

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

**Analiza moleculară a genelor HLA și rolul polimorfismului
acestora în infecția cronică cu virusul hepatitic B**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CONSTANTINESCU ILEANA

Student-doctorand:

OPREA (căs. TĂLĂNGESCU) ADRIANA

Cuprins

Introducere	5
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	7
1. Imunobiologia virusului hepatitic B	7
1.1. Caractere generale actuale: epidemiologie, distribuția și impactul clinic al genotipurilor VHB	7
1.2. Arhitectura moleculară a genomului VHB.....	13
2. Complexitatea și diversitatea sistemului HLA.....	16
2.1. Imunogenetica longevității	20
2.2. Polimorfismul HLA și reacțiile adverse la medicamente	22
2.3. Variabilitatea genelor HLA în infecțiile virale.....	24
CONTRIBUȚII PERSONALE	27
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării.....	27
4. Metodologia generală a cercetării	28
4.1. Selecția și descrierea lotului de studiu	28
4.2. Materialul biologic	28
4.3. Izolare ADN genomic din sânge	29
4.4. Secvențierea de nouă generație a ADN-ului genomic pentru genotiparea alelelor HLA	32
4.5. Analiza datelor statistice generate de secvențiatorul MiniSeq Illumina.....	42
4.6. Analiza și interpretarea rezultatelor cu software-ul MIA FORA FLEX	42
4.7. Izolare ADN viral.....	49
4.8. Detecția și cuantificarea ADN VHB prin tehnica real-time PCR	50
4.9. Analiza și interpretarea rezultatelor de cuantificare a ADN VHB	52
4.10. Analiza markerilor virusologici.....	54
4.11. Analiza markerilor biochimici.....	54
4.12. Monitorizarea steatozei hepatice	55
4.13. Analiza statistică a datelor.....	55
5. Rezultate	56
5.1. Analiza variabilității profilurile moleculare ale genelor HLA	56
5.2. Caracterizarea alelelor rare întâlnite în cohorta de studiu folosind secvențierea de nouă generație	82
5.3. Diversitatea genetică și testarea ipotezei avantajului heterozigozității genelor HLA	92
5.4. Asocierea genotipării HLA cu răspunsul virusologic în hepatita cronică cu VHB	107
6. Discuții.....	112
7. Concluzii și contribuții personale	117
Bibliografie	120

Introducere

Infecția cronică cu virusul hepatitic B (VHB) reprezintă încă o problemă majoră de sănătate, iar estimările cele mai recente în evaluarea obiectivului de a limita infecția cu virusul hepatitic B nu au rezultate așteptate (1). Necesitatea de a investiga noi markeri genetici care să ajute la obținerea unui model predictiv în managementul terapeutic, dar și de prevenție este imperios necesar. Studiile epidemiologice recente efectuate pe populația românească indică o prevalență a pozitivității de Ag HBs (antigenul de suprafață al hepatitei B) de 5,59%, iar seroprevalența virusurilor hepatitice este mai mare comparativ cu Europa Centrală și de Vest (2) cu un procent asemănător de 5,1% Ag HBs pozitiv la categoria femeilor însărcinate (3).

Ideea de cercetare a prezentei lucrări a fost reprezentată de investigarea amănunțită a mecanismelor moleculare prin implicarea genelor HLA care controlează răspunsul imun în infecția cronică cu VHB.

Regiunea MHC (complexul major de histocompatibilitate) a fost descrisă ca un „genom în interiorul genomului” (4), astfel încât complexitatea polimorfismului genetic HLA prin caracterizarea genelor, nu doar la situsul de legare la peptide, a oferit oportunitatea prezentului studiu de a descrie legăturile dintre profilul genetic HLA și evaluarea riscului genetic în susceptibilitatea și persistența în infecția cronică cu VHB, dar și evaluarea genelor cu implicare în protecție împotriva infecției.

Imunogenetica HLA reprezintă o fascinantă arie de cercetare, dar și o provocare, întrucât dinamica continuă a descoperirii de noi alele presupune noi perspective de abordare în identificarea cu acuratețe a secvențelor de nucleotide și bolile asociate. Conform celui mai recent raport, în decembrie 2024, au fost identificate și denumite 28409 alele HLA de clasa I și 12594 alele HLA de clasa a II-a (5).

Secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS) a regiunii genomice HLA împreună cu informațiilor obținute va permite dezvoltarea unui algoritm al profilului genetic populational, chiar dacă genotiparea HLA nu reprezintă încă, precum alți biomarkeri, care sunt utilizați în screening-ul genetic pentru o anumită mutație predictivă a unei patologii.

Impactul diversității genetice HLA în infecțiile virale a fost abordat de cercetători din întreaga lume, pe diferite zone geografice, populații și etnii având caracteristici specifice pentru fiecare regiune.

În acest context, prezenta teză abordează pentru prima dată în România studierea polimorfismului genetic HLA la nivel de rezoluție înaltă și asocierea cu infecția cronică cu VHB, cunoscându-se foarte bine că diversitatea profilului genetic HLA se raportează în funcție de frecvența alelică, iar anumite gene cum ar fi HLA-C prezintă diversitate redusă în secvența de nucleotide. Obiectivul principal al studiului a fost de a caracteriza profilul genetic molecular HLA cât și pozițiile specifice reziduurilor de aminoacizi în populația de studiu care a fost împărțită în două categorii majore: grupul cu hepatită cronică VHB și grupul de indivizi sănătoși, obiectiv îndeplinit prin obținerea unor descoperiri care vor putea fi baza unor studii viitoare de mare amploare.

O altă abordare de cercetare a studiului a fost reprezentată de identificarea în populația de studiu a genotipurilor specifice HLA care prezintă avantajul heterozigot, oferind protecție împotriva infecției virale, dar și a genotipurilor homozigote implicate în persistența infecției cu VHB. Lucrarea științifică a analizat și corelațiile dintre statusul replicării virale și controlul răspunsului imun și prezența unui anumit polimorfism genetic HLA.

Oportunitatea de a secvenția întreaga regiune HLA la pacienții cu infecție cronică cu VHB și înțelegerea răspunsului imunologic mediat de genele HLA ar putea să contribuie eficient la implementarea strategiilor de prevenție, întrucât infecția cu VHB are multe forme clinice, de la infecția acută la hepatocarcinom celular.

Stadiul actual al cunoașterii

Infecția cu virusul hepatitic B și toate complicațiile care pot să se dezvolte, hepatită cronică, ciroză hepatică, carcinoma hepatocelular și chiar decesul, i-a determinat pe cercetători, dar și pe clinicieni din întreaga lume să investigheze și să descopere noi strategii terapeutice. Ultimele raportări ale OMS din anul 2022, estimau că în jur de 254 de milioane de persoane sunt infectate cronic cu VHB, iar un număr de peste 1,1 milioane de oameni au dezvoltat complicații care au condus la deces(6).

În România, cele mai recente rezultate din perioada 2020-2023 ale prevalenței markerilor serologici infecțioși în hepatita B au estimat că prevalența markerului pozitiv anticorpi anti-HBc a fost de 26,3% la categoria de vârstă 18-69 de ani. În regiunea Nord-Est s-au raportat valori mai ridicate comparativ cu regiunea Centru (29,6% versus 19,4%). Raportările referitoare la pozitivitatea AgHBs a fost de 6,2% pentru categoria de vârstă 18-

69 ani, ceea ce sugerează o creștere cu 1,3% față de studiul efectuat în perioada anilor 2006-2008 (7). Influența genotipurilor asupra răspunsului la terapia antivirală are eficiență majoră când studiile sunt efectuate și se focusează pe o singură etnie, întrucât atât genotipul cât și durata infecției cu VHB prezintă diferențe între genotipurile de origine autohtonă și genotipurile importate (8). Pacienții cu infecție cronică care prezintă genotip A au o probabilitate mai mică de a dezvolta hepatocarcinom în comparație cu cei posedă genotipul D (9),

În populația românească, frecvența genotipului A s-a regăsit la pacienții purtători inactivi de VHB(10), în zona Transilvaniei pacienții investigați au avut preponderent genotip D, iar în completarea studiului din anul 2008, cel mai recent studiu care a analizat prevalența genotipurilor într-o cohorta de pacienți care pe lângă infecție cu VHB prezentau și co-infecție cu HIV a demonstrat că prezența genotipului A se asociază cu supraviețuirea pe termen lung (11). Epidemiologia moleculară a genotipurilor VHB și analiza diversității subgenotipurilor a fiecărei etnii în parte și integrarea alături de caracteristicile clinice ale pacienților va contribui la îmbunătățirea descifrării complexității mecanismului de acțiune a virusului hepatitic B și a răspunsului imun, oferind în viitor noi perspective de abordare care vor conduce la conturarea unui profil imunogenetic complet și complex.

Genele complexului major de histocompatibilitate (MHC) au cea mai mare diversitate genetică și sunt cheia răspunsului imun care prin prezentarea peptidelor antigenice celulelor T va avea capacitatea remarcabilă de a diferenția celulele proprii organismului de cele străine, iar studierea biologiei HLA a condus la descrierea mecanismelor moleculare și genetice atât în diferite boli autoimune, infecțioase, în hipersensibilitatea la medicamente, dar și în determinarea longevității (12).

În definirea polimorfismului HLA necesitatea standardizării denumirii și clasificării alelelor a fost prevăzută încă din 1968 când a avut loc pentru prima dată înființarea unui Comitet, denumit de către OMS „Comitetul de Nomenclatură pentru Factorii Sistemului HLA” (13). Backgroundul informațional al polimorfismului genetic HLA datorat metodologiilor actuale de secvențiere necesită permanentă rigurozitate în analiza secvențelor de nucleotide, iar descoperirea continuă a noilor variante alelice HLA aduce permante provocări în comunitatea științifică și în practica clinică. Progresele în cercetarea imunogeneticii HLA și acuratețea în identificarea variantelor alelice se datorează tehnologiilor noi de secvențiere care au permis caracterizarea întregii regiuni genomice HLA. Genotiparea HLA are aplicații multiple, având rol crucial în transplantul de organ solid și transplantul de celule stem hematopoietice, dar și în asocierea cu peste 100 de boli

și chiar în aplicațiile farmacogenomice. Frecvența alelelor HLA variază în diferitele grupuri etnice și au un impact semnificativ în susceptibilitatea la reacțiile adverse la medicamente și multe studii au confirmat importanța polimorfismelor HLA în farmacogenetică. Ghidurile recente de reumatologie din America recomandă ca o măsură de precauție pentru pacienții care urmează să primească tratamentul cu alopurinol pentru tratarea gutei să fie genotipați pentru HLA-B*58:01, întrucât persoanele purtătoare ale acestei gene au un risc crescut de a dezvolta reacții adverse cutanate severe cum ar fi sindromul Stevens-Johnson(14).

În înțelegerea bazei genetice și implicarea răspunsurilor imunologice în susceptibilitatea sau protecția față de infecțiile virale, numeroase studii au evaluat genele HLA datorită polimorfismului lor foarte mare și a impactului pe care îl au în generarea de răspunsuri imune. Complexitatea polimorfismului genetic HLA și implicarea în modularea răspunsului imun a permis cercetătorilor să investigheze interacțiunea dintre patogeneza infecțiilor virale și variantele genetice HLA.

Contribuții personale

Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării

Studiul asocierii polimorfismelor genetice HLA cu infecția cronică cu VHB a fost abordat în contextul prevalenței încă crescute a infecției, în pofida existenței unui vaccin eficient. O abordare mai amplă, care să includă testarea imunogenetică a particularităților individuale ale sistemului imun, ar putea oferi informații suplimentare și dezvoltarea de noi strategii de abordare și monitorizare a infecției cu VHB.

Obiectivele principale ale cercetării:

1. Analiza profilurilor genetice HLA în infecția cronică cu virusul hepatitic B utilizând tehnica de secvențiere de nouă generație.
2. Diversitatea genetică HLA și testarea teoriei avantajului heterozigot în contextul infecției cronice cu VHB.
3. Asocierea polimorfismului genetic HLA cu efectul replicării virale active de ADN VHB și co-existența steatozei hepatice.

Selecția și descrierea lotului de studiu

Selectarea consecutivă a pacienților cu infecție VHB din cadrul Departamentului de Gastroenterologie și Hepatologie, Institutul Clinic Fundeni s-a realizat în perioada 2022-

2024, astfel au fost eligibili un număr total de 327 pacienți. Lotul martor, sănătos a fost constituit din 304 persoane (Tabel 4.1). Studiul a respectat Declarația de la Helsinki, regulile și principiile de bună practică în cercetarea pe subiecți umani și a fost aprobat de Comisia de Etică a Institutului Clinic Fundeni (28640/25.05.2022). Datele clinice anonimizate au fost armonizate cu informațiile obținute în laborator, fiind introduse într-o bază de date la care accesul a fost parolat pentru a se asigura securitatea și integritatea datelor.

Criteriile de includere: persoanele peste 18 ani diagnosticate cu infecție cronică cu VHB pe baza biomarkerilor virusologici, biochimici și a investigațiilor imagistice (ecografie abdominală) și monitorizarea periodică la 6 luni sau 1 an.

Materialul biologic

Materialul biologic recoltat de la subiecții incluși în studiu a fost constituit doar din sânge, astfel încât nu au fost expuși riscurilor. Toți participanții incluși în studiu, înainte de semnarea consimțământului, au fost informați despre riscul minim potențial care poate să apară în timpul recoltării probelor biologice de sânge, risc prevăzut și în procedura uzuală de recoltare din timpul vizitelor medicale periodice pe care le efectuează. În vederea genotipării HLA, dar și pentru determinarea viremiei de ADN-VHB, colectarea probelor primare a fost constituită din sânge periferic recoltat pe vacutainere cu EDTA.

Izolare ADN genomic din sânge

Protocolul de extracție a ADN-ului total din probele de sânge periferic recoltate pe vacutainer cu EDTA s-a realizat cu reactivii din kitul QIAmp DNA Blood Mini® kit (QIAGEN, Hilden, Germany) care este marcat CE-IVD, în conformitate cu Directiva UE98/79/CE, conform instrucțiunilor producătorului. Reactivii utilizați au fost compatibil cu echipamentul QIAcube® pentru efectuarea extracției automate care conferă un avantaj net superior spre deosebire de extracția manuală, evitând contaminarea încrucișată, întrucât calitatea și puritatea ADN-ului obținute reprezintă un factor cheie pentru secvențierea de nouă generație.

Secvențierea de nouă generație a ADN-ului genomic pentru genotiparea alelelor HLA

Amplificarea ADN-ului genomic obținut în urma extracției pentru genotiparea alelelor HLA s-a realizat folosind kitul MIA FORA™ NGS MFlex11 (Norcross, GA, USA) respectând instrucțiunile producătorului Immucor. Principiul metodei NGS permite

acoperirea totală a genelor HLA, inclusiv intronii, regiunile netranslaționale 3'-UTR și 5'-UTR, dar și regiunile în amonte și în aval, constând în următoarele etape majore: long-range PCR, construirea librăriei, pregătirea librăriei pentru secvențiere. Într-o primă etapă numită long-range PCR în care are loc alungirea rapidă A ADN, combinată cu o cantitate mică de corectare a polimerazei pentru precizie. Astfel, enzima de corectare repară nepotrivirile de ADN încorporate la capătul 3' al catenei și permite alungirea până la 30 kb. Etapa următoare constă în construirea librăriei constituită etapă care constă în fragmentarea enzimatică a produșilor PCR obținuți în etapa de long-range. Fragmentarea ADN-ului nu are ca rezultat fragmente omogene cu capete contondente, nu conțin baze nepereche la capetele 3' și 5', de aceea urmează repararea capetelor fragmentelor de ADN și adăugarea adeninei la capătul 3' care permite ligarea timinei la capătul 5' din index adaptor. La capătul 3' al fragmentului de ADN fosforilat se încorporează deoxiadenozina 5'monofosfat pentru a preveni concatemerizarea. Probele se purifică și apoi urmează ligarea acestora cu index adaptor, după care probele vor fi consolidate într-un singur tub.

Izolare ADN viral

Extracția ADN-ului viral din probele recoltate în vacutainere ce conțin ca și anticoagulant acid etilendiamintetraacetic (EDTA) s-a efectuat cu reactivii comerciali Bosphore® Viral DNA Extraction Spin Kit (Anatolia Geneworks, Turkey, Istanbul). Kitul este marcat CE-IVD, în conformitate cu Directiva UE98/79/CE și s-a folosit conform specificațiilor producătorului.

Detecția și cuantificarea ADN VHB prin tehnica real-time PCR

ADN-ul viral obținut în urma extracției pentru detecția și cuantificarea încărcăturii virale ADN VHB s-a realizat folosind Bosphore HBV Quantification Kit și instrumentul Montania 4896 (Anatolia Geneworks, Turkey, Istanbul) conform producătorului.

Analiza markerilor virusologici

Colectarea și prelucrarea probelor biologice în vederea testării markerilor virali (Ag Hbs, anti-HBs, anti-HBc, Ag Hbe, anti-Hbe) s-a realizat prin recoltarea sângelui periferic în vacutainer fără anticoagulant cu sau fără gel separator și centrifugarea probele de sânge timp de 30 minute la 14000 rpm. Metoda de examinare a fost chemiluminiscență folosind echipamentul Architect i2000 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) cu reactivii comerciali compatibili.

Analiza markerilor biochimici

Parametrii biochimici alaninaminotransferază (ALT), aspartataminotransferaza (AST), gama-glutamyltranspeptidaza, bilirubina totală, bilirubina directă, fosfataza alcalină au fost determinați prin metoda spectrofotometrică folosind echipamentul Dimension® EXL™ 200 (Siemens Healthcare GmbH, Germany, Forchheim). Pentru analiza profilului biochimic, pacienților incluși în studiu li s-a recoltat sânge venos.

Monitorizarea steatozei hepatice

Examinarea ecografică abdominală alături de testul SteatoTest (BioPredictive, Paris, Franța) a contribuit la clasificarea stadiilor de steatoză hepatică.

Analiza statistică a datelor

În acest studiu, analiza imunogenetică a fost realizată utilizând MIDAS HLA (Molecular Immunogenetics Data Analysis System) versiunea 1.10.0 ce cuprinde software-ul Bioconductor versiunea 3.18, dar și Microsoft Office Excel, utilizând modele de regresie logistică. În cadrul interpretării statistice pentru calculul variabilelor de interes au fost incluse: raportul cotelor de probabilitate (Odd ratio), intervalele de încredere de 95%, valoarea p, metoda de corecție Benjamini-Hochberg.

Rezultate

Analiza variabilității profilurile moleculare ale genelor HLA

În evaluarea asocierii polimorfismelor genetice HLA și infecția virală au fost incluși un număr de 247 pacienți cu infecție cronică cu VHB; lotul de pacienți fiind format din 113 femei cu vârsta cuprinsă între 23 și 81 ani, și 134 bărbați cu vâsta minimă de 23 ani și vârsta maximă de 83 ani. Lotul control a fost constituit din 304 voluntari sănătoși (118 femei și 186 bărbați) cu sau fără vaccin împotriva hepatitei B.

Genetica variabilității alelei HLA-A a dus la identificarea a 41 de variante genetice, iar prin compararea celor două loturi de studiu, o singură variantă alelică a fost găsită ca având semnificație statistică, HLA-A*24:02:01 ($p = 0,014$) prezentând un potențial efect de risc, cu un interval de încredere cuprins între 1,11 – 2,53 și OD cu o valoare de 1,67 (Tabel 5.1). Interacțiunea dintre HLA-A și cele două categorii studiate, a condus la identificarea a trei variante alelice cu tendință de a fi semnificative statistic, și anume o variantă cu posibil

efect de protecție împotriva infecției cu VHB, HLA-A*25:01:01 ($p = 0,058$; OD = 0,46; 95% CI = 0,20 - 1,05), iar alte două alele cu un potențial rol de risc HLA-A*30:02:01 ($p = 0,085$; OD = 3,73) și HLA-A*33:01:01 ($p = 0,060$; OD = 2,5) (Figura 5.1).

Tabel 5.1. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-A în lotul de pacienți și în lotul control

HLA-A	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n = 494)		(2n = 608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:01:01	67	13,56	87	14,31	0,722	0,94	0,67	1,32
*02:01:01	130	26,32	166	27,30	0,713	0,95	0,73	1,24
*02:01:18	1	0,20	0	0,00	0,267	0,00	-	-
*02:05:01	5	1,01	2	0,33	0,156	3,10	0,60	16,04
*02:06:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*02:11:01	4	0,81	2	0,33	0,281	2,47	0,45	13,56
*02:17:02	1	0,20	3	0,49	0,424	0,41	0,04	3,94
*03:01:01	50	10,12	63	10,36	0,896	0,97	0,66	1,44
*03:01:71	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*03:02:01	1	0,20	5	0,82	0,164	0,24	0,03	2,10
*11:01:01	40	8,10	47	7,73	0,822	1,05	0,68	1,63
*23:01:01	9	1,82	21	3,45	0,098	0,52	0,24	1,14
*24:02:01	57	11,54	44	7,24	0,014	1,67	1,11	2,53
*24:03:01	3	0,61	3	0,49	0,798	1,23	0,25	6,13
*25:01:01	8	1,62	21	3,45	0,058	0,46	0,20	1,05
*26:01:01	29	5,87	30	4,93	0,492	1,20	0,71	2,03
*29:01:01	3	0,61	5	0,82	0,676	0,74	0,18	3,10
*29:02:01	4	0,81	7	1,15	0,571	0,70	0,20	2,41
*30:01:01	5	1,01	10	1,64	0,367	0,61	0,21	1,80
*30:02:01	6	1,21	2	0,33	0,085	3,73	0,75	18,54
*31:01:02	9	1,82	10	1,64	0,822	1,11	0,45	2,75
*32:01:01	16	3,24	26	4,28	0,371	0,75	0,40	1,41

*33:01:01	12	2,43	6	0,99	0,060	2,50	0,93	6,70
*33:03:01	4	0,81	7	1,15	0,571	0,70	0,20	2,41
*66:01:01	2	0,40	3	0,49	0,828	0,82	0,14	4,93
*68:01:01	8	1,62	7	1,15	0,505	1,41	0,51	3,92
*68:01:02	11	2,23	13	2,14	0,920	1,04	0,46	2,35
*68:02:01	2	0,40	3	0,49	0,828	0,82	0,14	4,93
*74:03:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80

Polimorfismul foarte ridicat al genei HLA-B și informațiile genetice obținute prin analiza secvențierii celor 7 exoni a permis identificarea a 68 de variante alelice diferite (Tabel 5.2). Dintre toate alelele identificate, HLA-B*15:01:01 este cu semnificație statistică ($p = 0,033$; OD = 0,40) și poate fi încadrată ca o variantă genetică de protecție, aspect confirmat și de intervalul de încredere (95% CI = 0,17 – 0,95). Tot din grupul HLA-B*15, dar varianta *15:18:01 a arătat o semnificație statistică ($p = 0,013$) ca având efect de protecție dar acest aspect nu a fost confirmat nici de intervalul de încredere și nici de raportul cotelor.

Pe de altă parte, o altă potențială variantă alelică de protecție a fost HLA-B*18:01:01 ($p = 0,025$; OD = 0,62; 95%CI = 0,41 – 0,94), semnificație susținută și de intervalul de încredere care estimează precizia lui OD. Mai mult decât atât, au fost observate 3 variante alelice cu potențial efect de protecție HLA-B*13:02:01 ($p = 0,087$; OD = 0,47), HLA-B*40:01:02 ($p = 0,074$; OD = 0,27), HLA-B*58:01:01 ($p = 0,076$; OD = 0,33) și o variantă de risc asupra infecției cu VHB, și anume HLA-B*14:02:01 ($p = 0,083$; OD = 2,0).

Tabel 5.2. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-B în lotul de pacienți și în lotul control

<i>HLA-B</i>	Lot pacienți (2n = 494)		Lot control (2n = 608)		<i>p</i>	OR	95% CI	
	Total	%	Total	%			Inferior	Superior
*07:02:01	18	3,64	31	5,10	0,244	0,70	0,39	1,27
*07:05:01	2	0,40	2	0,33	0,835	1,23	0,17	8,78
*08:01:01	41	8,30	50	8,22	0,964	1,01	0,66	1,55
*13:02:01	7	1,42	18	2,96	0,087	0,47	0,20	1,14
*14:02:01	16	3,24	10	1,64	0,083	2,00	0,90	4,45

*15:01:01	7	1,42	21	3,45	0,033	0,40	0,17	0,95
*15:08:01	2	0,40	1	0,16	0,446	2,47	0,22	27,29
*15:17:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80
*15:73:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*18:01:01	37	7,49	70	11,51	0,025	0,62	0,41	0,94
*18:03:01	4	0,81	2	0,33	0,281	2,47	0,45	13,56
*18:05:01	4	0,81	3	0,49	0,511	1,65	0,37	7,39
*27:02:01	10	2,02	10	1,64	0,639	1,24	0,51	0,99
*27:05:02	19	3,85	13	2,14	0,093	1,83	0,89	3,75
*35:01:01	31	6,28	38	6,25	0,986	1,00	0,62	1,64
*35:02:01	8	1,62	7	1,15	0,505	1,41	0,51	3,92
*35:03:01	21	4,25	36	5,92	0,213	0,71	0,41	1,22
*35:08:01	8	1,62	13	2,14	0,531	0,75	0,31	1,83
*37:01:01	7	1,42	7	1,15	0,695	1,23	0,43	3,54
*38:01:01	10	2,02	17	2,80	0,410	0,72	0,33	1,58
*39:01:01	13	2,63	12	1,97	0,466	1,34	0,61	2,97
*39:06:02	2	0,40	1	0,16	0,446	2,47	0,22	27,29
*39:24:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*40:01:02	2	0,40	9	1,48	0,074	0,27	0,06	1,26
*40:02:01	11	2,23	9	1,48	0,356	1,52	0,62	3,69
*40:06:01	9	1,82	5	0,82	0,141	2,24	0,75	6,72
*41:01:01	12	2,43	7	1,15	0,105	2,14	0,84	5,47
*41:02:01	2	0,40	2	0,33	0,835	1,23	0,17	8,78
*44:02:01	20	4,05	19	3,13	0,409	1,31	0,69	2,48
*44:03:01	18	3,64	18	2,96	0,526	1,24	0,64	2,41
*44:03:02	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*44:05:01	8	1,62	7	1,15	0,505	1,41	0,51	3,92
*44:27:01	5	1,01	9	1,48	0,490	0,68	0,23	2,04
*49:01:01	9	1,82	10	1,64	0,822	1,11	0,45	2,75
*50:01:01	4	0,81	4	0,66	0,768	1,23	0,31	4,95
*51:01:01	60	12,15	63	10,36	0,350	1,20	0,82	1,74
*51:07:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80

*51:65	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*52:01:01	19	3,85	15	2,47	0,188	1,58	0,80	3,15
*53:01:01	3	0,61	2	0,33	0,494	1,85	0,31	11,12
*55:01:01	7	1,42	4	0,66	0,207	2,17	0,63	7,46
*56:01:01	5	1,01	5	0,82	0,741	1,23	0,35	4,28
*57:01:01	13	2,63	15	2,47	0,863	1,07	0,50	2,27
*58:01:01	3	0,61	11	1,81	0,076	0,33	0,09	1,20
*73:01:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74

Polimorfismul genei HLA-C este mai scăzut decât polimorfismul genei HLA-B (68 variante alelice), și a fost reprezentat de un număr total de 41 variante alelice (Tabel 5.3). Cu toate acestea, conform semnificației statistice (valoarea $p < 0,05$) pentru HLA-C nu au fost identificate alele care să aibă putere statistică, dar în schimb au fost găsite 3 variante alelice cu tendință de a se apropia de intervalul de semnificație statistică; HLA-C*03:04:01 ($p = 0,051$; OD = 0,38; 95% CI = 0,14 – 1,04), HLA-C*15:02:01 ($p = 0,058$; OD = 1,60; 95% CI = 0,98 -2,60), HLA-C*07:01:02 ($p = 0,075$; OD = 2,80; 95% CI = 0,86-9,15).

Tabel 5.3. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-C în lotul de pacienți și în lotul control

HLA-C	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n = 494)		(2n = 608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:02:01	24	4,86	27	4,44	0,743	1,10	0,63	1,93
*02:02:02	40	8,10	34	5,59	0,098	1,49	0,93	2,39
*03:02:02	2	0,40	7	1,15	0,171	0,35	0,07	1,69
*03:03:01	13	2,63	12	1,97	0,466	1,34	0,61	2,97
*03:04:01	5	1,01	16	2,63	0,051	0,38	0,14	1,04
*04:01:01	75	15,18	98	16,12	0,671	0,93	0,67	1,29
*05:01:01	19	3,85	16	2,63	0,253	1,48	0,75	2,91
*06:02:01	32	6,48	49	8,06	0,317	0,79	0,50	1,25
*07:01:01	72	14,57	103	16,94	0,285	0,84	0,60	1,16
*07:01:02	9	1,82	4	0,66	0,075	2,80	0,86	9,15

*07:02:01	26	5,26	36	5,92	0,637	0,88	0,53	1,48
*07:04:01	12	2,43	13	2,14	0,747	1,14	0,52	2,52
*07:06:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*07:18:01	3	0,61	3	0,49	0,798	1,23	0,25	6,13
*08:02:01	16	3,24	11	1,81	0,127	1,82	0,84	3,95
*12:02:02	17	3,44	14	2,30	0,256	1,51	0,74	3,10
*12:03:01	48	9,72	77	12,66	0,125	0,74	0,51	1,09
*14:02:01	12	2,43	17	2,80	0,705	0,87	0,41	1,83
*15:02:01	39	7,89	31	5,10	0,058	1,60	0,98	2,60
*15:05:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*15:05:02	2	0,40	3	0,49	0,828	0,82	0,14	4,93
*15:06:01	2	0,40	1	0,16	0,446	2,47	0,22	27,29
*16:01:01	6	1,21	6	0,99	0,717	1,23	0,40	3,85
*16:02:01	2	0,40	4	0,66	0,570	0,61	0,11	3,37
*16:04:01	2	0,40	3	0,49	0,828	0,82	0,14	4,93
*17:01:01	3	0,61	6	0,99	0,486	0,61	0,15	2,46
*17:03:01	2	0,40	4	0,66	0,570	0,61	0,11	3,37

Diversitatea alelică a genei HLA-DPA1 fiind destul de redusă, 13 variante genetice, doar o singură alelă a fost identificată cu putere statistică având un posibil efect de risc în infecția cu virusul hepatitic B, HLA-DPA1*02:01:04 ($p = 0,031$; $OD = 3,0$; 95% CI = 1,05-8,58) (Tabel 5.4). O altă observație se referă la tendința de a fi cu semnificație statistică alela HLA-DPA1*02:07:01 ca fiind o alelă de risc ($p = 0,075$, $OD = 2,80$).

Tabel 5.4. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-DPA1 în lotul de pacienți și în lotul control

HLA- DPA1	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n=494)		(2n=608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:03:01	374	75,71	486	79,93	0,092	0,78	0,59	1,04
*01:04:01	1	0,20	5	0,82	0,164	0,24	0,03	2,10

*02:01:01	56	11,34	73	12,01	0,731	0,94	0,65	1,36
*02:01:02	24	4,86	24	3,95	0,461	1,24	0,70	2,22
*02:01:04	12	2,43	5	0,82	0,031	3,00	1,05	8,58
*02:02:02	12	2,43	9	1,48	0,252	1,66	0,69	3,97
*02:07:01	9	1,82	4	0,66	0,075	2,80	0,86	9,15

În cazul genei HLA-DPB1 au fost observate 34 variante alelice (Tabel 5.5), iar din punct de vedere statistic conform valorii p mai mică decât 0,05, s-au evidențiat trei alele ca fiind alele de protecție împotriva infecției cu VHB: HLA-DPB1*09:01:01, HLA-DPB1*11:01:01, HLA-DPB1*23:01:01.

Tabel 5.5. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-DPB1 în lotul de pacienți și în lotul control

HLA- DPB1	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n=494)		(2n=608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:01:01	25	5,06	27	4,44	0,629	1,15	0,66	2,00
*02:01:02	94	19,03	109	17,93	0,639	1,08	0,79	1,46
*03:01:01	30	6,07	27	4,44	0,224	1,39	0,82	2,37
*04:01:01	154	31,17	220	36,18	0,081	0,80	0,62	1,03
*04:02:01	81	16,40	99	16,28	0,959	1,01	0,73	1,39
*05:01:01	9	1,82	8	1,32	0,498	1,39	0,53	3,63
*06:01:01	8	1,62	6	0,99	0,351	1,65	0,57	4,79
*09:01:01	2	0,40	10	1,64	0,049	0,24	0,05	1,11
*10:01:01	16	3,24	13	2,14	0,256	1,53	0,73	3,22
*104:01:01	8	1,62	7	1,15	0,505	1,41	0,51	3,92
*13:01:01	21	4,25	18	2,96	0,249	1,46	0,77	2,76
*138:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80
*14:01:01	16	3,24	15	2,47	0,441	1,32	0,65	2,70
*15:01:01	5	1,01	5	0,82	0,741	1,23	0,35	4,28
*16:01:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80
*17:01:01	5	1,01	14	2,30	0,102	0,43	0,16	1,21

*19:01:01	3	0,61	1	0,16	0,224	3,71	0,38	35,77
*23:01:01	4	0,81	15	2,47	0,036	0,32	0,11	0,98

Informațiile genotipării obținute prin secvențierea de nouă generație au permis evaluarea amănunțită a celor 23 de variantele alelice aparținând genei HLA-DQA1 (Tabel 5.6). HLA-DQA1*01:02:01 a fost asociată ca fiind o genă de protecție ($p < 0,001$; OR = 0,42), în contrast HLA-DQA1*01:02:02 ($p = 0,002$; OD = 1,71) sugerează o potențială asociere de risc în cazul infecției cronice cu VHB. HLA-DQA1*01:03:01 conferă potențială protecție ($p = 0,002$; OD = 0,44), în schimb varianta alelică HLA-DQA1*01:01:02 ($p = 0,042$, OD = 2,5) s-a corelat cu susceptibilitatea la infecția cu VHB.

Tabel 5.6. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-DQA1 în lotul de pacienți și în lotul control

<i>HLA-DQA1</i>	Lot pacienți		Lot control		<i>p</i>	OR	95% CI	
	(2n = 494)		(2n = 608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:01:01	46	9,31	43	7,07	0,175	1,35	0,87	2,08
*01:01:02	14	2,83	7	1,15	0,042	2,50	1,00	6,25
*01:02:01	23	4,66	63	10,36	0,000	0,42	0,26	0,69
*01:02:02	84	17,00	65	10,69	0,002	1,71	1,21	2,42
*01:03:01	20	4,05	53	8,72	0,002	0,44	0,26	0,75
*01:04:01	18	3,64	23	3,78	0,903	0,96	0,51	1,80
*01:04:02	11	2,23	7	1,15	0,161	1,96	0,75	5,08
*01:05:01	7	1,42	12	1,97	0,480	0,71	0,28	1,83
*02:01:01	36	7,29	54	8,88	0,337	0,81	0,52	1,25
*03:01:01	24	4,86	38	6,25	0,319	0,77	0,45	1,30
*03:03:01	13	2,63	10	1,64	0,254	1,62	0,70	3,72
*04:01:01	5	1,01	8	1,32	0,642	0,77	0,25	2,36
*05:01:01	72	14,57	68	11,18	0,093	1,35	0,95	1,93
*05:05:01	116	23,48	146	24,01	0,837	0,97	0,73	1,28
*06:01:01	1	0,20	2	0,33	0,689	0,61	0,06	6,80

În evaluarea asocierii polimorfismelor genetice am identificat, la nivel de rezoluție înaltă, 22 de variante alelice ale genei DQB1 (Tabel 5.7). Asocierile semnificative ținând cont de valoarea p au fost reprezentate de HLA-DQB1*05:02:01 ($p = 0,003$), fiind o posibilă alelă de risc. La limita semnificației statistice s-a evidențiat varianta HLA-DQB1*05:01:01 ($p = 0,069$) cu posibilă implicare în riscul infecției cu VHB (OD = 1,41; 95% CI = 0,97 - 2,04). S-au remarcat două variante alelice ca având o asociere puternic semnificativă statistic cu efectul de protecție: HLA-DQB1*06:02:01 ($p < 0,001$; OD = 0,21; 95% CI = 0,09 - 0,47) și HLA-DQB1*06:03:01 ($p < 0,001$; OD = 0,21; 95% CI = 0,09 - 0,47).

Tabel 5.7. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-DQB1 în lotul de pacienți și în lotul control

HLA-DQB1	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n = 494)		(2n = 608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*02:01:01	72	14,57	68	11,18	0,093	1,35	0,95	1,93
*02:02:01	27	5,47	41	6,74	0,381	0,80	0,48	1,32
*03:01:01	127	25,71	153	25,16	0,837	1,03	0,78	1,35
*03:02:01	25	5,06	40	6,58	0,287	0,76	0,45	1,27
*03:03:02	9	1,82	17	2,80	0,289	0,65	0,29	1,46
*03:04:01	3	0,61	3	0,49	0,798	1,23	0,25	6,13
*04:02:01	5	1,01	11	1,81	0,271	0,55	0,19	1,61
*05:01:01	67	13,56	61	10,03	0,069	1,41	0,97	2,04
*05:02:01	87	17,61	69	11,35	0,003	1,67	1,19	2,35
*05:03:01	32	6,48	33	5,43	0,462	1,21	0,73	1,99
*06:01:01	11	2,23	10	1,64	0,482	1,36	0,57	3,23
*06:02:01	7	1,42	39	6,41	<0,001	0,21	0,09	0,47
*06:03:01	8	1,62	45	7,40	<0,001	0,21	0,09	0,44
*06:04:01	6	1,21	12	1,97	0,323	0,61	0,23	1,64
*06:09:01	1	0,20	3	0,49	0,424	0,41	0,04	3,94

Gena HLA-DRB1 a prezentat o mare diversitate fiind identificate 42 de variante alelice (Tabel 5.8) și au fost identificate a patru alele specifice cu efect de risc în cu infecția cu VHB, HLA-DRB1*01:02:01, HLA-DRB1*04:07:01, HLA-DRB1*16:01:01 HLA-DRB1*16:01:01 și 3 variante genetice cu rol de protecție HLA-DRB1*04:02:01, HLA-DRB1*13:01:01, HLA-DRB1* 15:01:01. Alte trei alele pot sugera un potențial rol în protecție, HLA-DRB1*13:01:01 ($p < 0,001$; OD = 0,23; 95% CI = 0,11 - 0,5) și HLA-DRB1*15:01:01 ($p = 0,001$; OD = 0,38; 95% CI = 0,21 – 0,68) și DRB1*01:02:01 ($p = 0,042$; OD = 2,5; 95% CI = 1,0 – 6,25).

Tabel 5.8. Polimorfismul genetic al alelelor HLA-DRB1 în lotul de pacienți și în lotul control

HLA- DRB1	Lot pacienți		Lot control		p	OR	95% CI	
	(2n=494)		(2n=608)				Inferior	Superior
	Total	%	Total	%				
*01:01:01	47	9,51	43	7,07	0,141	1,38	0,90	2,13
*01:02:01	14	2,83	7	1,15	0,042	2,50	1,00	6,25
*03:01:01	69	13,97	67	11,02	0,139	1,31	0,92	1,88
*04:01:01	6	1,21	10	1,64	0,553	0,74	0,27	2,04
*04:02:01	3	0,61	11	1,81	0,076	0,33	0,09	1,20
*04:03:01	7	1,42	7	1,15	0,695	1,23	0,43	3,54
*04:04:01	10	2,02	8	1,32	0,356	1,55	0,61	3,96
*04:05:01	5	1,01	5	0,82	0,741	1,23	0,35	4,28
*04:07:01	5	1,01	1	0,16	0,057	6,21	0,72	53,30
*04:08:01	2	0,40	4	0,66	0,570	0,61	0,11	3,37
*07:01:01	36	7,29	54	8,88	0,337	0,81	0,52	1,25
*08:01:01	5	1,01	9	1,48	0,490	0,68	0,23	2,04
*10:01:01	7	1,42	12	1,97	0,480	0,71	0,28	1,83
*11:01:01	44	8,91	49	8,06	0,615	1,12	0,73	1,71
*11:03:01	2	0,40	7	1,15	0,171	0,35	0,07	1,69
*11:04:01	51	10,32	68	11,18	0,647	0,91	0,62	1,34
*12:01:01	14	2,83	14	2,30	0,577	1,24	0,58	2,62

*12:02:01	1	0,20	1	0,16	0,883	1,23	0,08	19,74
*13:01:01	8	1,62	40	6,58	<0,001	0,23	0,11	0,50
*13:02:01	7	1,42	17	2,80	0,119	0,50	0,21	1,21
*13:03:01	6	1,21	9	1,48	0,705	0,82	0,29	2,31
*14:01:01	5	1,01	3	0,49	0,313	2,06	0,49	8,67
*14:04:01	11	2,23	7	1,15	0,161	1,96	0,75	5,08
*14:54:01	13	2,63	21	3,45	0,432	0,76	0,37	1,52
*15:01:01	16	3,24	49	8,06	0,001	0,38	0,21	0,68
*15:02:01	14	2,83	13	2,14	0,457	1,33	0,62	2,87
*16:01:01	73	14,78	57	9,38	0,006	1,68	1,16	2,42
*16:02:01	7	1,42	3	0,49	0,108	2,90	0,75	11,27

Genele HLA-DRB3/4/5, deși variabilitatea este mult mai mică și prezența lor este dependentă de HLA-DRB1, în investigarea rolului imunologic, au fost găsite corelații semnificative statistic. Astfel, au fost determinate 9 variante alelice pentru HLA-DRB3, dintre acestea cu impact semnificativ în asocierea cu posibil efect de risc în infecția cu VHB a fost HLA-DRB3*02:02:01 ($p = 0,010$; OD = 1,59; 95% CI = 1,12 – 2,27), iar varianta HLA-DRB3*01:01:02 ($p = 0,023$, OD = 0,64; 95% CI = 1,12 – 2,27). La polul opus s-a aflat HLA-DRB4 pentru care deși au fost identificate 5 variante alelice diferite, niciuna nu a avut semnificație statistică. În cazul genei HLA-DRB5 au fost determinate un număr total de 5 variante alelice, iar o corelație pozitivă a fost reprezentată de HLA-DRB5*01:01:01 ($p < 0,001$; OD = 0,28; 95% CI = 0,15 – 0,52) prezența acestei alele fiind mai mare în lotul în care au fost incluși subiecți fără infecție cu VHB, iar varianta genetică HLA-DRB5*02:02:01 ($p = 0,004$; OD = 2,22; 95% CI = 1,29 – 3,82) s-a evidențiat ca având o relevanță statistică în riscul de infecție cu VHB.

Caracterizarea alelelor rare întâlnite în cohorta de studiu folosind secvențierea de nouă generație

Acuratețea genotipării rezultatelor prin secvențierea de nouă generație a permis caracterizarea diversității genelor HLA și profunzimea polimorfismelor de la nivelul exonilor, dar și a intronilor pentru înțelegerea mecanismelor moleculare în genetica populației, dar și asocierea cu diverse infecții virale. Majoritatea studiilor au analizat asocierile dintre alelele comune și bine documentate, atât în transplat cât și în asocierea

diferitelor patologii. O altă abordare a prezentului studiu s-a focusat pe identificarea corectă a alelelor rare, care spre deosebire de încadrarea ca alelă comună, adică acea alelă a fost identificată de cel puțin 3 ori în 3 populații diferite, iar termenul de „bine documentate” face referire la raportarea de cel puțin 5 apariții în aceeași populație, dar la nivelul persoanelor neînrudite, caracterizarea alelelor rare în populația românească permite înțelegerea mecanismelor imunologice. Astfel au fost identificate următoarele alele rare: HLA-A*03:20, HLA-A*02:436, HLA-A*11:327, HLA-A*26:15, HLA-B*35:370, HLA-B*35:109, HLA-C*04:29, HLA-DPB1*519:01, HLA-DPB1*650:01

Diversitatea genetică și testarea ipotezei avantajului heterozigozității genelor HLA

Pentru evaluarea distribuției diversității HLA și testarea efectului avantajului heterozigot, au fost analizați 327 de pacienți cu infecție cronică VHB denumit lot pacienți și un număr de 304 subiecți sănătoși reprezentând lotul control. Homozigozitatea a fost definită ca prezența a două variante alelice identice pentru o genă HLA, iar persoanele care posedă două variante alelice diferite ale aceleiași gene au fost încadrate ca fiind heterozigote

În evaluarea impactului zigozității HLA-A au fost luate în considerare variantele alelice care au avut o frecvență mai mare de 2%. Genotipul heterozigot pentru HLA-A*25:01:01 ($p = 0,011$; $OD = 0,37$; $95\% \text{ CI} = 0,17-0,83$) oferă un avantaj semnificativ referitor la rolul de protecție. Homozigozitatea pentru HLA-A*01:01:01 a fost asociată negativ cu probabilitatea de protecție ($p = 0,033$; $OD = 2,35$; $95\% \text{ CI} = 1,06 - 5,2$).

O potențială corelație pozitivă în ceea ce privește protecția împotriva infecției cu VHB este sugerată de heterozigozitatea variantelor alelice care s-au apropiat de limita semnificației statistice HLA-B*07:02:01 ($p = 0,058$; $OD = 0,57$; $95\% \text{ CI} = 0,32-1,03$), HLA-B*58:01:01 ($p = 0,057$; $OD = 0,34$; $95\% \text{ CI} = 0,11-1,09$) și HLA-B*40:01:02 ($p = 0,069$; $OD = 0,32$; $95\% \text{ CI} = 0,09-1,17$). În analiza efectului homozigozității o singură variantă alelică a fost semnificativă statistic HLA-B*18:01:01 ($p = 0,001$; $OD = 0,15$; $95\% \text{ CI} = 0,05-0,47$) fiind clasificată ca o potențială alelă de protecție. Datele examinate la nivelul genotipării HLA-DPB1 sugerează că heterozigozitatea pentru HLA-DPB1*09:01:01 oferă o implicație importantă în protecția împotriva VHB ($p = 0,036$; $OD = 0,27$; $95\% \text{ CI} = 0,07-1,0$), cât și pentru HLA-DPB1*23:01:01 ($p = 0,056$; $OD = 0,42$; $95\% \text{ CI} = 0,17 - 1,05$), aceste două variante alelice nu a fost prezente la indivizii homozigoți. Referitor la efectul heterozigot al variantei alelice HLA-DQB1*06:02:01 și HLA-DQB1*06:03:01, aceste variante au fost corelate pozitiv cu protecția.

Asocierea genotipării HLA cu răspunsul virusologic în hepatita cronică cu VHB

În identificarea variațiilor genetice HLA implicate în replicarea virală am analizat 204 pacienți cronici cu VHB care au fost împărțiți în două mari categorii în funcție de valorile viremiei, astfel 28 de pacienți au fost incluși în grupul cu ADN VHB < 2000 UI/mL și 176 pacienți în grupul cu ADN VHB $\geq$ 2000 UI/mL și fără tratament antiviral. S-a constatat că două variante alelice HLA au fost corelate negativ cu niveluri scăzute de ADN VHB, cum ar fi HLA-A*02:01:01 ($p = 0,060$), această alelă a fost prezentă la 40,74% dintre pacienții cu viremie scăzută, iar varianta alelică HLA-B*18:01:01 ($p = 0,0417$) a fost identificată la 29,63% din pacienți. În ceea ce privește HLA-DQB1*05:02:01, s-a observat că 38,98% dintre pacienți au prezentat nivel crescut de ADN VHB ($p = 0,014$). HLA-DRB1*16:01:01 și HLA-DRB5*02:02:01 s-au dovedit a fi corelate pozitiv cu prezența unui nivel crescut de ADN VHB la pacienții studiați.

Concluzii și contribuții personale

Cercetările din prezenta lucrare s-au focusat pe caracterizarea moleculară a profilului genetic HLA al pacienților cu infecție cronică cu virusul hepatitic B utilizând secvențierea de nouă generație oferind informații cuprinzătoare despre natura extrem de polimorfă a regiunii HLA. Astfel, provocarea de a identifica cu precizie și acuratețe genele HLA, chiar și variantele alelice rare și cele al căror polimorfism se află în afara exonului 2 și 3, aduc o valoare în înțelegerea variației biologice a sistemului HLA și a răspunsului imun, fiind prima cercetare pe populația românească care a abordat genotiparea HLA de rezoluție înaltă în contextul infecție cronice cu VHB.

Investigațiile realizate în cadrul prezentei teze au fost structurate și parcurse în etape esențiale, fiecare dintre acestea având rol bine definit în îndeplinirea obiectivelor.

Analiza implicării genotipurilor specifice HLA în infecția cronică cu VHB a evidențiat rezultate semnificative statistic, astfel au fost identificate alele puternic asociate cu riscul de infecție cronică cu VHB. Genele de clasa I prezintă un polimorfism mai redus spre deosebire de genele care aparțin clasei a II-a, astfel singura variantă alelică implicată în infecția cronică cu VHB a fost HLA-A*24:02:01.

Variantele alelice ale genei HLA-DQ au fost prezentat o asociere pozitivă cu susceptibilitatea la infecția cronică cu VHB, iar alelele cele mai importante din punct de vedere statistic au fost HLA-DQA1*01:01:02, HLA-DQA1*01:02:02 și HLA-

DQB1*05:02:01. O observație foarte importantă aduce în prim plan utilitatea tehnologiei NGS care a permis maparea completă a alinamentului tuturor secvențelor de nucleotide și putând diferenția modificările de la nivelul secvenței de proteine. Cele două variante aparținând grupului alelic DQA1*01 prezintă diferențe cu impact asupra funcției proteinei (acid glutamic pentru DQA1*01:01:02 și glutamină pentru DQA1*01:02:02).

Polimorfismele genei HLA-DR au o semnătură moleculară și influențează răspunsul imun, iar genotipurile HLA-DRB1*16:01:01, HLA-DRB3*02:02:01 și HLA-DRB5*02:02:01 s-au dovedit a fi implicate în riscul infecției cronice cu VHB. Prezența variantei genetice HLA-DPA1*02:01:04 a fost corelată semnificativ cu riscul infecției cronice cu VHB. Compararea genelor HLA în cadrul pacienților cu infecție cronică cu VHB și cei grupul sănătos fără prezența infecției cu VHB evidențiază rolul protector al variantelor alelice aparținând genelor HLA de clasa I, și anume HLA-B*15:01:01, HLA-B*18:01:01, HLA-C*03:04:01.

O asociere genetică importantă în controlul imunologic în infecția cu VHB a fost reprezentată de polimorfismul genei HLA-DR, mai exact alelele HLA-DRB1*13:01:01, HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB3*01:01:02 și HLA-DRB5*01:01:01 au fost corelate negativ, rolul lor fiind unul protector în ceea ce privește infecția cu VHB.

Importanță semnificativă statistic asupra rolului protector a fost reprezentată de patru variante alelice ale genei HLA-DQ, mai exact HLA-DQA1*01:02:01, HLA-DQA1*01:03:01, HLA-DQB1*06:02:01, HLA-DQB1*06:03:01, dar și de două alele ale genei HLA-DP și anume HLA-DPB1*09:01:01 și HLA-DPB1*23:01:01. Utilizarea tehnologiei NGS a evidențiat importanța identificării cu precizie a alelelor HLA și la nivelul mutațiilor sinonime, astfel dacă alela HLA-DQA1*01:02:01 a fost încadrată ca o alelă de risc în infecția cronică cu VHB, la polul opus alela HLA-DQA1*01:02:02 are rol de protecție împotriva VHB, deși diferența dintre cele două alele nu produce modificări la nivelul secvenței de proteine, SNP-ul dintre cele două alele ducând la codificarea aceluiași aminoacid izoleucina.

Evaluarea rezultatelor prezentului studiu aduce o nouă perspectivă în impactului zigoității genelor HLA. Genotipurile heterozigote pentru HLA-A*25:01:01, HLA-B*07:02:01, HLA-B*58:01:01, HLA-B*40:01:02, HLA-DPB1*09:01:01, HLA-DPB1*23:01:01, HLA-DQA1*01:02:01, HLA-DQB1*06:02:01, HLA-DQB1*06:03:01, HLA-DRB5*01:01:01 au confirmat teoria avantajului heterozigoității, prezentând semnificații importante în rolul de protecție împotriva infecției cu VHB. Genotipurile homozigote pentru HLA-A*24:02:01, HLA-DQA1*01:02:02, HLA-DQB1*05:01:01,

HLA-DQB1*05:02:01 au o relevanță semnificativă în riscul infecției cronice cu VHB.

În contextul asocierii dintre genele HLA și replicarea virală o relevanță importantă referitoare la nivelurile crescute de încărcătura virală, patru variante alelice HLA-DQA1*01:02:02, HLA-DQB1*05:02:01, HLA-DRB1*16:01:01, HLA-DRB5*02:02:01 au fost semnificativ asociate. Dimpotrivă, nivelurile scăzute de ADN VHB au fost raportate ca fiind corelate cu HLA-A*02:01:01 și HLA-B*18:01:01.

Stratificarea pacienților pe baza prezenței/absenței steatozei hepatice a contribuit la variabilitatea fenotipică a bolii, astfel ca factor genetic de risc cu prezența steatozei la pacienții cu infecție cronică cu VHB s-a identificat alela HLA-B*08:01:01, HLA-C*07:01:01 și HLA-DRB3*01:01:02, iar HLA-A*03:01:01, HLA-A*26:01:01 s-au asociat pozitiv cu absența steatozei.

Rezultatele obținute în prezenta lucrare subliniază importanța complexității mecanismului prin care genelor HLA influențează răspunsul imun în infecția cronică cu virusul hepatitic B, iar conturarea unui profil imunologic complet va determina semnătura genetică HLA ținând cont de caracteristicile particulare ale fiecărei persoane. Încorporarea rezultatelor despre polimorfismul genetic HLA alături de biomarkerii actuali utilizați în managementul infecției cu VHB va crea noi oportunități în dezvoltarea, optimizarea țințelor teapeutice și a unui management multidisciplinar integrat.

Bibliografie selectivă

1. Razavi-Shearer DM, Gamkrelidze I, Pan CQ, Jia J, Berg T, Gray RT, et al. Global prevalence, cascade of care, and prophylaxis coverage of hepatitis B in 2022: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023 Oct;8:879–907.
2. Voiculescu M, Iliescu L, Ionescu C, Micu L, Ismail G, Zilisteanu D, et al. A cross-sectional epidemiological study of HBV, HCV, HDV and HEV prevalence in the SubCarpathian and South-Eastern regions of Romania. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2010;19:43–8.
3. Popovici O, Radu R, Romaniuc A, Azoică D. A seroprevalence study for hepatitis B virus markers of infection in pregnant women in romania: Results and opportunities for prevention. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2018 Jun;27:133–7.
4. Gourraud PA, Khankhanian P, Cereb N, Yang SY, Feolo M, Maiers M, et al. HLA diversity in the 1000 genomes dataset. *PLoS One*. 2014 Jul;9.

5. <https://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> [Internet]. HLA Alleles Numbers.
6. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Internet]. Hepatitis B.
7. https://insp.gov.ro/download/analiza-rezultatelor-studiului-sero-epidemiologic-de-prevalenta-pentru-markeri-de-infecție-cu-virus-hepatitic-b-si-virus-hepatitic-c_2022-2023/ [Internet]. Institutul Național de Sănătate Publică.
8. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Med Virol*. 2006 Oct;78:1276–83.
9. Asim M, Sarma MP, Kar P. Etiological and molecular profile of hepatocellular cancer from India. *Int J Cancer*. 2013 Jul;133:437–45.
10. Constantinescu I, Nedelcu F, Toader MA, Daniela V. Clinical and therapeutical importance of HBV genotyping in Romania. *J Med Life*. 2008;1:165–73.
11. Sultana C, Casian M, Oprea C, Ianache I, Grancea C, Chiriac D, et al. Hepatitis B Virus Genotypes and Antiviral Resistance Mutations in Romanian HIV-HBV Co-Infected Patients. *Medicina (Lithuania)*. 2022 Apr;58.
12. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 325–39.
13. https://hla.alleles.org/nomenclature/nomenc_reports.html [Internet]. Nomenclature for Factors of the HLA System.
14. FitzGerald JD, Dalbeth N, Mikuls T, Brignardello-Petersen R, Guyatt G, Abeles AM, et al. 2020 American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout. *Arthritis and Rheumatology*. 2020 Jun;72:879–95.

Lista cu lucrările științifice publicate

Tălăngescu A, Calenic B, Mihăilescu DF, Tizu M, Maruțelu I, Constantinescu AE, Constantinescu I, *Molecular Analysis of HLA Genes in Romanian Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection*, *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(2), 1064-1077, factor de impact– 3,1/2024
<https://doi.org/10.3390/cimb46020067>

Tălăngescu A, Tizu M, Calenic B, Mihăilescu DF, Constantinescu AE, Constantinescu I, *HLA Genetic Diversity and Chronic Hepatitis B Virus Infection:*

Effect of Heterozygosity Advantage, Medical Sciences, 2024, 12(3):44

<https://doi.org/10.3390/medsci12030044>

Tălăngescu A, Bratei AA, Tizu M, Calenic B, Constantinescu AE, Constantinescu I, *High-resolution genotyping of HLA alleles and association with genetic background of virological response in chronic hepatitis B*, Clinical Laboratory, 250119-07/2025 acceptat spre publicare, factor de impact – 0,7/2025