiparea HLA este de asemenea utilizată pentru studii antropologice, pentru a se putea face deducții privind relațiile și istoricul populației [20-26].

Transplantul reprezintă ”standardul de aur” în tratamentul a numeroase afecțiuni aflate, evolutiv, în stadiu terminal [19,26].

Avem două tipuri de transplant și anume transplantul de celule și transplantul de organe solide. Transplantul de celule stem hematopoietice permite înlocuirea celulelor hematopoietice anormale cu unele normale [19,26]. Indicațiile pentru realizarea transplantului de celule stem cuprind: sindroamele mielodisplazice, aplazii medulare, talasemii, hemoglobinopatii, boli maligne hematologice (leucemii acute sau cronice, limfoame) și tumori solide [18,19].

Celulele stem pot să provină de la donatori înrudiți identici HLA sau haploidentici sau de la donatori neînrușiți HLA identici [26].

3. HLA și bolile asociate

Unele boli autoimune sunt asociate cu genele HLA, însă mecanismul nu a fost pe deplin elucidat până în prezent. Studiile asupra populației au arătat că predispoziția genetică a bolilor autoimune umane este legată de genele HLA, în special cele de clasa a II-a [1,7, 11, 12]. Din cauza polimorfismului genelor HLA și a heterogenității bolilor autoimune, mecanismele care să explice această asociere nu sunt încă pe deplin cunoscute.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Ipoteza de lucru și obiective generale

Scopul tezei de doctorat:

Având în vedere importanța cunoașterii distribuției alelelor și haplotipurilor HLA la nivel populațional (atât pentru optimizarea procedurilor clinice de transplant, cât și pentru studii antropologice și de asociere genetică), numeroase cercetări internaționale au cartografiat frecvențele HLA în diverse grupuri etnice de pe glob.

Aceste studii au evidențiat diferențe marcante între populații, permițând relaționarea grupurilor pe criterii filogenetice și istorice (de exemplu, identificarea unor haplotipuri ancestrale caracteristice Europei de Vest, respectiv a altora predominante în zona Mediteraneană sau Asia de Sud-Est). În România, puține lucrări anterioare au investigat distribuția HLA, iar acelea au folosit metode cu rezoluție mai scăzută (tipizare serologică sau genotipare parțială) și nu au oferit o imagine completă asupra tuturor locusurilor HLA.

Profilul imunogenetic al populației române la nivel de rezoluție înaltă nu fusese până acum caracterizat exhaustiv, lăsând necunoscute frecvența alelelor rare sau configurația haplotipurilor în acest grup etnic. În acest context, prezenta teză de doctorat a avut ca scop general realizarea unei cartografieri detaliate, de ultimă generație, a frecvenței alelelor și haplotipurilor HLA în populația din România, folosind cele mai moderne tehnici de tipizare genomică.

Pentru atingerea acestui scop, au fost formulate mai multe obiective specifice:

- (1) determinarea distribuției alelelor HLA la rezoluție înaltă pentru principalii loci de clasă I (HLA-A, -B, -C) și clasă II (HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1) în rândul populației autohtone și compararea acestor distribuții cu cele raportate la alte popoare, în vederea evidențierii relațiilor filogenetice ale românilor cu alte grupuri etnice;
- (2) identificarea alelelor și haplotipurilor rare prezente în populația investigată, aspect important pentru a estima probabilitatea de a găsi un donator compatibil pentru pacienții români (raritatea unor alele reduce șansa de compatibilitate și impune extinderea registrelor);
- (3) furnizarea unui set de date de referință privind frecvențele HLA, utile și pentru explorarea asocierii anumitor constelații HLA cu patologii autoimune specifice populației (de exemplu, predispoziția genetică la boli precum diabetul de tip 1 sau boala celiacă, încă insuficient studiate în România).

5. Materiale și metode:

Pentru îndeplinirea obiectivelor, s-a desfășurat un studiu transversal de tip observațional pe un eșantion de donatori voluntari de celule stem din cadrul RNDVCSH.

Lotul de studiu a cuprins un număr de aproximativ 420 de indivizi adulți sănătoși, recrutați ca potențiali donatori neînruțiți pentru transplant și considerați reprezentativi pentru populația generală din România.

Probele biologice (sânge periferic) au fost recoltate în vacutainere cu EDTA și transportate la Institutul Clinic Fundeni (Laboratorul de Imunogenetică și Virologie) pentru procesare, în intervalul 2020–2021. Din fiecare probă, s-a extras ADN genomic folosind kitul comercial QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Germania) conform protocolului standard bazat pe coloane cu silicați. Metoda de extracție folosită permite obținerea rapidă a unui ADN de înaltă puritate și integritate, adecvat pentru amplificări PCR și secvențiere, fără a necesita procedee suplimentare de izolare a leucocitelor. Concentrația și calitatea ADN-ului extras au fost evaluate spectrofotometric, asigurându-se că toate probele corespund cerințelor pentru analiza ulterioară.

Ulterior, probele de ADN au fost supuse genotipării HLA prin tehnologia de secvențiere de nouă generație (Next Generation Sequencing – NGS). S-a utilizat kitul Immucor MiaFora NGS Flex și platforma de secvențiere Illumina MiniSeq, care permit tipizarea simultană, la rezoluție înaltă, a multiplelor gene HLA. S-au amplificat regiuni genomice extinse ce conțin genele HLA de interes (inclusiv exoni critici pentru determinarea alelelor) folosind protocol de long-range PCR, urmate de fragmentarea și pregătirea bibliotecilor de secvențiere indexate. Prin NGS, fiecare mostră a fost secvențiată masiv-paralel, generându-se milioane de fragmente de ADN care au acoperit locusurile țintă.

Această abordare oferă avantajul major al rezolvării ambiguităților alelice și al identificării exacte a variantelor rare, datorită capacității ridicate de secvențiere și a citirilor pereche care determină faza alelică.

Față de metodele tradiționale (precum secvențierea Sanger sau PCR-SSP), introducerea NGS în tipizarea HLA a condus la creșterea substanțială a numărului de alele identificabile și la reducerea timpului necesar obținerii unui rezultat complet. În studiul de față, NGS a permis obținerea alelelor HLA la nivel de rezoluție de 4–6 digits (echivalentul specificității alelice de înaltă rezoluție), acoperind practic toate variantele cu relevanță clinică.

Datele brute de secvențiere au fost analizate cu ajutorul software-ului dedicat MiaFora NGS Analysis (vers. 2.0), care aliniază secvențele la genomul de referință și atribuie alelele corespunzătoare fiecărui locus tipizat, pe baza bazelor de date internaționale HLA. Au fost astfel determinate genotipurile fiecărui individ pentru fiecare genă HLA investigată. Ulterior, s-au calculat frecvențele alelice (numărul de apariții ale fiecărei alele, raportat la totalul alelelor pentru locusul respectiv) și frecvențele haplotipurilor (incidența combinată a anumitor alele pe același cromozom, raportat la totalul haplotipurilor posibil de observat).

Pentru analiza comparativă, rezultatele obținute în cohorta românească au fost confruntate cu date publicate din alte populații – atât cu populații europene geografic apropiate, cât și cu medii continentale mai largi – folosind teste statistice de diferență a proporțiilor și metode de analiză a distanțelor genetice

între populații (cum ar fi calculul indicelui de divergență genetică pe baza frecvențelor alelice). Validitatea datelor a fost susținută de faptul că distribuțiile observate nu diferă semnificativ de cele raportate anterior în literatură pentru populații europene comparabile ca origine etnică.

6. Rezultate

Frecvența alelelor HLA (clasa I):

În total, în cele ~420 de genomuri analizate s-au identificat 109 alele HLA distincte la nivel înalt de rezoluție, repartizate astfel: 31 de alele diferite la locusul HLA-A, 49 la locusul HLA-B și 29 la locusul HLA-C.

Aceasta reflectă diversitatea ridicată a sistemului HLA chiar și într-un eșantion relativ limitat ca mărime. Dintre alelele de clasa I genotipate, cele de la locusul HLA-A au prezentat următoarea ierarhie a frecvențelor: HLA-A*02:01:01 – cea mai comună alelă, cu o frecvență relativă de aproximativ 26,1% în rândul indivizilor testați, urmată de HLA-A*01:01:01 (~12,5%), HLA-A*24:02:01 (~11,7%) și HLA-A*03:01:01 (~9,7%). Alte alele HLA-A cu prevalență notabilă au fost A*11:01:01 și A*32:01:01, fiecare prezente cu ~8,6%.

Aceste prime 6 alele HLA-A ca frecvență însumează ~80% din toate alelele A identificate, indicând existența unui nucleu de alele comune în populație. În același timp, s-au detectat și alele HLA-A relativ rare: aproximativ 15 dintre alelele HLA-A (din totalul de 31) au avut frecvențe individuale sub 1%, însumând însă doar ~5,7% din alelele observate. Această distribuție evidențiază un polimorfism bogat, cu câteva alele foarte frecvente și multe alele minoritare prezente la proporții mici.

La locusul HLA-B, cea mai frecventă alelă în populația românească studiată a fost HLA-B*18:01:01, reprezentând ~11,3% din alelele de la acest locus. Următoarele alele ca frecvență au fost HLA-B*51:01:01 (~10,8%) și HLA-B*08:01:01 (~7,8%). Se constată așadar că niciun alelomorf HLA-B nu depășește ~12% din total – spre deosebire de unele populații insulare sau restrânse unde alele HLA-B precum *07 sau *51 pot atinge frecvențe mult mai mari.

Distribuția alelelor HLA-B în România pare aliniată cu tendințele sud-est europene (de exemplu, alela B18 este comună în bazinul balcanic), deși alela B35 (raportată ca frecventă în studii mai vechi) nu se regăsește între primele trei ca frecvență în datele de secvențiere de înaltă rezoluție. În schimb, se remarcă poziția alelei B*08, parte a haplotipului ancestral european 8.1 (A1-B8-DR3), care în populația românească are o frecvență moderată, sugerând o prezență neomogenă (posibil datorită aportului genetic din vestul Europei prin migrații istorice). La locusul HLA-C, cele mai comune trei alele identificate au fost HLA-C*07:01:01 (aproximativ 17,4%), HLA-C*04:01:01 (~13,5%) și HLA-C*12:03:01 (~10,7%).

Alela C*07, cumulând atât subtipul *07:01 cât și *07:02, are în total o prezență și mai mare dacă se consideră grupul alelic în ansamblu – fapt întâlnit și în alte populații europene, unde alelele din familia C07 sunt adesea dominante. De asemenea, alela C*04 (incluzând subtipul comun C*04:01) se regăsește cu frecvențe notabile în Europa și apare printre primele și în România (~13-14%). A treia alelă ca

frecvență, C*12:03, este mai specifică Europei de Est și Asiei Vestice, ceea ce ar putea sugera influențe genetice orientale în fondul genetic autohton.

Ca și la celelalte locusuri, pe lângă aceste alele principale, s-au detectat numeroase alele HLA-C cu frecvențe individuale scăzute (sub 5%), ceea ce confirmă încă o dată gradul înalt de polimorfism al sistemului HLA în România.

Comparativ cu alte populații, se poate afirma că profilul alelic HLA de clasă I al României urmează modelul general european, în care HLA-A02:01 este, de regulă, alela cea mai frecventă (atât în Europa Occidentală, cât și Central-Estică). În aproape toate țările europene, A02 are cea mai mare pondere – fapt confirmat și de datele de față. De asemenea, alelele A01, B07, B51, C*07 apar constant între variantele dominante în diverse populații europene, regăsindu-se și în setul românesc (B*07 și B*51 sunt foarte răspândite în sudul Europei, iar prezența lor semnificativă în România era de așteptat; similar, C*07 este larg răspândită în toată Europa). Totuși, fiecare populație prezintă nuanțe specifice: de exemplu, în România s-a evidențiat alela B*18 ca primă ca frecvență, pe când în alte populații apropiate (Bulgaria, Serbia) B*35 sau B*51 ocupă uneori primul loc. Aceste diferențe subliniază importanța studiilor locale de frecvență HLA.

Frecvența alelelor HLA (clasa II):

Pentru genele de clasă II, analiza s-a concentrat în principal pe locusurile HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1 (care codifică heterodimerul HLA-DQ) și pe locusurile HLA-DPB1, -DPA1 (care codifică heterodimerul HLA-DP).

Distribuția alelică la locusul HLA-DRB1 (prezent pe toate celulele prezentatoare de antigen) arată că cele mai frecvente grupuri alelice în populația românească sunt HLA-DRB1*11 și HLA-DRB1*13, fiecare reprezentând aproximativ 10-11% din total. Acestea sunt urmate în prevalență de alelele din grupurile DRB1*04 (~9,5%), DRB1*07 (~9,3%) și DRB1*01 (~8,4%).

Împreună, aceste cinci specificități DRB1 însumează peste 45% din alelele de clasă II detectate, restul specificităților având frecvențe mai mici (de exemplu, alelele din grupurile DRB115 – care include și subtipul DRB1*16, DRB1*14, DRB1*03, DRB1*08 etc. au fiecare sub 6% din total). Profilul HLA-DRB1 în România se dovedește similar cu mediile europene: la nivel continental, cele mai comune alele DRB1 raportate sunt, în ordine descrescătoare, DRB1*01:01, DRB1*11:01, DRB1*13:01, DRB1*04:01 și DRB1*15/16:01, ceea ce corespunde îndeaproape cu setul de alele de vârf găsit în studiul de față (cu mențiunea că în populația românească alela DRB1*16 – echivalentă cu o parte din DRB1*15 în vechea nomenclatură – are o frecvență relativ mai redusă față de DRB1*11 sau *13). Rezultatele obținute confirmă statisticile publicate anterior pentru HLA-DRB1 în populații europene comparabile, diferențele fiind minore și probabil explicabile prin dimensiunea eșantionului sau particularități regionale.

La locusul HLA-DQB1, care codifică lanțul β al moleculei HLA-DQ, distribuția alelelor a fost relativ uniformă, fără ca o singură alelă să domine clar. Niciuna dintre alelele HLA-DQB1 nu depășește,

individual, ~15% frecvență în cohorta studiată. Putem deduce, din asocierea cu alelele DQA1 corelative, că cele mai răspândite specificități DQ în populația românească sunt cele corespunzătoare heterodimerilor HLA-DQ2 și HLA-DQ7.

De exemplu, heterodimerul DQ2.5 (format din alelele DQA1*05:01 și DQB1*02:01) este bine reprezentat, acesta fiind și complexul HLA asociat cu boala celiacă în peste 90% din cazuri. Prezența alelelor DQB1*02:01 și DQA1*05 în populația generală din România (chiar dacă la frecvențe moderate) explică de ce o proporție semnificativă a indivizilor poate fi predispusă genetic la enteropatia glutenică, boală autoimună a cărei incidență depinde de distribuția acestor alele în populație.

De asemenea, heterodimerul HLA-DQ8 (DQA1*03 împreună cu DQB1*03:02) – asociat cu un risc mai redus pentru boala celiacă și cu predispoziție pentru diabetul de tip 1 – este prezent în populație, deși alelele sale componente au frecvențe sub 5% fiecare.

În ansamblu, se remarcă diversitatea alelică considerabilă și la nivelul locusului DQB1, sugerând că populația nu are un profil DQ simplificat (cum se întâmplă în grupurile înrudite strâns sau izolate, unde adesea 1-2 alele DQB1 pot fi predominante). În ceea ce privește locusul HLA-DQA1 (lanțul α al moleculei DQ), distribuția în România indică o singură alelă relativ comună, anume HLA-DQA1*05:05:01:01, care a atins ~11,4% din total – fiind de altfel și singura alelă DQA1 cu o frecvență peste pragul de 10%.

Următoarele alele DQA1 au avut frecvențe sub acest prag (a doua ca frecvență ~9,4%, a treia ~6-7%, etc.), ceea ce arată că variabilitatea este distribuită între mai multe alele de importanță secundară. Alela DQA1*05:05 (subtip al grupului DQA1*05) este notabilă deoarece se asociază adesea în haplotip cu DQB1*03:01 (formând împreună moleculele DQ7) și cu DRB1*11:04 – combinație caracteristică Europei de Sud-Est.

De altfel, această constelație (DR11-DQ7) explică frecvențele apropiate ale alelelor DRB1*11, DQA1*05:05 și DQB1*03:01 observate. Pentru complexul HLA-DP, format din lanțul α (DPA1) și β (DPB1), rezultatele relevă o situație interesantă: la locusul HLA-DPA1, o singură alelă domină la nivel populațional, și anume HLA-DPA1*01:03:01, care reprezintă aproximativ 80% din alelele DPA1 identificate. Această predominanță covârșitoare a alelei DPA1*01:03 este un fenomen cunoscut și în alte populații – heterodimerul DP având adesea un lanț alfa relativ monomorf, în contrast cu variabilitatea mai mare a lanțului beta.

Astfel, variabilitatea HLA-DP se manifestă în special la nivelul locusului HLA-DPB1, unde s-au detectat mai multe alele cu frecvențe notabile.

Cele mai frecvente trei alele DPB1 în eșantionul românesc au fost: HLA-DPB1*04:01:01 (aprox. 33,3%), HLA-DPB1*02:01:02 (~20,7%) și HLA-DPB1*04:02:01 (~15,7%).

Împreună, aceste trei alele totalizează în jur de 70% din alelele DPB1 prezente, indicând un polimorfism moderat la acest locus – câteva alele comune și restul (numeroase) de frecvență scăzută.

Niciuna dintre alelele HLA-DPB1 nu atinge, individual, o frecvență comparabilă cu a alelei dominante DPA1*01:03, însă distribuția lor combinată este suficient de echilibrată încât să confere heterogenitate

haplotipurilor DP. Acest aspect are relevanță practică: în timp ce majoritatea indivizilor vor împărtăși aceeași alelă DPA1 (ceea ce simplifică potrivirea pe lanțul alfa DP), diferențele pe lanțul beta DPB1 pot genera incompatibilități – de aceea cunoașterea repertoriului alelic DPB1 în populație este importantă la căutarea unui donator perfect compatibil DP.

Frecvența haplotipurilor HLA:

Pe lângă distribuția fiecărei alele în parte, teza a investigat și frecvența haplotipurilor HLA – combinațiile specifice de alele moștenite împreună pe același cromozom. Analiza haplotipurilor oferă o perspectivă integrativă, relevând cât de des apar în populație anumite asocieri alelice comune (de exemplu, HLA-A cu HLA-B cu HLA-DRB1).

Rezultatul principal în cazul haplotipurilor extinse (incluzând alele de la HLA-A, -B, -C, -DRB1) este absența oricărui haplotip “modal” pronunțat în populația românească, distribuția frecvențelor fiind extrem de dispersată. Niciun haplotip HLA complet nu depășește câteva procente frecvență – pragul maxim observat fiind sub ~5% pentru cel mai comun haplotip. Aproximativ 98-99% dintre haplotipurile HLA identificate au avut frecvențe sub 1%, ceea ce indică o diversitate haplotipală excepțional de mare. Cu alte cuvinte, aproape fiecare individ din populație are o combinație haplotipică diferită, șansele ca doi indivizi neînruți să împărtășească un haplotip HLA identic fiind foarte mici (exceptând haplotipurile comune pan-europene cu frecvență de câteva procente). Totuși, au fost evidențiate și în România anumite haplotipuri relativ frecvente (fără a fi dominante) care se înscriu în tabloul cunoscut al Europei.

Un exemplu notabil este așa-numitul haplotip “balcanic”: HLA-A*02:01 – B*18:01 – C*07:01/02 – DRB1*11:04 – DQB1*03:01, care a fost întâlnit la o proporție modestă de indivizi, dar se detașează totuși ca unul dintre cele mai des observate (în jur de 3-4% din haplotipurile cromozomiale). Acest haplotip este cunoscut pentru frecvența lui ridicată în populațiile din sud-estul Europei (Peninsula Balcanică) și reflectă probabil un fond genetic comun regional.

Componentele sale includ alelele predominante în distribuția de clasă I menționată (A*02 și B*18, C*07) și DRB1*11, toate aflate între primele ca frecvență în România – deci nu este surprinzător că apar împreună ca haplotip relativ răspândit.

Un alt haplotip de interes – de data aceasta asociat Europei de Vest – este haplotipul ancestral “8.1”: HLA-A*01:01 – B*08:01 – C*07:01 – DRB1*03:01 – DQB1*02:01 (cunoscut pentru legătura sa cu suita HLA-DR3/DQ2).

În populația generală românească, acest haplotip apare, dar cu o frecvență redusă (sub 2%), mai scăzută decât în nord-vestul Europei. Interesant este că în subgrupuri etnice de origine germanică din România – cum ar fi sașii transilvăneni sau în rândul emigranților români stabiliți în Germania – haplotipul A1-B8-DR3 este mult mai comun (~6%), în paralel cu o prezență minimă a haplotipului balcanic A2-B18-DR11 în acele grupuri.

Acest contrast reflectă influența originii ancestrale asupra frecvențelor haplotipurilor: comunitățile de origine germanică păstrează profilul HLA vestic (bogat în haplotipul 8.1), pe când românii majoritari au un profil est/sud-est european (bogat în haplotipul cu B18-DR11).

7. Discuții

Frecvențele alelelor și haplotipurilor HLA obținute în acest studiu oferă o serie de informații esențiale cu aplicații practice și științifice. În plan practic, pentru programul de transplant medular, datele sugerează că absența unor haplotipuri HLA cu frecvență înaltă în populația românească se traduce printr-o dificultate sporită de a găsi donatori complet compatibili fiecărui pacient.

Fiecare pacient de origine română are, în medie, combinații HLA relativ rare, ceea ce face improbabil ca un alt individ neînrudit din populație să aibă exact același profil HLA. În consecință, șansa de compatibilitate 100% pe HLA în absența unui frate/soră este mai mică, comparativ cu populațiile în care există haplotipuri dominante (unde anumiți donatori sunt compatibili cu mai mulți pacienți).

Acest fapt subliniază importanța extinderii bazei de donatori voluntari, astfel încât cât mai multe haplotipuri rare să fie reprezentate în registru, crescând probabilitatea de a găsi măcar un donator compatibil pentru fiecare pacient. Totodată, rezultatele argumentează necesitatea diversificării etnice a donatorilor înregistrați: compatibilitățile HLA sunt mult mai probabile în cadrul aceluiași grup etnic sau regional, deci includerea minorităților naționale și a persoanelor cu origini etnice mixte în RNDVCSH va spori șansele de succes ale căutărilor de donatori compatibili.

În plus, având în vedere mobilitatea populației (emigrarea unor români și imigrarea unor grupuri noi), actualizarea constantă a profilului HLA devine relevantă pentru cooperarea internațională în transplant: România poate beneficia de pe urma partajării datelor și a donatorilor la nivel global, integrându-se în rețeaua internațională de donatori, astfel încât un pacient român să poată găsi donator compatibil într-o altă țară și viceversa.

Din punct de vedere tehnic, studiul demonstrează și valoarea adăugată a tipării HLA la rezoluție înaltă prin NGS pentru registrele de donatori. Metoda NGS a permis identificarea precisă a alelelor și haplotipurilor, eliminând ambiguitățile de fază și evidențiind alele rar întâlnite, informații care anterior lipseau.

Aceste date detaliate pot fi folosite pentru a îmbunătăți algoritmi de potrivire virtuală donator-pacient – de exemplu, prin calcularea mai exactă a probabilității de a găsi un donator compatibil pentru un anumit pacient, ținând cont de frecvența haplotipului pacientului în populație. Cunoașterea frecvențelor locale permite astfel o estimare a șanselor de matching: haplotipurile foarte rare necesită căutări extinse (poate la nivel internațional), pe când haplotipurile relativ comune au șanse mai mari de succes în registrul intern.

De asemenea, tiparea NGS a evidențiat prezența unor alelomorfi noi sau foarte rar documentați în populație, contribuind la actualizarea bazelor de date globale HLA și subliniind importanța continuării supravegherii genetice.

Nu în ultimul rând, aceste rezultate pot orienta și cercetarea biomedicală: de exemplu, corelarea frecvenței unor alele HLA de risc cu incidența bolilor autoimune în România. Dacă știm că alela HLA-B27 are ~4-5% frecvență în populație (conform datelor studiului, incluzând subtipurile B27:05 și B27:02), putem înțelege de ce prevalența spondilitei anchilozante se menține similară altor țări europene; tot astfel, frecvența heterodimerului DQ2 (DQA105:01-DQB1*02:01) în populație explică de ce boala celiacă are un bazin predispus semnificativ, chiar dacă fenotipic boala este subdiagnosticată la noi.

8. Concluzii

Prezentul studiu aduce o contribuție substanțială la cunoașterea profilului imunogenetic al populației românești, fiind prima cercetare exhaustivă la nivel de rezoluție înaltă asupra distribuției HLA în acest grup populațional.

Rezultatele obținute demonstrează clar că distribuția alelelor și haplotipurilor HLA în România este foarte largă și echilibrată, fără existența unor alele sau haplotipuri care să domine covârșitor.

Acest tablou al diversității este în concordanță cu tiparele observate în alte populații europene mari, sugerând că populația românească se înscrie într-un model genetic european în care variabilitatea este regula, și nu excepția. S-a reușit astfel caracterizarea profilului HLA autohton și s-a arătat, prin comparații internaționale, că România se află într-un cluster genetic comun cu Europa Occidentală, având totodată particularități regionale (cum ar fi frecvența ridicată a anumitor alele balcanice).

S-au identificat alele și haplotipuri rare prezente în populație, informație esențială pentru estimarea șanselor de compatibilitate în programele de transplant.

De asemenea, prin evidențierea distribuției unor haplotipuri ca DQ2 și DQ8, lucrarea oferă un punct de plecare pentru studii viitoare privind corelația genotipului HLA cu predispozițiile la boli autoimune în România – un domeniu încă puțin explorat la noi. Din perspectiva aplicațiilor, concluziile susțin necesitatea raportării complete a datelor HLA pentru fiecare populație națională, ca bază pentru optimizarea registrelor de donatori de celule stem hematopoietice. În cazul României, rezultatele acestei teze pot fi utilizate imediat de către RNDVCSH și centrele de transplant, atât pentru a orienta strategiile de recrutare a noilor donatori (vizând sub-grupuri etnice insuficient reprezentate), cât și pentru a rafina procedurile de alocare a grefelor pe criterii de compatibilitate virtuală.

Volumul mare de cunoștințe generat – incluzând frecvențele detaliate ale fiecărei alele HLA și lista haplotipurilor cu probabilitatea lor de apariție – constituie totodată un reper pentru orice viitoare cercetări în domeniul imunogeneticii populaționale în spațiul românesc.

Pe măsură ce dinamica demografică și amestecurile populaționale continuă, se așteaptă ca distribuțiile HLA să evolueze, sporind diversitatea observată. În acest sens, studiul continuu al frecvenței HLA în populație este esențial nu doar pentru medicina de transplant, dar și pentru înțelegerea geneticii bolilor complexe cu componentă imună.

În concluzie, cercetarea de față oferă o imagine de ansamblu actualizată și detaliată a peisajului HLA al populației analizate din România și subliniază importanța acestuia în context clinic și științific. În încheiere, subliniem că integrarea acestor cunoștințe în practicile medicale (în special în transplant și în monitorizarea bolilor asociate HLA) va conduce la beneficii tangibile pentru sistemul de sănătate.

Bibliografie

1. G Rodey. HLA beyond tears: Introduction to human histocompatibility. Editura DeNovo, 2000, ediția a -2- a.
2. SY Choo. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Yonsei Medical Journal, 2007; 48(1):11-23.
3. EP Kransdorf, MJ Pando, L Gragert, B Kaplan. HLA Population Genetics in Solid Organ Transplantation. Transplantation, 2017; 101(9).
4. G Tumer, B Simpson, TK Roberts. Genetics, Human Major Histocompatibility Complex (MHC). StatPearls Publishing, 2021.
5. I Constantinescu, V Boscaiu, P Cianga, AA Dinu, E Gai, M Melinte, A moise. The frequency of HLA alleles in the Romanian Population. Immunogenetics, 2016; 68(3).
6. <http://www.allelefrequencies.net/default.asp>
7. I Constantinescu. Imunologia transplantului. Editura universitară UMF Carol Davila, 2007.
8. M Carp-Cărare, D Timofte. Imunologie și imunopatologie.
9. A Olinescu. Imunologie. Editura didacticăși pedagogică, 1995, București
10. CA Janeway, P Travers, M Walport, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. The components of the immune system. 5th edition. Garland Science, 2001
11. Mihăilescu G. Imunologie și imunochmie. Editura Universității din București, 2001.
12. Rich R, Fleisher A, Shearer W, Schroeder H, Frew A, Weyand C. Clinical Immunology. Third edition. Elsevier, 2008.
13. Imagine 1 Westover J. Immune dysfunction in autism spectrum disorder. DOI:10.5772/22318. (Cromozomul 6 poza). Fig 1.1
14. B Lewin. Genes VII. Oxford University Press, 2000.
15. Shiina T, Inoko H, J K Kulski. An update of the HLA genomic region, locus information and disease association. Tissue Antigens 2004; 64(6):631-649. DOI:10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x
16. Belich, M. P., Madrigal, J. A., Hildebrand, W. H., et al. (1992) Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. Nature 357, 326–329.
17. Klein, K. (1986) Natural History of the Major Histocompatibility Complex. John Wiley and Sons, Inc., Toronto, Canada.

18. Cao, K., Chopek, M., and Fernandez-Vina, M. A. (1999) High and intermediate resolution DNA typing systems for class I HLA-A, B, C genes by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Rev. Immunogenet.* 1, 177–208.
19. Balazs, I., Beekman, J., Neuweiler, J., Liu, H., Watson, E., and Ray, B. (2001) Molecular typing of HLA-A, -B, and DRB using a high throughput micro array format. *Hum. Immunol.* 62, 850–857.
20. Consolandi, C., Frosini, A., Pera, C., et al. (2004) Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array. *Hum. Mutat.* 24, 428–434.
21. Li, A. X., Seul, M., Cicciarelli, J., Yang, J. C., and Iwaki, Y. (2004) Multiplexed analysis of polymorphisms in the HLA gene complex using bead array chips. *Tissue Antigens* 63, 518–528.
22. Olerup, O. and Zetterquist, H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39, 225–235.
23. Bunce, M., O'Neill, C. M., Barnardo, M. C., et al. (1995) Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 46, 355–367.
24. Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503–2516.
25. van der Vlies, S. A., Voorter, C. E., and van den Berg-Loonen, E. M. (1998) A reliable and efficient high resolution typing method for HLA-C using sequencebased typing. *Tissue Antigens* 52, 558–568.
26. Turner, S., Ellexson, M. E., Hickman, H. D., et al. (1998) Sequence-based typing provides a new look at HLA-C diversity. *J. Immunol.* 161, 1406–1413.

Listă de publicații

Articole originale cotate ISI

1. Caragea AM, Ursu RI, Maruntelu I, Tizu M, Constantinescu AE, Tălăngescu A, Constantinescu I. High Resolution HLA-A, HLA-B, and HLA-C Allele Frequencies in Romanian Hematopoietic Stem Cell Donors. *Int J Mol Sci.* 2024 Aug 14;25(16):8837. doi: 10.3390/ijms25168837, Q1, IF 4.9. Website: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/16/8837>.
2. Caragea AM, Ursu RI, Bohîltea LC, Iordache P, Constantinescu AE, Constantinescu I. Characterization of HLA-A/HLA-B/HLA-C/HLA-DRB1 Haplotypes in Romanian Stem Cell Donors Through High-Resolution Next-Generation Sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 5250. <https://doi.org/10.3390/ijms26115250>, Q1, IF 4.9. Website: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/11/5250>
3. Caragea AM, Ursu RI, Vișan LD, Mărunțelu I, Iordache P, Constantinescu AE, Tizu M, Tălăngescu A, Constantinescu I. High-resolution HLA-DRB1 allele frequencies in a Romanian cohort of stem cell donors. *BJMG.* 2024, 27(1):1-8. Doi: 10.2478/bjmg-2024-0009, Q4, IF 0.5.

Articole originale cotate BDI

1. Caragea AM, Ursu RI, Iacob MM, Surugiu MS, Iordache P, Matei A, Constantinescu AE, Vișan LD, Constantinescu I. High Resolution HLA-DPA1 AND HLA-DPB1 allele frequencies in a Romanian cohort. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 2024, 83(2):87-93, DOI: [10.54044/RAMI.2024.02.02](https://doi.org/10.54044/RAMI.2024.02.02)

Capitole de cărți în edituri internaționale

1. Caragea AM, Bohiltea L, Constantinescu A, Constantinescu I, Ursu RI. NGS and Immunogenetics: Sequencing the HLA Genes. Book chapter from *DNA Sequencing - History, Present and Future Genetics*, edited by Abdurakhmonov IY. IntechOpen; 2025. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1008527>.
2. Caragea AM, Bohiltea L, Constantinescu A, Constantinescu I, Ursu RI. Perspective Chapter: Decoding the Complexity of HLA Genes – The Heart of Modern Immunogenetics. *Advances and Trends in Population Genetics Studies* [Working Title]. IntechOpen; 2025. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1008543>

Premii obținute

1. Premiul pentru Imunologie Clinică „Grigore Ghyka”, pentru lucrarea “Frecvența haplotipurilor HLA în populația românească – date preliminare”. Acordat cu ocazia celei de-a 49-a Conferință a Societății de Imunologie din România, 2020.

