



**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ СТАРА ЗАГОРА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Катедра по Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика

**Проучване на генетично-регулаторни механизми,
включващи промоторни полиморфизми на цитокинови
гени върху имунния отговор при имуно-медицирани
болести**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на ОНС „Доктор“

Научна специалност: „Молекулярна биология“
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Област на висше образование 4. Природни науки, математика и
информатика

на

Антония Антонова Григорова

Научен ръководител:
Проф.Спаска Станилова, дбн

Стара Загора, 2024

Дисертационният труд съдържа 174 стандартни машинописни страници и е онагледен с 30 таблици и 19 фигури. Цитирани са 331 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита на разширено заседание на катедрен съвет на Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински факултет при Тракийски университет - Стара Загора.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в Академична зала на Медицински факултет, Стара Загора пред научно жури в състав:

Проф. д-р Виктория Степан Сарафян-Озанян, дм, дмн

Проф. Милена Атанасова Атанасова-Радева, дб

Проф. д-р Ирена Манолова Манолова-Василева, дм

Доц. Мария Христова Казакова-Велинова, дб

Доц. Люба Динева Митева, дб

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Тракийски университет – Стара Загора и са на разположение в канцеларията на „Научен отдел“ на Медицински факултет – Стара Загора.

Съдържание

Въведение.....	5
Цел и задачи.....	7
Материали и методи.....	7
Резултати.....	10
Дискусия.....	36
Изводи.....	44
Приноси.....	45
Публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд.....	46
Научно-изследователски проекти във връзка с дисертационния труд.....	47
Резюме на английски език.....	48
Библиография.....	50

Списък на най-често използваните съкращения:

На кирилица:

95% CI – 95% доверителен интервал

КРК – колоректален карцином

МС – мултиплена склероза

ПРМС (RRMS) – Пристъпно-ремитентна мултиплена склероза

На латиница:

ARMS-PCR - Amplification refractory mutation system-PCR

bp – base pair

DMT - disease modifying therapy

EAE – автоимунен енцефаломиелит

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

GA - глатирамер ацетат

IFN- β - интерферон – бета

IL – интерлевкин

MAPK – митоген-активирана протеин киназа

NF- κ B - Nuclear Factor kappa B

NK клетки - естествени клетки убийци

OR - odds ratio

PCR - Polymerase Chain Reaction

PIRA-PCR - Primer-introduced restriction analysis-PCR

RFLP-PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR

SD- standard deviation

SNP - single nucleotide polymorphism

STAT - Signal Transducers and Activators of Transcription

TGFB β 2, T β RII, - TGF- β рецептор II

TGF- β - Transforming growth factor beta

Th – Т-хелперни клетки

TNF - tumor necrosis factor

Tregs – Т регулаторни клетки

Въведение

Имуно-медираните заболявания обхващат широк спектър от хронични и комплексни заболявания, които се характеризират с нарушена регулация на нормалния имунен отговор, водеща до хронично възпаление в целевите органи и системи и много съпътстващи заболявания.

Регулацията на имунния отговор е резултат от комплексното взаимодействие директно между имунокомпетентните клетки или посредством цитокиновите молекули. Добре известно е, че в развитието на автоимунните и алергични заболявания участва дисрегулацията на цитокиновия синтез по време и място на развитието на имунния отговор. В последните години се натрупаха данни, че нарушенията в баланса на цитокините имат съществена роля в развитието на злокачествените заболявания. Два от тези цитокини, които са с антагонистични биологични функции са трансформиращият растежен фактор бета-1 ($TGF-\beta 1$) и интерлевкин-18 (IL-18). $TGF-\beta 1$ е антиинфламаторен цитокин и има централна роля в регулацията на имунния отговор и поддържане на имунологичната хомеостаза като потиска антигенната презентация, Т и В клетъчната пролиферация и противодейства на проинфламаторните цитокини. $TGF-\beta 1$ е регулаторен цитокин участващ в баланса между Т регулаторни клетки (Tregs) и Th17 клетки.

IL-18 е проинфламаторен цитокин, който се продуцира главно от макрофаги и основната му функция се медира чрез индуциране на секреция на интерферон-гама ($IFN-\gamma$) от Т (Th1) хелперни клетки. IL-18 може да модулира както вродения, така и придобития имунитет и неговата дисрегулация участва в патогенезата на автоимунни или хронични възпалителни заболявания. Повишени нива на IL-18 са установени, при редица автоимунни заболявания като множествена склероза (МС), което определя клиничната значимост на цитокина.

Имунният отговор на всеки индивид към даден антиген е различен и зависи от много фактори като един от тях е генотипът на индивида. Гените за цитокини и за техните рецептори са известни като високо полиморфни гени. Повечето от описаните полиморфизми са еднонуклеотидни полиморфизма (SNPs), намиращи се в белтък некодирани области на гените и могат да повлияят степента на генна експресия и съответното количество синтезиран белтъчен продукт. Следователно полиморфизмите в цитокиновите гени и техните рецептори са потенциална причина за цитокиновия дисбаланс и много проучвания изследват тяхната асоциация с предиспозицията към редица имуно-медиранни болести. С акцент върху баланса между про- и анти- инфламаторните цитокини от съществено значение са промоторните полиморфизми както в *TGFB1* гена и неговия рецептор *TGFB2*, така и в *IL-18* гена, които

имат потенциал да повлияват тежестта и предразположението към различни имуно-медиирани болести, включително автоимунни и онкологични.

Няколко полиморфизма са установени в промоторната област на *TGFB1* гена, като един от тях е промоторния -509C/T полиморфизъм (rs1800469), който е асоцииран с предразположение към онкологични заболявания и МС при жени. Проучванията показват, че този SNP повлиява транскрипционната активност на *TGFB1*, както и нивата на цитокина. TGF- β 1 с неговият рецептор TGFBR2 са ключови компоненти на TGF- β 1 сигналния път, като играят централна роля в имунния толеранс. В промоторната област на *TGFBR2* е установен SNP - 875G/A *TGFBR2* (rs3087465), за който има данни, че повлиява транскрипционната активност в нормални епителни клетки. Редица автори съобщават за асоциация на двата полиморфизма при различни видове рак, но данните не са еднозначни.

В промоторният регион на гена *IL18* са описани няколко SNPs, един от които е -607C/A полиморфизма (rs1946518). Тази едно-нуклеотидна субституция, нарушава мястото за свързване с cAMP responsive element-binding protein (CREB), което повлиява транскрипцията на *IL18* и променя нивото на продукция на самия цитокин. Някои автори са изследвали влиянието на известните полиморфизми в промотора на *IL18* върху серумните нива на цитокина и връзката с развитието и хода на МС в различни популации, но все още няма категорични данни посочващи конкретен полиморфизъм обвързан с нивата на експресия на цитокина и предразположението и хода на МС.

Данните в научната литература за тези SNPs по отношение на функционалния им ефект върху серумните нива на изследваните цитокини, както и тяхната асоциация към генетичната предразположеност и тежест към имуно-медиираните болести като множествена склероза и колоректален карцином са противоречиви и оскъдни, което насочи и нашият изследователски интереси на настоящия дисертационен труд.

Цел и задачи

Цел: Проучване ефекта на промоторни полиморфизми в *TGFB1*, неговият рецептор *TGFBR2* и *IL18* върху серумните цитокинови концентрации и генетичното предразположение към имуномедиирани заболявания.

Задачи:

1. Генотипизиране на група пациенти с пристъпно-ремитентна мултиплена склероза (ПРМС) и съответната контролна група здрави контроли на еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs) в промоторните области:
 - на позиция -509C/T в *TGFB1* гена (rs1800469)
 - на позиция -875G/A в *TGFBR2* гена (rs3087465)
 - на позиция -607C/A в *IL18* гена (rs1946518)
2. Генотипизиране на група пациенти с колоректален карцином (КРК) и съответната контролна група здрави контроли по SNP -875G/A в *TGFBR2* гена (rs3087465).
3. Изследване асоциацията на:
 - *TGFB1* -509C/T, *TGFBR2* -875G/A и *IL18* -607C/A SNPs с генетичното предразположение и начална проява на ПРМС;
 - комбинативния ефект от двата полиморфизма *TGFB1* -509C/T и *TGFBR2* -875G/A върху предразположението от ПРМС;
 - *TGFBR2* -875G/A SNP върху тежестта на КРК.
4. Количествено определяне на серумните концентрации на цитокините TGF- β и IL-18 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.
5. Изследване асоциацията на промоторните полиморфизми върху серумните нива на съответните цитокини при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

Материали и методи

1. Пациенти

В настоящото изследване са включени 183 пациенти с пристъпно – ремитентна множествена склероза, диагностицирани и описани по критериите на McDonald (2010) от проф. д-р Анастасия Тренова, дмн катедрата по Неврология, Медицински Университет, гр. Пловдив за периода 2014 – 2019 год. Средната възраст на пациентите с ПРМС е 40.50 ± 9.01 години, като от тях 132 (72.1%) са жените и 51 (27.9%) - мъжете.

Също така са изследвани и 184 хистологично потвърдени пациенти с колоректален карцином (КРК), които са оперирани в УМБАЛ “Проф. Д-р Стоян Киркович” АД и МБАЛ Тракия, гр. Стара Загора между 2011-2017 год. със съдействието на доц. д-р Нойко Станилов, дм. Диагнозата е поставена чрез използване на стандартни клинични, лабораторни, ендоскопски, хистопатологични и радиологични критерии.

В проучването са включени и 307 клинично здрави контроли на средна възраст 42.28 ± 13.28 години, която включва 240 (78.2%) жени и 67 (21.8%) мъже.

2. Методи

2.1. Изолиране на ДНК от кръв на пациенти с ПРМС, КРК и здравите индивиди.

В настоящото изследване са използвани няколко метода за изолиране на ДНК от венозна кръв:

- чрез изсолване на белтъци по метода на Miller et al., 1988;
- чрез изолиране с 5% челекс;
- чрез колонна хроматография бяха използвани търговски китове Gene Matrix Purification Kit (EURx, Poland);

2.2. Генотипиране на едно-нуклеотиден полиморфизъм (SNP) -509C/T в промоторната област *TGFB1* гена.

За генотипизирането на -509C/T *TGFB1* (rs1800469) SNP беше използван метод на полимеразно верижна реакция, с последваща рестриктазна реакция по дължината на полиморфизма (PCR - RFLP - polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay).

2.3. Генотипиране на SNP -875G/A в промотора на гена за *TGFBR2* гена.

Определяне на промоторния полиморфизъм на позиция -875G/A в *TGFBR2* гена, беше осъществено чрез PCR, използващ праймер въведен рестрикционен анализ (PIRA-PCR - primer-introduced restriction analysis).

2.4. Генотипиране на SNP -607C/A в промоторната област на *IL-18* гена.

За определяне на едно-нуклеотиден полиморфизъм -607G/A в промоторната област на *IL-18* гена беше използван методът алел специфичен PCR или PCR използващ мутационна система рефлектираща върху амплификацията (ARMS-PCR - amplification refractory mutation system).

За провеждането на полимеразно верижната реакция с цел ензимно размножаване (амплификация) на желаните фрагменти, съдържащи полиморфното място в гените за *TGF-β1*, *TGFB2* и *IL-18*, беше използван апарат GeneAmp PCR System 9700 от Applied Biosystems. Използваните реактиви бяха производство на Thermo Fisher Scientific (USA) and Metabion GmbH (Germany). Конкретните температурни условия на PCR реакции са представени в таблица 1, а секвенциите на използваните праймерите и големината на амплификационните продукти за всеки един от изследваните полиморфизми в таблица 2.

Таблица 1. Температурни условия на PCR реакции.

SNP	Преамплификационна денатурация	Денатурация	Хибридизация	Амплификация	Финална елонгация
-509C/T в <i>TGFB1</i>	94°C за 3 min	94°C за 45 sec	63.3°C за 45sec	72°C за 45sec	72°C за 7min
30 цикъла					
-875G/A в <i>TGFB2</i>	94°C за 5 min	94°C за 45 sec	57°C за 45sec	72°C за 45sec	72°C за 7min
30 цикъла					
-607C/A в <i>IL18</i>	95°C за 5 min	94°C за 30 sec	56°C за 30 sec	72°C за 45sec	72°C за 5min
35 цикъла					

Таблица 2. Секвенции на използваните праймери и големина на амплифицираните фрагменти.

Ген	SNP	Използвани праймери	Големина на фрагмента
<i>TGFB1</i>	-509C/T (rs1800469)	F: 5' – CAG TAA ATG TAT GGG GTC GCA G – 3' R: 5' – GGT GTC AGT GGG AGG AGG G-3'	153 bp
<i>TGFB2</i>	-875G/A (rs3087465)	F: 5 – GCAAGAAAGGAAATTTGAAAGTTTGT – 3' R: 5' – TCACCTGAATGCTTGTGCTTTT – 3'	124 bp
<i>IL18</i>	-607C/A (rs1946518)	Генеричин праймер – 5'-TAA CCT CAT TCA GGA CTT CC – 3' -607 C алел: 5'-GTT GCA GAA AGT GTA AAA ATT ATT <u>AC</u> – 3' -607 A алел: 5'-GTT GCA GAA AGT GTA AAA ATT ATT <u>AA</u> – 3'	196 bp

2.5. Агарозна електрофореза на ДНК фрагменти

Беше проведена агарозна електрофореза на амплификационните продукти и на рестрикционните фрагменти. Апарата, който беше използван за хоризонталната

електрофореза е произведен от Stratagene с токоизправител Stratagene Feather volt 500, при постоянен волтаж от 180V. Получените фрагменти бяха визуализирани и документирани чрез гел-документационна система със специализиран софтуер за анализ на резултатите software E.A.S.Y (Herolab GmbH Laborgeräte, Germany).

2.6. Количествено определяне на серумната концентрация на TGF- β 1 и IL-18.

Серумните концентрации на TGF- β 1 и на IL-18 бяха определени чрез количествения Ензим свързан имуносорбентен анализ (ELISA) като използвахме ELISA китове и анализът беше изработен по протоколите предоставени от фирмата производител. Използваните китове са:

- Quantikine ELISA комплекти, R&D системи, Минеаполис, Минесота, САЩ
- Human IL-18 ELISA kit, Medical & Biological Laboratories CO., LTD

Концентрацията на цитокините беше определена чрез построяване на стандартна права, като бяха използвани стандарти и контроли на производителя. Серумните нива на TGF- β 1 бяха изразени ng/ml, а на IL-18 в pg/ml. Интензитетът на цветната реакция беше измерен на ELISA ридер (Rosys Anthos 2010, Austria) при дължина на вълната 450 nm. Реакцията беше отчетена в единици оптична плътност - OD единици (optical density).

3. Статистически методи

Статистическият анализ на данните е извършен със софтуерния продукт Statistica версия 12.0, както и достъпни on-line калкулатори, StatPages.net website (<http://statpages.org/index.html>). При всички анализи, се приема $p < 0.05$ за статистическа значима разлика.

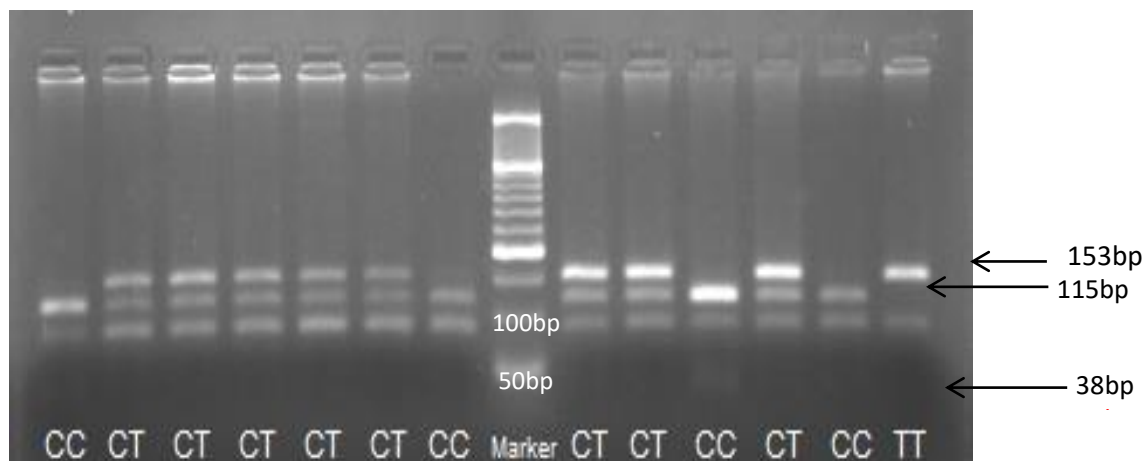
Резултати

I. Ефект на промоторни полиморфизми в цитокинови гени върху генетичното предразположение и тежест при ПРМС.

1. Генотипиране по еднуклеотидния полиморфизъм (SNP) на позиция - 509C/T в *TGFB1* гена (rs1800469).

Генотипите на пациентите и здравите контроли по промоторния полиморфизъм -509C/T в *TGFB1* гена бяха определени чрез методът PCR – RFLP. Амплификационните продукти бяха подложени на рестриктазна реакция с Eco81I на 37°C цяла нощ, като C алела се явява рестриктазно място за ензима и се получават два фрагмента - 115bp и 38bp. Наличието на T

алела не води до рестриктазна реакция, при което първоначалния PCR ампликон си остава цял - 153bp. При носителите на хетерозиготния генотип СТ-генотип се наблюдаваха три фрагмента – 153bp, 115bp и 38bp. На *фигура 1* се вижда разделянето на рестрикционните фрагменти чрез електрофореза на 3,5% агарозен гел и визуализиране с етидиев бромид.



Фигура 1: Генотипиране на промоторния полиморфизъм *TGFB1* -509C/T в агарозна гел електрофореза чрез PCR - RFLP анализ. След PCR амплификацията, продукта от 153bp беше срязан с рестрикционния ензим *Eco81I*. Молекулният маркер, който беше използван за дължина на фрагментите е през 50bp.

1.1. Генотипни и алелни честоти на едно-нуклеотидния полиморфизъм на позиция -509C/T в *TGFB1* гена (rs1800469) при пациенти с ПРМС.

Относно *TGFB1* -509C/T полиморфизма бяха успешно амплифицирани 183 пациенти с ПРМС и 307 здрави контроли. Средната възраст на пациентите е 40.50 ± 9.01 , като от тях 132 (72%) са жени и 51 (28%) - мъже. Средната възраст на контролната група е 42.28 ± 13.17 и се състои от 240 (78%) жени и 67 (22%) мъже. Не беше установена статистическа достоверна разлика между двете групи ($p=0.108$, t-test).

Разпределението на генотиповете в пациентската и контролната група не се отклоняваха от уравнението на Харди-Вайнберг и не се установи разлика между наблюдаваните и очакваните честоти ($\chi^2=0.026$, $p=0.987$ пациенти; $\chi^2=0.977$, $p=0.613$ контроли). В разпределението на генотипните честоти между двете групи не се установиха разлики ($\chi^2=2.302$, $p=0.316$). Генотипните и алелните честоти на двете групи са представени на *таблица 3*.

Таблица 3. Разпределение на генотипни и алелни честоти на *TGFB1 -509C/T (rs1800469)* полиморфизъм при пациенти с МС и здрави контроли.

Генотип <i>TGFB1 -509C/T</i> (rs 1800469)	МС пациенти n (%)	Здрави контроли n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Общо N	183 (100)	307 (100)		
CC	70 (38%)	104 (34%)	Reference	
CT	86 (47%)	142 (46%)	0.900 (0.601÷1.348)	0.609
TT	27 (15%)	61 (20%)	0.658(0.381÷1.134)	0.131
CT+TT vs. CC	113 (62%)	203 (66%)	0.827 (0.565÷1.210)	0.328
С алел	226 (62%)	350 (57%)	Reference	
Т алел	140 (38%)	264 (43%)	0.821(0.630÷1.070)	0.144

След направените анализи на разпределението на генотиповете в зависимост от пола се установи, че честота на ТТ генотипа (16% vs. 27%) и на Т-алела (37% vs. 51%) е по-ниска при мъжете от пациентската група в сравнение с тези от контролната група, съответно. Също така носителството на хомозиготния ТТ генотип се свързва със значително намален риск от ПРМС в сравнение с хомозиготността по С-алела сред мъжете (OR=0.360, 95% CI: 0.126÷1.028, p=0.05). Освен това, Т-алела е по-често срещан при мъжете с ПРМС спрямо здравите мъже и се свързва със значително протективен ефект (OR=0.576; 95% CI= 0.341÷0.974; p= 0.039), *таблица 4.*

Таблица 4. Разпределение на *TGFB1 -509C/T* полиморфизма при пациенти с ПРМС и здрави контроли, в зависимост от пола.

Генотип <i>TGFB1 -509C/T</i> (rs 1800469)	МС пациенти n (%)	Здрави контроли n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Жени N	132 (72%)	240 (78%)		
CC	49 (37%)	87 (36%)	Reference	
CT	64 (49%)	110 (46%)	1.033(0.648÷1.647)	0.891
TT	19 (14%)	43 (18%)	0.785(0.412÷1.493)	0.459
С алел	162 (61%)	284 (59%)	Reference	
Т алел	102 (39%)	196 (41%)	0.912(0.671÷1.241)	0.558
Мъже N	51 (28%)	67 (22%)		
CC	21 (41%)	17 (25%)	Reference	
CT	22 (43%)	32 (48%)	0.557(0.241÷1.288)	0.169
TT	8 (16%)	18 (27%)	0.360(0.126÷1.028)	0.053
С алел	64 (63%)	66 (49%)	Reference	
Т алел	38 (37%)	68 (51%)	0.576(0.341÷0.974)	0.039

1.2. Асоциация на промоторния -509C/T в *TGFB1* гена (rs1800469) полиморфизъм с началото на ПРМС.

За да оценим ролята на *TGFB1* -509C/T промоторния полиморфизъм във връзка с началото на заболяването, разделихме групата на пациентите на две подгрупи: пациенти с ранно начало на заболяването (< 30 години) и пациенти с късно начало на ПРМС (≥ 30 години). При анализът на разпределение по генотипове се наблюдава по-висока честота при пациентите с ранно начало на ПРМС, носители на CC генотипа (43.1%) спрямо тези с късно начало (33%). Хетерозиготният СТ генотип е по-често срещан при пациентите с късно начало (51.1%) в сравнение с пациентите с ранно начало на ПРМС (43.1%). Честотата на хомозиготния ТТ-генотип е близка в двете групи пациенти (13.8% и 15.9%). В *таблица 5* са получените резултати от разпределението на генотипите и алелите в двете подгрупи пациенти.

Таблица 5. Разпределение на генотипните и алелните честоти на *TGFB1* -509C/T полиморфизма при двете подгрупи на пациенти разделени, в зависимост от началото на ПРМС.

<i>TGFB1</i> -509C/T (rs1800469)	Ранно начало на ПРМС, n(%)	Късно начало на ПРМС, n (%)	OR (95%CI)	p-стойност
Общо N 183	95 (100)	88 (100)		
CC	41 (43.1)	29 (33)	Reference	
СТ	41 (43.1)	45 (51.1)	0.644 (0.341÷1.218)	0.175
ТТ	13 (13.8)	14 (15.9)	0.657 (0.269÷1.603)	0.354
СТ+ТТ vs. CC	54 (56.9)	59 (67)	0.647 (0.355÷1.182)	0.156
CC+СТ vs. ТТ	82 (86)	74 (84)	1.193 (0.527÷2.703)	0.672
С алел	123 (64.7)	103 (58.5)	Reference	
Т алел	67 (35.3)	73 (41.5)	0.769 (0.504÷1.173)	0.222

При сравнение на пациентите с ранно начало на ПРМС със здравите контроли установихме, че честотата на ТТ генотипа е по-ниска в сравнение с CC-генотипа (14% vs. 20%; OR=0.541 95%CI 0.269÷1.088; p=0.082). От получените резултати (*таблица 6*) се наблюдава, че С-алела е значително по-често срещан в сравнение с Т-алела при пациентите с ранно начало на ПРМС (65% и 35%). Статистическата обработка на данните показва, че носителството на Т-алела определя 1.38 пъти по-нисък риск от ранно начало на ПРМС спрямо носителството на С – алела (OR=0.722 95%CI 0.515÷1.012; p=0.058).

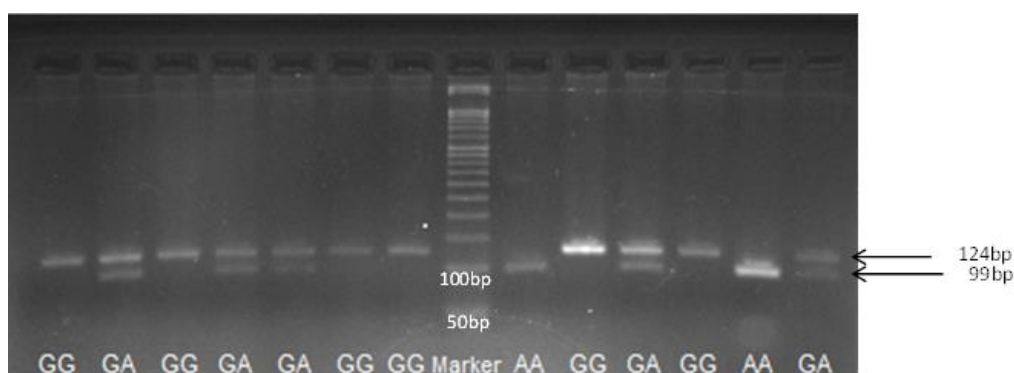
Таблица 6. Разпределение на генотипните и алелните честоти на *TGFB1* -509C/T полиморфизма при пациенти с ранно начало на ПРМС и здрави контроли.

<i>TGFB1</i> -509C/T (rs 1800469)	Ранно начало на ПРМС n(%)	Здрави контроли n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Общо (n=183)	95 (100)	307 (100)		
CC	41 (43)	104 (46)	Reference	
CT	41 (43)	142 (46)	0.732 (0.444-1.209)	0.223
TT	13 (14)	61 (20)	0.541 (0.269-1.088)	0.082
CT+TT vs. CC	54 (57)	203 (66)	0.675 (0.422-1.079)	0.100
CC+CT vs. TT	82 (86)	246 (80)	1.564 (0.818-2.992)	0.174
С алел	123 (65)	350 (57)	Reference	
Т алел	67 (35)	264 (43)	0.722 (0.515-1.012)	0.058
Жени (n=132)	62 (100)	240 (100)		
CC	25 (40)	87 (36)	Reference	
CT	27 (44)	110 (46)	0.854 (0.463-1.576)	0.614
TT	10 (16)	43 (18)	0.809 (0.357-1.836)	0.612
С алел	77 (62)	284 (59)	Reference	
Т алел	47 (38)	196 (41)	0.884 (0.589-1.327)	0.553
Мъже (n=51)	33 (100)	67 (100)		
CC	10 (30)	17 (25)	Reference	
CT	17 (52)	32 (48)	0.903 (0.340-2.401)	0.838
TT	6 (18)	18 (27)	0.567 (0.169-1.900)	0.355
С алел	37 (56)	66 (49)	Reference	
Т алел	29 (44)	68 (51)	0.761 (0.421-1.376)	0.365

2. Генотипиране по еднонуклеотидния полиморфизъм на позиция -875 G/A в *TGFB2* гена .

За определянето на генотипът на здравите контроли и пациентите по -875G/A в *TGFB2* гена беше използван праймер въведен рестрикционен анализ или PIRA-PCR (primer-introduced restriction analysis). При PIRA-PCR, с цел да се създаде изкуствено рестрикционно място по дължината на полиморфизма, се въвежда mismatch база на 2ро или 3то място от 3' края на праймера, което е в близост до полиморфното място. Съответната mismatch база е подбрана така, че при амплифициране на дивия тип (GG) да не образува рестрикционно място в ампликона. Затова при хомозиготите с GG-генотип (див тип) беше отчетен целия амплификационен продукт – 124bp. В случай, при който генотипа на вариантия алел (хомозиготи по алел А, т.е. AA генотип) се амплифицира с mismatch базата се получава ампликон, съдържащ рестрикционно място за ензима RsaI и се получават два по-малки

фрагмента 99bp и 25bp. При носителите на хетерозиготния AG-генотип се наблюдаваха три фрагмента – 124bp, 99bp и 25bp. 25bp фрагмента трудно може да се детектира при тези експериментални условия. Чрез 3.5% агарозна-гел електрофореза и визуализиране с етидиев бромид, бяха отчетени трите генотипа след успешно протеклата рестриктазна реакция (Фигура 2).



Фигура 2: 3.5% агарозна гел електрофореза от PIRA-PCR анализ за *TGFB2* -875G/A SNP

2.1. Генотипни и алелни честоти на полиморфизъм в промоторната област на позиция -875G/A в *TGFB2* гена при пациенти с мултиплена склероза.

За настоящото изследване по промоторния полиморфизъм на позиция -875G/A в *TGFB2* гена бяха използваните същите групи пациенти с ПРМС и контроли, които са типизирани и по *TGFB1*-509C/T полиморфизма.

При разпределението на генотиповете при пациентите и контролната група не се наблюдаваше отклонение от уравнението на Харди-Вайнберг, като не беше установена статистическа значима разлика между наблюдаваните и очакваните честоти ($\chi^2=2.228$, $p=0.328$; $\chi^2=0.122$, $p=0.940$). В *таблица 7* са представени резултатите, показващи разпределението на генотиповете на -875G/A полиморфизма между пациентите и контролите без значими разлики между групите ($\chi^2=2.342$, $df=2$, $p=0.31$).

Таблица 7. Разпределение по генотипни и алелни честоти на *TGFBR2* -875G/A (rs3087465) полиморфизма при здрави контроли и пациенти с ПРМС.

Генотип <i>TGFBR2</i> -875G/A (rs3087465)	Пациенти, n (%)	Здрави контроли, n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Общо N	183 (100)	307 (100)		
GG	125 (68%)	193 (63%)	Reference	
GA	49 (27%)	102 (33%)	0.742(0.493÷1.116)	0.151
AA	9 (5%)	12 (4%)	1.158(0.474÷2.829)	0.747
GA+AA vs. GG	58 (32%)	114 (37%)	0.786 (0.533÷1.158)	0.241
GG+GA vs. AA	174 (95%)	295 (96%)	0.786 (0.325÷1.904)	0.594
G алел	299 (82%)	488 (79%)	Reference	
A алел	67 (18%)	126 (21%)	0.868(0.624÷1.207)	0.399

При разпределението на генотипните и алелните честоти при пациентите и контролите, в зависимост от пола не беше установена статистическа достоверна разлика между двата пола по генотипна и алелна честота ($p=0.420$). Наблюдава се тенденция в повишаване честотата на носителите на вариантния А алел (GA+AA генотип) при мъжете спрямо жените в групата на пациентите с ПРМС, но без достигане на статистическа значимост (37% vs. 30%; $p=0.315$).

2.2. Асоциация на промоторния SNP -875G/A в *TGFBR2* гена (rs3087465) с началото на мултиплена склероза.

Разпределението на -875G/A *TGFBR2* полиморфизма беше сравнено при пациентите с мултиплена склероза разделени в две групи според началото на болестта. При сравнение на генотипните честоти се наблюдава значително повишение на хетерозиготния GA генотип при пациенти с ранно начало в сравнение с тези с късно начало на заболяването (35% vs. 18%; OR=2.461, 95% CI 1.230÷4.921, $p=0.01$). Също така се наблюдава тенденцията за повишение на носителите на вариантния А алел, (GA+AA) при пациенти с ранно начало сравнена с тези с късно начало на заболяването (40% vs. 23%; OR=2.267, 95% CI 1.188÷4.324, $p=0.012$). По отношение на алелната честота беше установена по висока честота на вариантния А алел при пациентите с начало на ПРМС преди 30 години в сравнение с тези с начало ≥ 30 години (23% vs. 14%; OR=1.853, 95% CI 1.071÷3.206, $p=0.026$). Данните са представени в *таблица 8*.

Таблица 8. Генотипно и алелно разпределение на -875G/A *TGFBR2* полиморфизма при пациенти в зависимост от началото на ПРМС.

Генотип <i>TGFBR2</i> -875G/A (rs3087465)	Ранно начало, n (%)	Късно начало, n (%)	OR (95%CI)	p-стойност
Общо N 183	95 (100)	88 (100)		
GG	57 (60%)	68 (77%)	Reference	
GA	33 (35%)	16 (18%)	2.461 (1.230÷4.921)	0.010
AA	5 (5%)	4 (5%)	1.491 (0.382÷5.816)	0.563
GA+AA vs GG	38 (40%)	20 (23%)	2.267 (1.188÷4.324)	0.012
GG+GA vs. AA	90 (95%)	20 (23%)	3.600 (0.887÷14.617)	0.059
G алел	147 (77%)	152 (86%)	Reference	
A алел	43 (23%)	24 (14%)	1.853 (1.071÷3.206)	0.026

При направения анализ на разпределение на генотипове в зависимост от пола е интересно да отбележим, че при жените с ранно начало на МС хетерозиготният генотип GA се среща по-често в сравнение с жените с късно начало на заболяването (36% vs. 17%; OR=2.654, 95%CI 0.174÷6.000, p=0.017). Също така, носителството на вариантия А алел (генотип GA+AA) се свързва със значително по-висок риск от ранно начало на МС в сравнение с хомозиготите по G-алела при жените (39% vs. 21%; OR=2.316, 95%CI 1.076÷4.983, p=0.03). Данните представени в *таблица 9* показват, че честотата на А алела е по-ниска при жените с късно начало (13%) в сравнение с жените с ранно начало на ПРМС (21%), с гранична стойност за статистическа достоверност (21% vs. 13%, OR=1.798, 95%CI 0.932÷3.469, p=0.078). При разпределението на -875G/A *TGFBR2* полиморфизма при мъжете с ранно начало на заболяването се наблюдава тенденция за повишена честота на хетерозиготните носители GA, както и на вариантия алел А в сравнение с мъже с късно начало, но значително по-слаба и без достигане на статистическа значима разлика.

Таблица 9. Честота на *TGFB2* -875G/A полиморфизъм при пациенти и контроли, в зависимост от пола.

Генотип <i>TGFB2</i> -875G/A (rs3087465)	Ранно начало, n (%)	Късно начало, n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Жени	62 (100)	70 (100)		
GG	38 (61%)	55 (79%)	Reference	
GA	22 (36%)	12 (17%)	2.654 (1.174÷6.000)	0.017
GA+AA vs. GG	24 (39%)	15 (21%)	2.316 (1.076÷4.983)	0.030
G алел	98 (79%)	122 (87%)	Reference	
A алел	26 (21%)	18 (13%)	1.798 (0.932÷3.469)	0.078
Мъже	33 (100)	18 (100)		
GG	19 (58%)	13 (72%)	Reference	
GA	11 (33%)	4 (22%)	1.882 (0.491÷7.217)	0.353
GA+AA	14 (42%)	5 (28%)	1.916 (0.554÷6.628)	0.301
G алел	49 (74%)	30 (83%)	Reference	
A алел	17 (26%)	6 (17%)	1.735 (0.616÷4.887)	0.294

3. Генотипни и алелни честоти на полиморфизъм в промоторната област на позиция - 875G/A в *TGFB2* гена при пациенти с колоректален карцином (КРК) и здрави контроли.

За настоящото изследване бяха успешно амплифицирани ДНК-и от 184 пациенти с КРК и 307 здрави контроли. Разпределението на генотиповете за *TGFB2* -875G/A полиморфизма (rs3087465) при пациентите с КРК и контролите не се отклоняваха от уравнението на Харди-Вайнберг и не се установи разлика между наблюдаваните и очакваните честоти ($\chi^2=0.2$, $p=0.905$; $\chi^2=0.122$, $p=0.940$). Не беше установена статистическа разлика в разпределението на генотиповете между двете групи по отношение на изследвания полиморфизъм ($\chi^2=1.38$, $df=2$, $p=0.50$), *таблица 10*.

При анализ на данните в зависимост от пола, установихме че честотата на хетерозиготния *TGFB2* -875G/A генотип е намалена при мъжете с КРК отколкото при здравите мъже (31.3% vs. 44.8%, $p=0.058$). Освен това, носителството на дивия генотип GG при мъжете се асоциира с по-висок риск от развитие на КРК в сравнение с GA+AA генотип (OR=1.820, 95% CI =0.985÷3.362, $p=0.055$). Обратно, хетерозиготният GA генотип е свързан с по-нисък риск в

сравнение с двата хомозиготни (GG+AA) генотипа при мъжете, с достигане на гранична значимост (OR=0.562, 95% CI 0.302÷1.047, p=0.068). Освен това хетерозиготния GA генотип се свързва с намален риск от развитие на КРК в сравнение с GG генотипа при мъжете (OR=0.544; 95% CI 0.289÷1.023; p=0.058). При мъжете с КРК вариантният А-алел е по-рядко срещан в сравнение със здравите мъже (19.1% vs. 26.9%) и предполага протективен ефект спрямо развитие на КРК, с гранична достоверност (OR=0.644; 95% CI 0.389÷1.066; p=0.086).

Таблица 10. Разпределение на генотипната и алелната честота на *TGFBR2* -875G/A полиморфизма при пациенти с КРК и здрави контроли.

Генотип <i>TGFBR2</i> -875G/A (rs3087465)	КРК, n (%)	Здрави контроли, n (%)	OR (95% CI)	p- стойност
Общо N	184 (100)	307 (100)		
GG	117(63.6)	193(62.9)	Reference	
GA	58(31.5)	102(33.2)	0.938(0.631÷1.393)	0.751
AA	9(4.9)	12(3.9)	1.237(0.506÷3.026)	0.640
GA+AA	67(36.4)	114(37)	0.969(0.664÷1.416)	0.873
G-алел	292(79.3)	488(79.5)	Reference	
A алел	76(20.7)	126(20.5)	1.008(0.732÷1.387)	0.961
Жени	69	240		
GG	42(40.9)	159 (66.3)	Reference	
GA	22(31.9)	72 (30)	1.157(0.664÷2.079)	0.626
AA	5(7.2)	9 (3.7)	2.103(0.669÷6.608)	0.195
GA+AA	27(39.1)	81 (33.8)	1.262 (0.726÷2.193)	0.409
GG vs. GA+AA			0.792(0.456÷1.377)	0.409
GA vs. GG+AA			1.092 (0.614÷1.944)	0.764
G-алел	106(76.8)	390 (81.3)	Reference	
A-алел	32(23.2)	90 (18.7)	1.346(0.794÷2.281)	0.269
Мъже	115	67		
GG	75(65.2)	34 (50.7)	Reference	
GA	36(31.3)	30 (44.8)	0.544(0.289÷1.023)	0.058
AA	4(3.5)	3 (4.5)	0.604(0.128÷2.850)	0.823 ^c
GA+AA	40(34.8)	33 (49.3)	0.549(0.297÷1.015)	0.055
GG vs. GA+AA			1.820 (0.985÷3.362)	0.055
GA vs. GG+AA			0.562 (0.302÷1.047)	0.068
G-алел	186(80.9)	98 (73.1)	Reference	
A-алел	44(19.1)	36 (26.9)	0.644(0.389÷1.066)	0.086

3.1. Асоциация на -875G/A в *TGFBR2* полиморфизма при пациенти с КРК в различни стадии на заболяването.

За да оценим ролята на *TGFBR2* -875G/A полиморфизма върху тежестта на злокачественото заболяване, разделихме групата на пациентите с КРК на две подгрупи - пациенти с ранен КРК (включват пациенти в I и II стадии) и пациенти с напреднал КРК (пациенти в III и IV стадии). Не

беше установена статистическа значима разлика в разпределението на генотипната и алелната честота между двете подгрупи пациенти, таблица 11.

Таблица 11. Разпределение на генотипни и алелни честоти на *TGFBR2* -875G/A полиморфизма при пациентите с КРК разделени спрямо стадия на заболяването. Ранен КРК включва I и II стадии по TNM класификация; напреднал КРК включва III и IV стадии по TNM класификация.

<i>TGFBR2</i> -875G/A (rs3087465)	Напреднал КРК, n (%)	Ранен КРК, n (%)	OR (95% CI)	p- стойност
Общо N	96 (52.2)	88 (47.8)		
GG	64 (66.7)	53 (60.2)	Reference	
GA	29 (30.2)	29 (33)	0.828 (0.441÷1.556)	0.557
AA	3 (3.1)	6 (6.8)	0.414 (0.099÷1.735)	0.373 ^c
GA+AA	32(33.3)	35(39.8)	0.757 (0.415÷1.382)	0.365
G алел	157 (81.8)	135 (76.7)	Reference	
A алел	35 (18.2)	41 (23.3)	0.734 (0.442÷1.218)	0.230

Когато сравнихме пациентите с напреднал КРК със здравите контроли, установихме, че мъжете носители на хетерозитогния генотип, както и на поне един А-алел (GA+AA генотип) са със значително по-нисък риск за прогресия на заболяването до напреднал КРК стадии (OR=0.459, 95% CI 0.217÷0.969, p=0.039; OR=0.466, 95% CI 0.226÷0.961, p=0.037, съответно), *таблица 12*. Освен това, получените резултати показват, че при мъжете с напреднал КРК честота на А-алела е по-ниска в сравнение със здравите контроли (17.2% vs. 26.9%) и може да се приеме за протективен фактор срещу прогресия на КРК, с гранична статистическа достоверност (OR=0.566, 95% CI 0.309÷1.037, p=0.064). Хомозиготите по GG-генотип при мъжете с напреднал стадии на КРК са с относително по-висока честота спрямо здравите мъже сравнени с GA+AA генотипа (OR=2.146, 95% CI 1.041÷4.422, p=0.037). За разлика от това, хетерозитотния GA генотип при мъжете се явява като протективен фактор за напреднал стадии в сравнение с GG+AA генотип (OR=0.477, 95% CI 0.228÷0.997, p=0.047), *таблица 12*.

При генотипното разпределение сред пациентите с ранен стадии на КРК и здравите контроли не бяха установени статистически значими разлики.

Таблица 12. Разпределение на *TGFBR2* -875G/A полиморфизма при пациенти с напреднал КРК (III и IV стадии по TNM класификация) и здрави контроли.

<i>TGFBR2</i> -875G/A (rs3087465)	Напреднал стадии на КРК, n (%)	Здрави контроли, n(%)	OR (95%CI)	p-стойност
Общо N	96 (52.2)	307 (100)		
GG	64 (66.7)	193(62.9)	Reference	
GA	29 (30.2)	102(33.2)	0.857(0.520÷1.414)	0.546
AA	3 (3.1)	12(3.9)	0.754(0.206÷2.756)	0.940 ^c
GA+AA	32(33.3)	114()	0.846(0.522÷1.373)	0.499
GA vs.GG+AA			0.870 (0.530÷1.429)	0.582
G алел	157 (81.8)	488(79.5)	Reference	
A алел	35 (18.2)	126(20.5)	0.863(0.570÷1.308)	0.488
Жени	35 (36.5)	240		
GG	22(62.9)	159 (66.3)	Reference	
GA	12(34.3)	72 (30)	1.205(0.565÷2.567)	0.629
AA	1(2.9)	9 (3.7)	0.803(0.097÷6.647)	1.000 ^c
GA+AA	13(37.1)	81 (33.8)	1.160(0.556÷2.421)	0.693
G алел	56(80)	390 (81.3)	Reference	
A алел	14(20)	90 (18.7)	1.083(0.578÷2.032)	0.803
Мъже	61 (63.5)	67		
GG	42(68.9)	34 (50.7)	Reference	
GA	17(27.9)	30 (44.8)	0.459(0.217÷0.969)	0.039
AA	2(3.3)	3 (4.5)	0.540(0.085÷3.417)	0.841 ^c
GA+AA	19(31.1)	33 (49.3)	0.466(0.226÷0.961)	0.037
GG vs. GA+AA			2.146 (1.041÷4.422)	0.037
GA vs. GG+AA			0.477 (0.228÷0.997)	0.047
G алел	101(82.8)	98 (73.1)	Reference	
A алел	21(17.2)	36 (26.9)	0.566(0.309÷1.037)	0.064

4. Комбиниран ефект от двата полиморфизма *TGFB1* -509C/T (rs1800469) и *TGFBR2* -875G/A (rs3087465) при пациенти с мултиплена склероза.

4.1. Асоциация на rs1800469 и rs3087465 с риск от развитие на ПРМС.

Въз основа на получените данни, анализирахме ефекта при комбинацията от двата полиморфизма *TGFB1* -509C/T и *TGFBR2* -875G/A в един индивид/геном между пациентите с

ПРМС и контролите. Получените резултати, представени в *таблица 13*, показват, че комбинацията от *TGFB1* -509T/T и *TGFBR2* -875G/A генотипове, както и *TGFB1* -509T/T и *TGFBR2* -875G/A / *TGFBR2* -875A/A са свързани със значително намален риск от ПРМС в сравнение с хомозиготните носители *TGFB1* -509 C/C и *TGFBR2* -875G/G генотипове (OR=0.357, 95%CI: 0.136÷0.938, p=0.032; OR=0.411, 95%CI: 0.173÷0.976, p=0.040).

Таблица 13. Комбинация от генотипове на -509C/T *TGFB1* и -875G/A *TGFBR2* полиморфизми.

<i>TGFB1</i> -509C/T	<i>TGFBR2</i> -875G/A	Пациенти с ПРМС, n(%)	Здрави контроли, n(%)	OR (95%CI)	p- стойност
Генотип					
Общо N		183 (100)	307 (100)		
CC	GG	47 (25.7)	70 (22.8)	Reference	
CC	GA	19 (10.4)	29 (9.5)	0.976 (0.491÷1.939)	0.944
CC	AA	4 (2.2)	5 (1.6)	1.191 (0.304÷4.669)	0.801
CC	GA+AA	23 (12.6)	34 (11.1)	1.008 (0.528÷1.921)	0.982
CT	GG	59 (32.2)	91 (29.6)	0.966 (0.589÷1.582)	0.890
CT	GA	24 (13.1)	48 (15.7)	0.745 (0.403÷1.376)	0.346
CT	AA	3 (1.6)	3 (1)	1.489 (0.288÷7.697)	0.633
CT	GA+AA	27 (14.7)	51 (16.6)	0.788 (0.435÷1.430)	0.434
TT	GG	19 (10.4)	32 (10.4)	0.884 (0.449÷1.741)	0.722
TT	GA	6 (3.3)	25 (8.1)	0.357 (0.136÷0.938)	0.032
TT	AA	2 (1.1)	4 (1.3)	0.745 (0.131÷4.231)	0.739
TT	GA+AA	8 (4.4)	29 (9.4)	0.411 (0.173÷0.976)	0.040
CT/TT	GG	78 (42.6)	123 (40)	0.944 (0.593÷1.505)	0.810
CT/TT	GA	30 (16.4)	73 (23.8)	0.612 (0.348÷1.075)	0.087
CT/TT	GA/AA	35 (19.1)	80 (26.1)	0.652 (0.379÷1.121)	0.121

Бяха сравнени комбинациите от генотипове от двата промоторни полиморфизма, в зависимост от пола, които са представени в *таблица 14*. Резултатите показват, че при комбинация от *TGFB1*-509C/T / *TGFB1*-509T/T и *TGFBR2* -875G/A генотипове при мъжете в сравнение с тези, които са едновременно хомозиготни носители от див тип - с *TGFB1*-509C/C и *TGFBR2* -875G/G генотипове, значимостта на протективен ефект се увеличава (OR = 0.268, 95% CI: 0.088-0.818, p=0.018). Не беше наблюдавана статистическа значима разлика при комбинациите от генотипове при жените.

Таблица 14. Комбинация от генотипове на rs1800469 и rs3087465 полиморфизма, в зависимост от пола.

<i>TGFB1</i> -509C/T	<i>TGFBR2</i> -875G/A	Пациенти n(%)	Здрави контроли, n(%)	OR (95%CI)	p-стойност
Генотип					
Жени		132 (100)	240 (100)		
CC	GG	33 (25)	60 (25)	Reference	
CC	GA	13 (9.8)	23 (9.6)	1.028 (0.461÷2.291)	0.947
CC	GA+AA	16 (12.1)	27 (11.3)	1.077 (0.509÷2.281)	0.845
CT	GG	47 (35.6)	76 (31.7)	1.124 (0.643÷1.967)	0.681
CT	GA	16 (12.1)	31 (12.9)	0.938 (0.449÷1.963)	0.866
CT	GA+AA	17 (12.9)	34 (14.2)	0.909 (0.442÷1.869)	0.795
TT	GG	13 (9.8)	23 (9.6)	1.028 (0.461÷2.291)	0.947
TT	GA	5 (3.8)	18 (7.5)	0.505 (0.172÷1.484)	0.209
TT	AA	1 (0.8)	2 (0.8)	0.909 (0.079÷10.407)	0.939
TT	GA+AA	6 (4.5)	20 (8.3)	0.545 (0.199÷1.492)	0.233
Мъже		51 (100)	67 (100)		
CC	GG	14 (27.4)	10 (14.9)	Reference	
CC	GA	6 (11.7)	6 (9)	0.714 (0.177÷2.875)	0.729
CC	GA+AA	7 (13.7)	7 (10.4)	0.714 (0.190÷2.688)	0.618
CT	GG	12 (23.5)	15 (22.4)	0.571 (0.188÷1.736)	0.322
CT	GA	8 (15.7)	17 (25.4)	0.336 (0.105÷1.081)	0.064
CT	GA+AA	10 (19.6)	17 (25.4)	0.420 (0.136÷1.296)	0.128
TT	GG	6 (11.8)	9 (13.4)	0.467 (0.128÷1.771)	0.265
TT	GA	1 (2)	7 (10.4)	0.102 (0.011÷0.965)	0.024 с 0.066
TT	AA	1 (2)	2 (3)	0.357 (0.028÷4.501)	0.411
TT	GA+AA	2 (4)	9 (13.4)	0.159 (0.028÷0.899)	0.027 с 0.065
CT+ TT	GA+AA	12 (6.6)	26 (8.5)	0.687 (0.316÷1.496)	0.343
CT+TT	GA	9 (17.6)	24 (35.8)	0.268 (0.088÷0.818)	0.018

4.2. Асоциация при комбинация от двата полиморфизма rs1800469 и rs3087465 с началото на ПРМС.

Анализът на данните за асоциацията на ефекта от комбинацията от rs1800469 и rs3087465 SNPs с началото на клинична проява на заболяването е представен в *таблица 15*. При пациентите с ранно начало на ПРМС беше установена, че честотата от комбинираните генотипове *TGFB1* -509C/C и *TGFBR2* -875G/A е значително с по-висока в сравнение с пациентите с късно начало на заболяването (15.8% vs.4.6%, OR=3.913, 95% CI: 1.130 -13.554, p=0.05). Тази тенденция за по-висока честота при пациенти с ранно начало, се повишава

значимо имайки предвид комбинацията от *TGFB1* -509C/C и *TGFB2* -875G/A-875A/A генотипове в сравнение с пациентите с начало на заболяването след 30 години (19% vs. 5.7 %, OR = 3.757, 95% CI: 1.197-11.793, p=0.019).

Таблица 15. Асоциация на rs1800469 и rs3087465 полиморфизма с началото на заболяването при пациенти с ПРМС.

<i>TGFB1</i> -509C/T (rs 1800469)	<i>TGFB2</i> -875G/A (rs3087465)	Ранно начало, n (%)	Късно начало, n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Total RRMS 183		95 (100)	88 (100)		
CC	GG	23 (24.2)	24 (27.3)	Reference	
CC	GA	15 (15.8)	4 (4.6)	3.913 (1.130÷13.554)	0.050 ^c
CC	AA	3 (3.2)	1 (1.1)	3.130 (0.303÷32.314)	0.317
CC	GA/AA	18 (19)	5 (5.7)	3.757 (1.197÷11.793)	0.019
CT	GG	25 (26.3)	34 (38.6)	0.767 (0.355÷1.658)	0.500
CT	GA	15 (15.8)	9 (10.2)	1.739 (0.637÷4.751)	0.278
CT	AA	1 (1)	2 (2.3)	0.522(0.044÷6.154)	0.600
CT	GA/AA	16 (16.8)	11 (12.5)	1.518 (0.583÷3.953)	0.392
TT	GG	9 (9.5)	10 (11.4)	0.939 (0.323÷2.729)	0.908
TT	GA	3 (3.2)	3 (3.4)	1.043 (0.191÷5.709)	0.961
TT	AA	1 (1)	1 (1.1)	1.043 (0.062÷17.686)	0.976
TT	GA/AA	4 (4.2)	4 (4.5)	1.043 (0.233÷4.673)	0.956
CT/TT	GG	34 (35.8)	44 (50)	0.806 (0.390÷1.667)	0.561
CT/TT	GA/AA	20 (21)	15 (17)	1.391 (0.577÷3.356)	0.462
CC/TT	GA/AA	22 (23.2)	9 (10.2)	2.551 (0.973÷6.686)	0.054

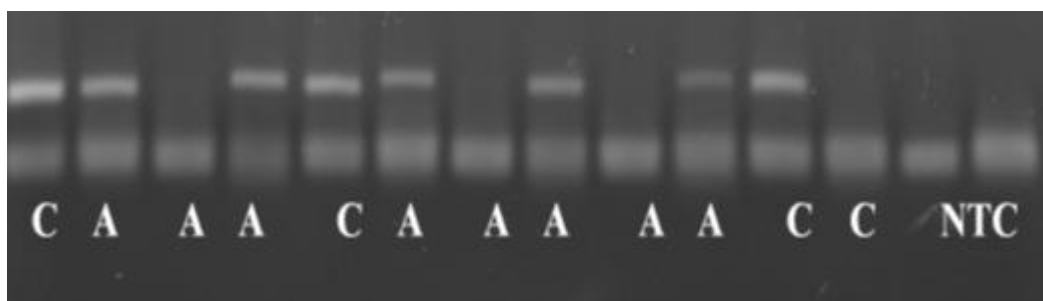
Данните представени в *таблица 16* показват, че при жените с ранно начало на ПРМС, честотата на комбинацията от хомозиготите по дивия тип с *TGFB1* -509 C/C генотип и хетерозиготите с *TGFB2* -875G/A генотип са значително по-високи, сравнени с тези с късно начало на болестта (17.8% vs. 7.1%, OR=3.800, 95% CI: 1.044-13.830, p=0.038). Също така, беше установено, че комбинацията от носителите на поне един вариантен А алел на -875G/A в *TGFB2* гена (GA+AA генотипове) и хомозиготите по С алела на -509C/C в *TGFB1* гена (CC генотип) са значително по-често срещани при жените с ранно начало, в сравнение с пациентките с късно начало на заболяването (21% vs. 8.6%, OR=3.742, 95% CI: 1.105-12.670, p=0.030). Получените данни показват, че жените с комбинация от генотипове по двата полиморфизма (CC/ GA+AA генотипове) имат над 3 пъти по-висок риск от ранно начало на заболяването. При мъжете не беше установена статистическа значима разлика по отношение на асоциацията на комбинативния ефект от генотипове на двата SNPs с началото на ПРМС.

Таблица 16. Асоциация на rs1800469 и rs3087465 полиморфизма с началото на заболяването, в зависимост от пола.

TGFB1 -509C/T (rs 1800469)	TGFB2 -875G/A (rs3087465)	Ранно начало, n (%)	Късно начало, n (%)	OR (95%CI)	p- стойност
Жени 132		62 (100)	70 (100)		
CC	GG	11 (17.8)	19 (27.1)	Reference	
CC	GA	11 (17.8)	5 (7.1)	3.800 (1.044÷13.830)	0.038
CC	AA	2 (3.2)	1 (1.4)	3.455 (0.280÷42.622)	0.311
CC	GA /AA	13 (21)	6 (8.6)	3.742 (1.105÷12.670)	0.030
CT	GG	19 (30.6)	27 (38.6)	1.215 (0.472÷3.132)	0.686
CT	GA	8 (12.9)	9 (12.8)	1.263 (0.413÷3.866)	0.682
CT	GA/AA	9 (14.5)	9 (12.8)	1.421 (0.476÷4.246)	0.528
TT	GG	6 (9.7)	5 (7.1)	1.705 (0.454÷6.409)	0.427
TT	GA	2 (3.2)	4 (5.7)	0.711 (0.118÷4.281)	0.708
TT	GA/AA	4 (6.5)	4 (5.7)	1.421 (0.315÷6.401)	0.646
Мъже 51		33 (100)	18 (100)		
CC	GG	8 (24.2)	4 (22.2)	Reference	
CT	GG	7 (21.2)	6 (33.3)	0.583 (0.115÷2.952)	0.513
CT	GA	5 (15.2)	3 (16.7)	0.833 (0.129÷5.396)	0.848
CT	GA/AA	6 (18.2)	3 (16.7)	1.000 (0.160÷6.255)	1.000
TT	GG	3 (9.1)	4 (22.2)	0.375 (0.055÷2.555)	0.311

5. Генотипиране по еднонуклеотидния полиморфизъм на позицията -607C/A в IL18 гена.

Генотипите на пациентите с мултиплена склероза и здравите контроли по IL-18 -607C/A полиморфизма бяха определени чрез алел-специфичен PCR или още известен като ARMS-PCR. При този анализ се използват един общ генеричен праймер и два алел-специфични праймера, съответно за C-алела и A-алела. Чрез 2% агарозна гел електрофореза и визуализиране с етидиев бромид бяха отчетени генотиповете, като при наличие на амплификационен продукт и в двете реакционни смеси беше отчетен хетерозиготен генотип, а наличие само в едната –хомозигот по съответния алел (фигура 3).



Фигура 3. 2% агарозна гел електрофореза след ARMS-PCR за генотипиране по IL-18 -607C/A полиморфизма.

5.1. Генотипни и алелни честоти на полиморфизъм в промоторната област на позиция -607C/A в *IL18* гена.

В това изследване бяха генотипирани 183 пациента с ПРМС и 162 контролни контроли по промоторния полиморфизъм на позиция -607C/A в *IL18* гена. Средната възраст на пациентите беше 40.50 ± 9.01 , а на здравите контроли – 39.27 ± 9.85 ($p=0.22$, t-test). При генотипното разпределение на *IL18* -607C/A полиморфизма между пациентите и здравите контроли не се установи статистическа значима разлика ($\chi^2=2.385$, $p=0.303$). *таблица 17*. Между алелните честоти при пациентите и контролите също нямаше разлика ($p=0.653$). Само един носител на хомозиготния АА-генотип беше детектиран в пациентската група, а от контролите - 4 индивида ($p=0.124$) и поради това в последващите анализи имаме предвид носителството на вариантния алел-А (СА+АА генотип), *таблица 17*.

Таблица 17. Разпределение на генотипните и алелните честоти на промоторния *IL18* - 607C/A полиморфизъм при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

<i>IL18</i> -607 (rs1946518)	Пациенти с МС, n (%)	Здрави контроли, n (%)	OR (95% CI)	p- стойност
Общо N	183	162		
СС	66 (36%)	54 (33%)	Reference	
СА	116 (58%)	104 (64%)	0.913 (0.584÷1.426)	0.688
СА+АА	117 (64%)	108 (67%)	0.886 (0.568÷1.383)	0.595
С алел	248 (68)	212 (65)	Reference	
А алел	117 (32)	112 (35)	0.874 (0.486÷1.573)	0.653
Жени	132 (72%)	120 (74%)		
СС	45 (34%)	39 (32.5%)	Reference	
СА	86 (65%)	78 (65%)	0.956 (0.564÷1.619)	0.866
СА+АА	87 (66%)	81 (67.5%)	0.931 (0.551÷1.573)	0.789
С алел	176 (67%)	156 (65)	Reference	
А алел	88 (33%)	84 (35)	0.929 (0.642÷1.342)	0.693
Мъже	51 (28%)	42 (26%)		
СС	21 (41%)	15 (36)	Reference	
СА	30 (59%)	26 (62)	0.824 (0.354÷1.920)	0.654
СА+АА	30 (59%)	27 (64%)	0.794 (0.342÷1.842)	0.590
С алел	72 (70.5%)	56 (67%)	Reference	
А алел	30 (29.5%)	28 (33%)	0.833 (0.447÷1.553)	0.566

5.2. Асоциация на промоторния -607C/A в *IL18* гена (rs1946518) полиморфизъм с началото на мултиплена склероза.

Сравняването на генотипните и алелните честоти на *IL18* -607C/A полиморфизма, в зависимост от началото на дебюта на заболяването не показва статистическа значима разлика. Данните са представени в таблица 18.

Таблица 18. Асоциация на -607C/A полиморфизма в *IL18* гена с началото на заболяването при пациенти с ПРМС.

<i>IL18</i> -607 (rs1946518)	Ранно начало, n (%)	Късно начало, n (%)	OR (95% CI)	р- стойност
Общо 183	95 (100)	88 (100)		
СС	38 (40%)	28 (32%)	Reference	
СА+АА	57 (60%)	60 (68%)	0.700 (0.381÷1.286)	0.249
С алел	133 (70%)	116 (66%)	Reference	
А алел	57 (30%)	60 (34%)	0.829 (0.534÷1.286)	0.402
Жени 114	62 (100)	70 (100)		
СС	25 (40%)	20 (29%)	Reference	
СА+АА	37 (60%)	50 (71%)	0.592 (0.287÷1.223)	0.155
С алел	86 (69%)	90 (64%)	Reference	
А алел	38 (31%)	50 (36%)	0.795 (0.475÷1.331)	0.383
Мъже 45	33 (100)	18 (100)		
СС	13 (39%)	8 (44%)	Reference	
СА+АА	20 (61%)	10 (56%)	1.231 (0.385÷3.937)	0.726
С алел	46 (70%)	26 (72%)	Reference	
А алел	20 (30%)	10 (28%)	1.130 (0.460÷2.777)	0.789

II. Функционално значение на промоторните полиморфизми на цитокиновите гени върху белтъчния продукт на гена.

1. Серумни нива на TGF- β 1 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

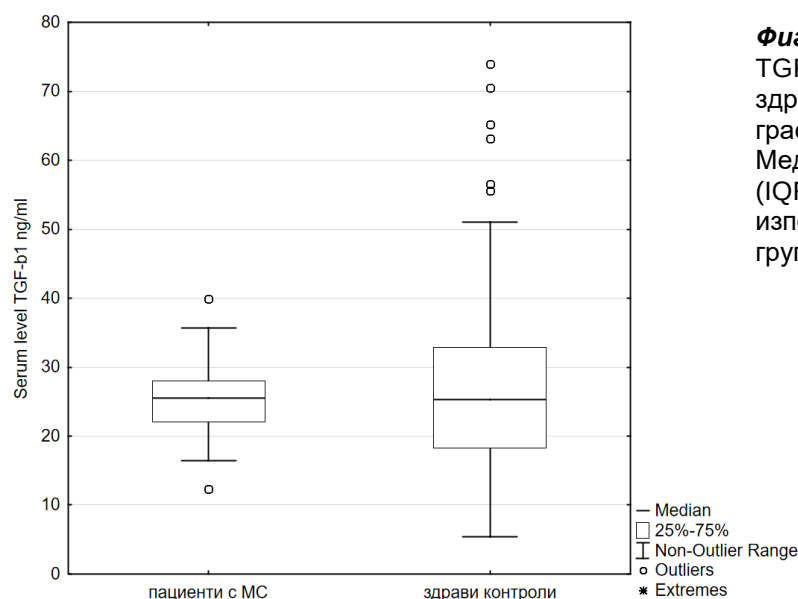
За това серологично изследване бяха включени общо 152 пациенти с ПРМС, от които 131 пациенти лекувани с интерферон-бета (IFN- β) и 21 пациента лекувани с глатирамер ацетат (GA). От този анализ бяха изключени тези пациенти, които са без болест-модифицираща терапия. Контролната група включваше 108 здрави контроли, от които 70 жени и 38 мъже.

Данните от измерванията на серумните TGF- β 1 нива за изследваните групи са представени в *таблица 19*.

Таблица 19. Серумни нива на TGF- β 1 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

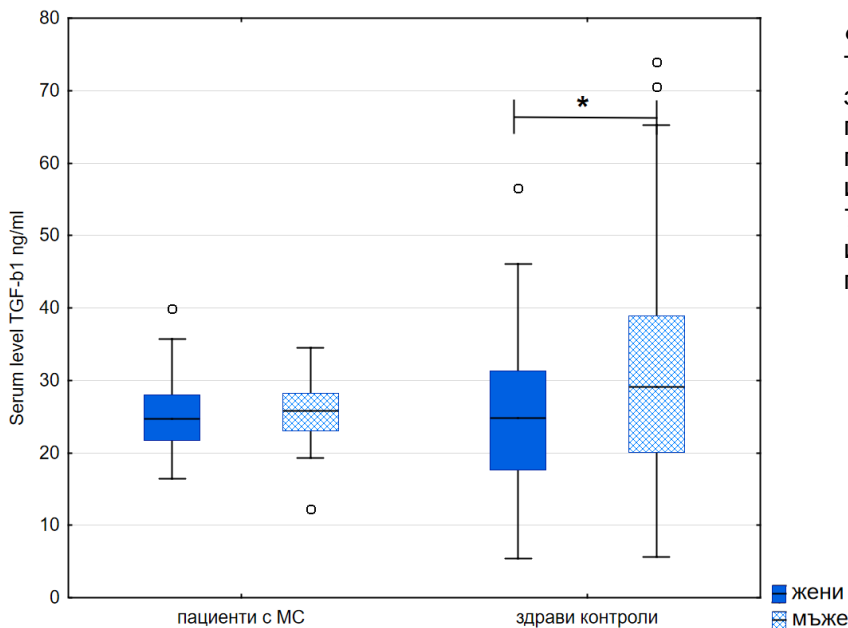
	Група	Брой, N	Медиана (IQR) ng/ml	р-стойност
	Пациенти	152	25.5 (22.0-28.0)	0.86
	Здрави контроли	108	25.3 (18.3-32.9)	
Пациенти с ПРМС	Жени	109	24.7 (21.7-28)	0.38
пол	Мъже	43	25.8 (23.0-28.2)	
Здрави контроли	Жени	70	24.8 (17.7-31.3)	0.039
пол	Мъже	38	29.1 (20.1-38.9)	
Начало на МС	Ранно начало	77	25.8 (22.2-28.0)	0.50
заболяването	Късно начало	75	24.7 (21.3-28.1)	
Болест-модифицираща	Интерферон-бета (IFN- β)	131	25.2 (21.7-27.9)	0.043
терапия (БМТ)	Глатирамер ацетат (GA)	21	26.6 (24.2-32.9)	
EDSS	≤ 1.5	86	24.2 (22.2-28.1)	0.974
	2÷3.5	66	26.3 (21.1-27.7)	

Средните стойности на серумни нива на TGF- β 1 при пациентите с ПРМС са малко по-ниски в сравнение с тези при здравите контроли, без достигане на статистическа значима разлика ($25.42 \pm 0.35 \text{ ng/ml}$ vs. $27.23 \pm 1.29 \text{ ng/ml}$; $p=0.85$), *фигура 4*.



Фигура 4. Серумни концентрации на TGF- β 1 при пациенти с ПРМС и здрави контроли. Резултатите на графиката са представени като Медиана с Интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

Когато разделихме двете групи по пол, данните показват по-високи серумни нива на цитокина при здравите мъже в сравнение с тези на мъжете с ПРМС, но без установяване на статистическа достоверност ($32.14 \pm 2.79 \text{ ng/ml}$ vs. $25.81 \pm 0.68 \text{ ng/ml}$; $p=0.19$), *фигура 5*. Измерените серумни концентрации на TGF- β 1 в групата на жените показват относително подобни стойности при пациентките в сравнение с контролите ($25.26 \pm 0.42 \text{ ng/ml}$ vs. $24.64 \pm 1.20 \text{ ng/ml}$; $p=0.4$). Разлики в серумни нива в групата на пациентите между жените и мъжете не бяха установени, а средните им стойности са почти идентични ($25.26 \pm 0.42 \text{ ng/ml}$ vs. $25.81 \pm 0.68 \text{ ng/ml}$; $p=0.38$). Сравнявайки, серумните цитокинови концентрации в групата на здравите контроли, регистрирахме значимо по-високи нива на TGF- β 1 при мъжете, в сравнение с тези при жените ($32.14 \pm 2.79 \text{ ng/ml}$ vs. $24.64 \pm 1.20 \text{ ng/ml}$; $p=0.039$), *фигура 5*.

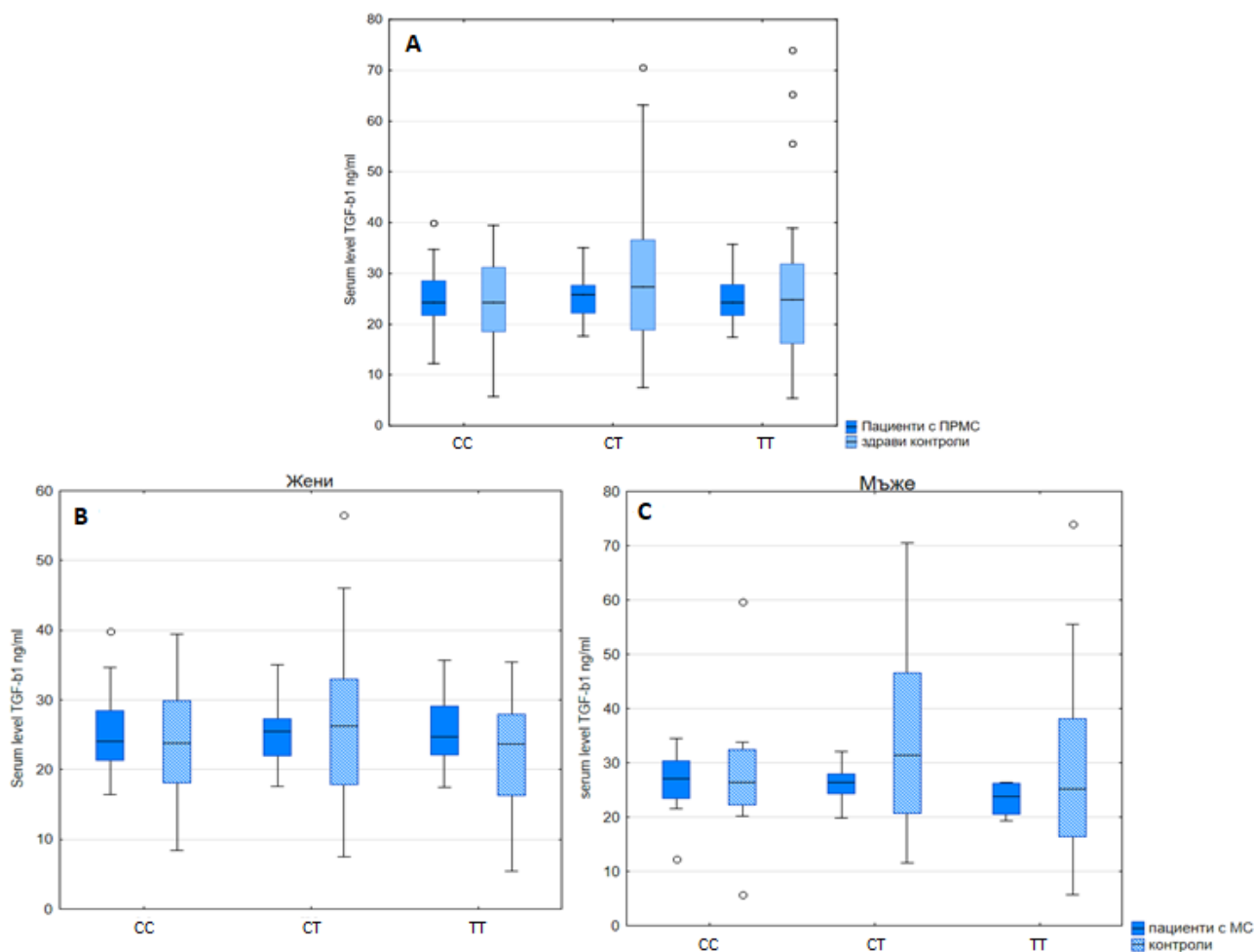


Фигура 5. Серумни концентрации на TGF-β1 при пациенти с ПРМС и здрави контроли, в зависимост от пола. Резултатите на графиката са представени като Медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). *p < 0.05 – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

1.1. Влияние на *TGFB1* -509C/T (*rs1800469*) и *TGFB2* -875G/A (*rs3087465*) полиморфизми върху серумните нива на TGF- β1 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

За да установим дали *rs1800469* SNP влияе върху серумните TGF-β1 нива беше направено сравнение на серумните нива на цитокина между трите генотипа при пациентите и контролната група. Сходни серумни нива на TGF-β1 бяха установени при пациентите и здравите контроли, хомозиготи по -509CC генотипа както и по -509TT генотипа (25.78 ± 0.71 ng/ml vs. 24.20 ± 1.70 ng/ml; $p=0.48$; 24.74 ± 0.91 ng/ml vs. 26.49 ± 2.79 ng/ml; $p=0.63$, съответно), *фигура 6А*. Средните серумни нива при мъжете с вариантния генотип -509TT са по-ниски при пациентите в сравнение със здравите мъже (23.25 ± 1.14 ng/ml vs. 32.79 ± 5.79 ng/ml; $p=0.7$), въпреки отсъствието на статистическа значимост. От друга страна, при жените хомозиготи по -509TT-генотипа се наблюдаваха по-високи цитокинови нива при пациентките в сравнение с контролите (25.43 ± 1.20 ng/ml vs. 22.06 ± 1.94 ng/ml; $p=0.18$), *фигура 6В*. Също така, при пациентите мъже с хомозиготен -509TT-генотип са установени понижени серумни нива на TGF-β1 в сравнение с тези носители на СТ-генотип и СС-генотип, с гранична статистическа значимост (23.25 ± 1.14 ng/ml vs. 26.15 ± 0.87 ng/ml, $p=0.068$; 23.25 ± 1.14 ng/ml vs. 26.47 ± 1.31 ng/ml; $p=0.09$, съответно). Сред мъжете с ПРМС, носители на хетерозиготен -509СТ генотип, цитокиновото ниво е по-ниско в сравнение със здравите мъже със същия генотип, но без

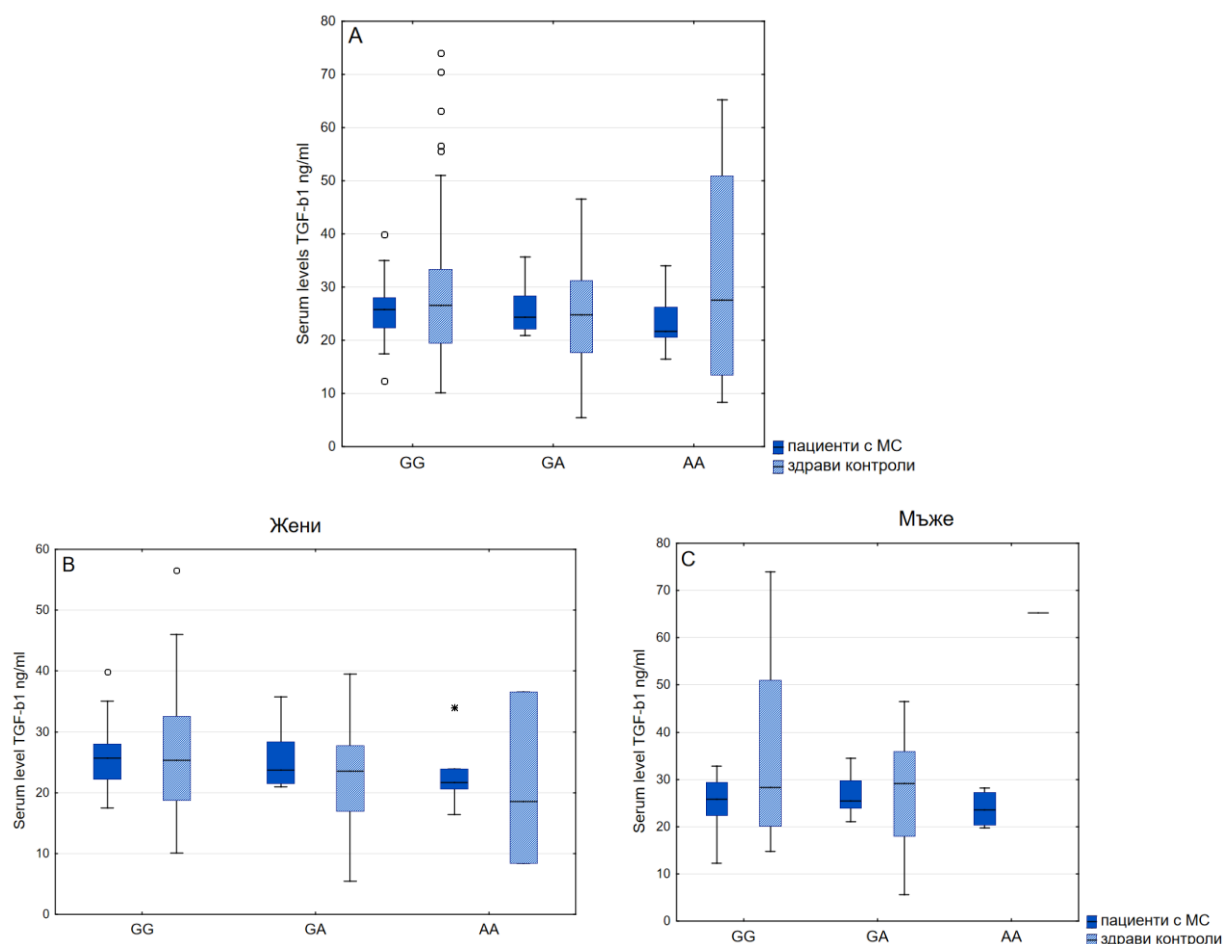
достигане на статистическа значимост ($26.15 \pm 0.87 \text{ ng/ml}$ vs. $34.83 \pm 3.90 \text{ ng/ml}$; $p=0.1$), *фигура 6C*. За сравнение, средните серумни нива на TGF- $\beta 1$ при жените с MC, носители на -509CC-генотип и -509CT-генотип показаха подобни стойности спрямо здравите жени със същия генотип ($25.47 \pm 0.85 \text{ ng/ml}$ vs. $22.30 \pm 10.60 \text{ ng/ml}$, $p=0.15$; $25.07 \pm 3.8 \text{ ng/ml}$ vs. $26.11 \pm 9.7 \text{ ng/ml}$, $p=0.7$, съответно), *фигура 6B*.



Фигура 6. Серумни нива на TGF- $\beta 1$ при пациенти с ПРМС и здрави контроли в зависимост от -509C/T полиморфизма в *TGFB1* гена (панел А) и разделени по пол, съответно жени (панел В) и мъже (панел С). Резултатите на графиките са представени като Медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%).

Зависимостта на промоторния *TGFB2* -875G/A полиморфизъм и серумните концентрации на TGF- $\beta 1$ при пациентите и здравите контроли са представени на *фигура 7*. Получените данни показват сходни серумни нива при пациентите и контролите с хетерозиготен генотип - 875GA ($25.54 \pm 0.64 \text{ ng/ml}$ vs. $24.33 \pm 1.55 \text{ ng/ml}$; $p=0.66$). От друга страна, пациентите, които са хомозиготни носители на вариантния -875AA генотип показват по-ниски серумни нива на TGF- $\beta 1$ в сравнение с контролната група със същия генотип, но без статистическа достоверност

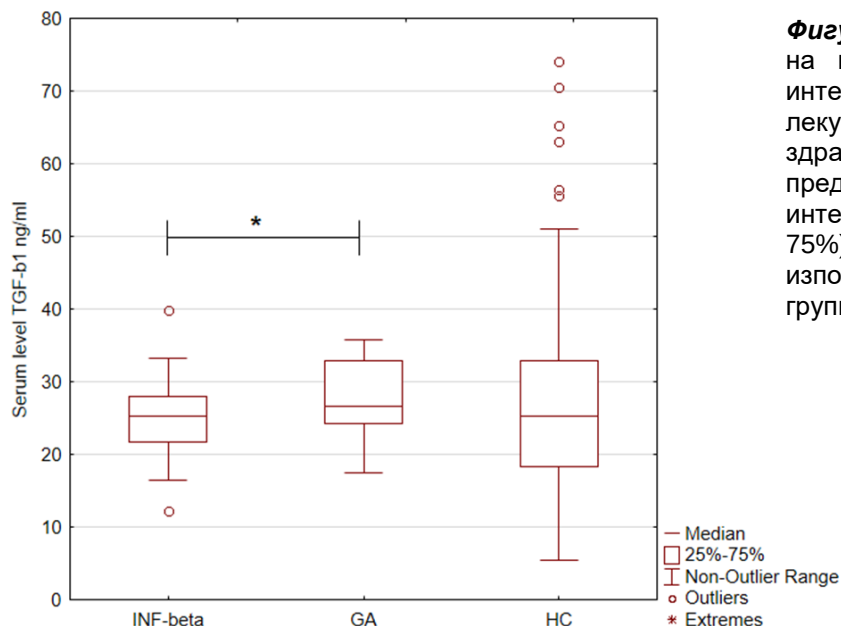
($23.52 \pm 1.75 \text{ ng/ml}$ vs. $32.18 \pm 12.46 \text{ ng/ml}$; $p=0.877$). Средните стойности на серумни нива също остават понижени при пациентската група хомозиготи по дивия -875GG генотип спрямо контролите ($25.53 \pm 0.43 \text{ ng/ml}$ vs. $29.19 \pm 1.87 \text{ ng/ml}$; $p=0.58$), *фигура 7A*. При мъжете с ПРМС с GG генотип се наблюдава понижено ниво на серумния TGF- $\beta 1$ в сравнение със здравите мъже, без достигане на статистическа разлика ($25.73 \pm 0.91 \text{ ng/ml}$ vs. $35.38 \pm 4.25 \text{ ng/ml}$; $p=0.37$), *фигура 7C*. Нивата на цитокина при жените от пациентската и контролната група с -875GG генотип и с -875GA генотип показват сходни стойности ($25.47 \pm 0.50 \text{ ng/ml}$ vs. $26.01 \pm 1.63 \text{ ng/ml}$, $p=0.96$; $24.99 \pm 0.77 \text{ ng/ml}$ vs. $23.09 \pm 1.78 \text{ ng/ml}$; $p=0.35$, съответно), *фигура 7B*.



Фигура 7. Серумни нива на TGF- $\beta 1$ при пациенти с ПРМС и здрави контроли в зависимост от -875G/A полиморфизма в *TGFBR2* гена. Резултатите са представени като медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%).

По отношение на болест-модифициращата терапия, установихме значително по-високо TGF- $\beta 1$ серумно ниво при пациентите с ПРМС лекувани с GA в сравнение с тези лекувани с IFN- β

($27.51 \pm 1.21 \text{ ng/ml}$ vs. $25.08 \pm 0.36 \text{ ng/ml}$; $p=0.043$), фигура 8. Сравнението на средните нива на TGF- β 1 измерени в контролната група спрямо пациентите лекувани с GA и при тези с IFN- β , не показват статистическа значима разлика.



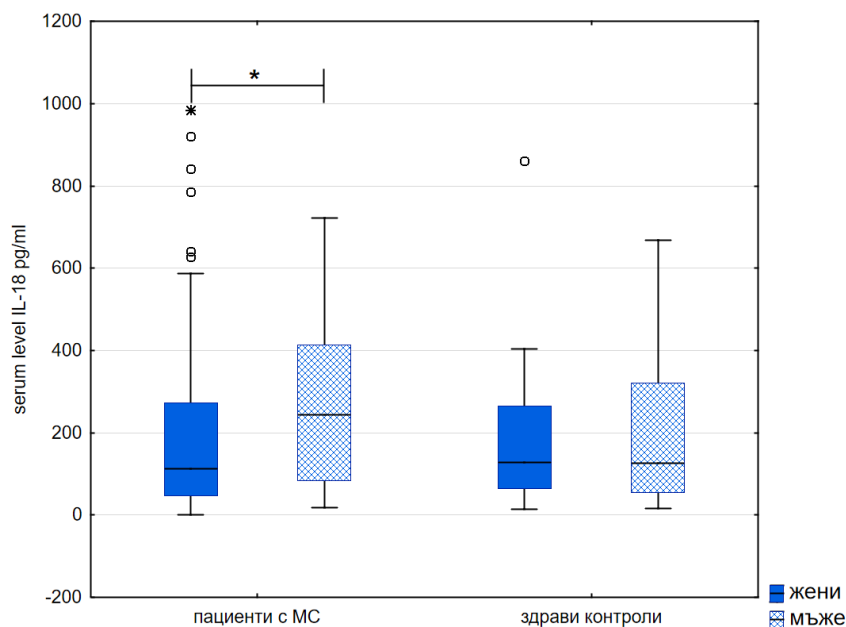
Фигура 8. Серумни нива на TGF- β 1 на пациенти с ПРМС, лекувани с интерферон бета (IFN- β), пациенти лекувани с глатирамер ацетат (GA) и здрави контроли (HC). Резултатите са представени като медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). * $p < 0.05$ – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

2. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

В това изследване бяха включени 79 здрави контроли (39 жени и 40 мъже) и 150 пациенти с ПРМС провеждащи болест-модифициращо лечение (108 жени и 42 мъже). Средната възраст на изследваните групи е съответно: 39.39 ± 9.99 и 40.16 ± 8.37 ($p=0.544$; t-test).

При сравнение на серумните IL-18 нива между групата на пациентите и контролната група, независимо от генотипа им, се наблюдаваше слабо повишено цитокиново ниво при пациентите с ПРМС в сравнение с контролите ($213.29 \pm 17.19 \text{ pg/ml}$ vs. $190.09 \pm 18.39 \text{ pg/ml}$; $p=0.980$).

След разделянето на групите по пол (фигура 9), бяха установени по-високи серумни нива при пациентите мъже отколкото при здравите мъже ($264.47 \pm 30.48 \text{ pg/ml}$ vs. $193.9 \pm 26.64 \text{ pg/ml}$; $p=0.09$). В пациентската група се наблюдаваха значително по-високи серумни нива на IL-18 при мъжете в сравнение с тези при жените ($264.5 \pm 30.48 \text{ pg/ml}$ vs. $193.39 \pm 20.49 \text{ pg/ml}$; $p=0.006$).



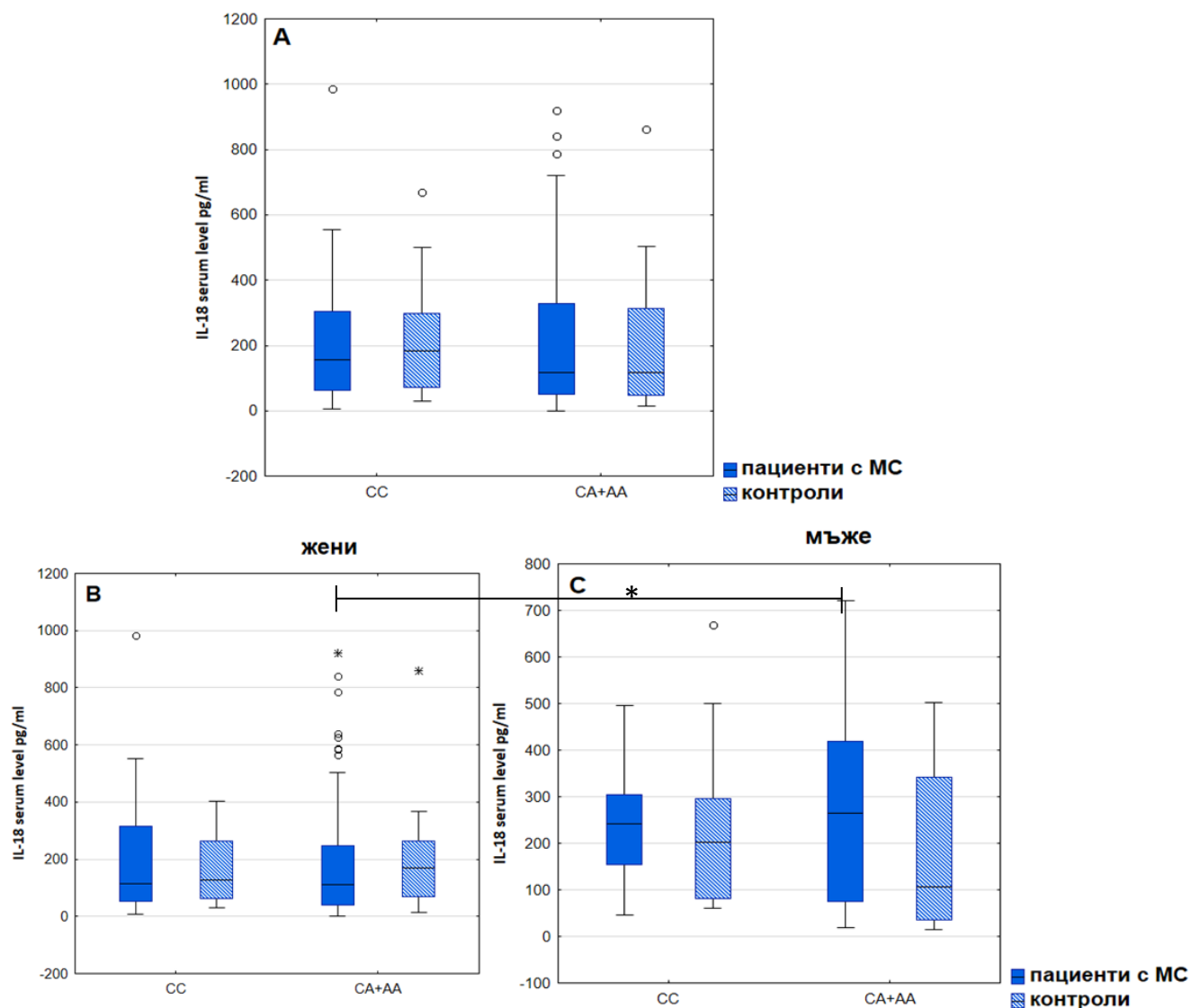
Фигура 9. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ПРМС и здрави контроли (НС), в зависимост от пола. Резултатите са представени като медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). * $p < 0.01$ – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

2.1. Влияние на промоторния *IL18* -607C/A полиморфизъм върху серумните нива на IL-18 при пациенти с ПРМС и здрави контроли.

Средните серумни нива на IL-18, по отношение на генотипа на промоторния полиморфизъм *IL18* -607C/A, са близки по стойности сравнявайки контролната група и тези на пациентите с ПРМС с генотипове съответно -607/CC и -607/CA+AA ($202.70 \pm 27.19 \text{ pg/ml}$ vs. $211.5 \pm 25.91 \text{ pg/ml}$; $p=0.81$; $187.46 \pm 25.57 \text{ pg/ml}$ vs. $214.27 \pm 22.59 \text{ pg/ml}$; $p=0.95$), *фигура 10A*. При разделяне на групите по пол, наблюдаваме значително по-ниски средни нива на IL-18 при жените с ПРМС, носители на генотипа -607/CA+AA спрямо тези на мъжете с ПРМС със същия генотип ($191.48 \pm 25.29 \text{ pg/ml}$ vs. $283.57 \pm 47.36 \text{ pg/ml}$; $p=0.037$), *фигура 10B и 10C*.

Също така, нивата на цитокина в серума на пациентите мъже, носители на -607/CC генотип остават по-високи в сравнение с тези на жените, ($239.99 \pm 33.36 \text{ pg/ml}$ vs. $197.36 \pm 35.38 \text{ pg/ml}$; $p=0.12$). В допълнение на това, се вижда на *фигура 10C*, че при мъжете с ПРМС с генотип -607CA+AA, цитокиновите концентрации са по-високи спрямо тези на контролите със същия генотип, но без достигане на значителна разлика ($283.57 \pm 47.36 \text{ pg/ml}$ vs. $181.89 \pm 32.86 \text{ pg/ml}$; $p=0.12$). Също така, в групата на жените, при пациентките носители на -607CC генотип, се наблюдават малко по-високи серумни нива на IL-18 в сравнение с тези на контролите със същия генотип ($197.36 \pm 35.38 \text{ pg/ml}$ vs 180.36 ± 30.71 ; $p=0.7$). При мъжете се наблюдава същата

тенденция, без статистическа значимост между пациентите и контролите, носители на -607CC генотип ($238.99 \pm 33.36 \text{ pg/ml}$ vs $229.83 \pm 47.61 \text{ pg/ml}$; $p=0.69$).

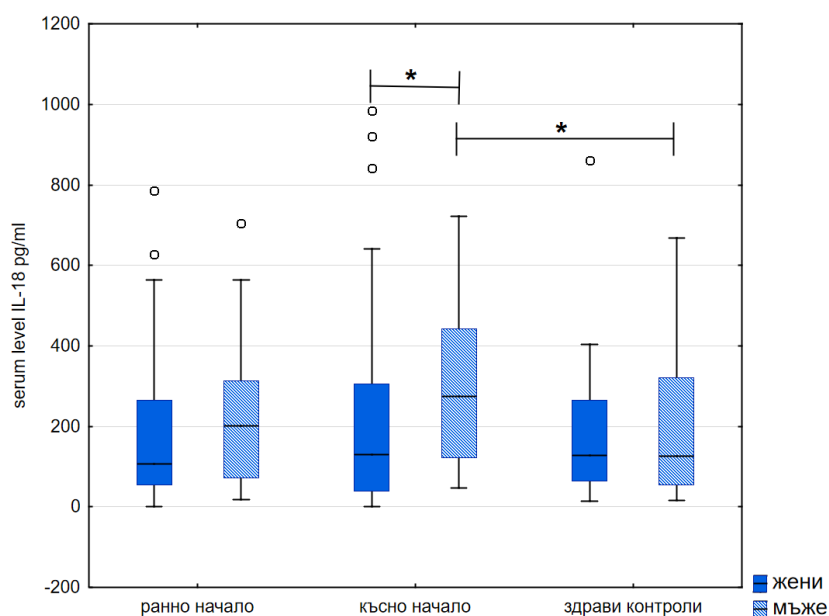


Фигура 10. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ПРМС и здрави контроли в зависимост от -607C/A полиморфизма в *IL18* гена (панел А), съответно разделени по пол – жени (панел В) и мъже (панел С). Резултатите на графиката са представени като медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). * $p < 0.05$ – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

2.2. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ПРМС, в зависимост от началото на заболяването.

На *фигура 11* са представени резултатите от измерените нива на серумен IL-18 при пациентите с ранно начало и на тези с късно начало на ПРМС, и на контролите, разделени

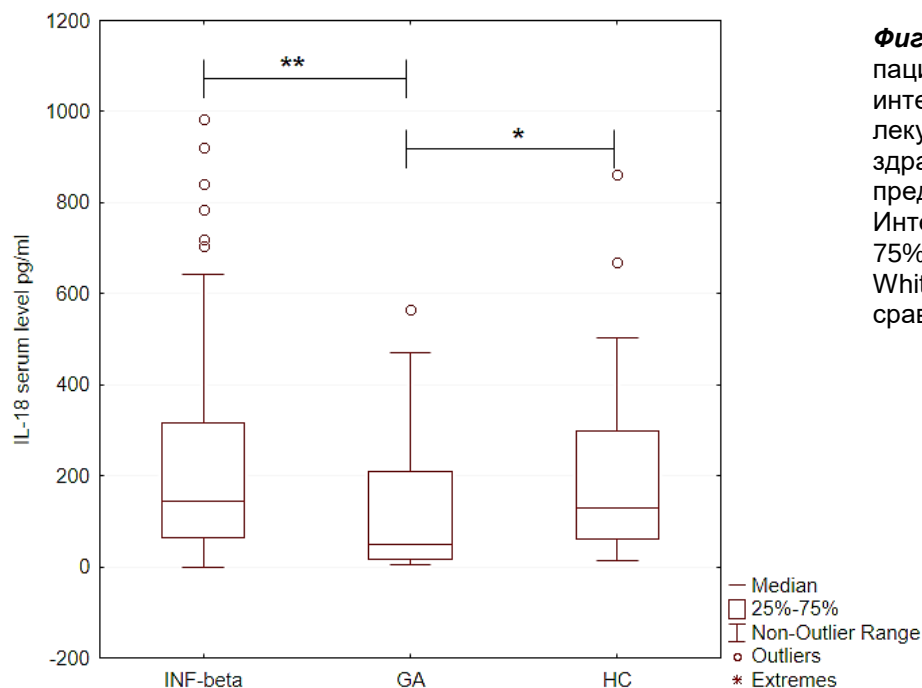
съответно по пол. Статистическият анализ показва, че при мъжете с късно начало на МС (≥ 30 години) се наблюдава значително по-високо серумно ниво цитокина в сравнение с жените с късно начало ($312 \pm 54.55 \text{ pg/ml}$ vs. $204.59 \pm 30.13 \text{ pg/ml}$; $p=0.018$). При пациентите с ранно начало на болестта беше отчетен повишен серумен IL-18 при мъжете в сравнение с тези на жените, без достигане на статистическа достоверност ($235.22 \pm 35.40 \text{ pg/ml}$ vs. $179.90 \pm 23.73 \text{ pg/ml}$; $p=0.107$). Също така, установихме повишени серумни нива на IL-18 при мъжете с късно начало на МС в сравнение със здравите мъже, с достигане на статистическа значима разлика ($312 \pm 54.55 \text{ pg/ml}$ vs. $194.99 \pm 26.64 \text{ pg/ml}$; $p=0.048$), *фигура 11*.



Фигура 11. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ранно и късно начало на заболяването и здрави контроли, в зависимост от пола. Резултатите са представени като медиана с интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). * $p < 0.05$ – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

2.3. Серумни нива на IL-18 при пациенти с ПРМС, в зависимост от вида на болест-модифициращата терапия.

По отношение на вида на прилаганата терапия, пациентите с ПРМС, които са лекувани с IFN- β ($n=129$) показват значително по-висока серумна концентрация на IL-18 в сравнение с тези, лекувани с GA ($n=21$) ($225.97 \pm 18.81 \text{ pg/ml}$ vs. $135.38 \pm 38.15 \text{ pg/ml}$; $p=0.007$). Средните серумни нива на цитокина при здравите контроли са с приблизително близки стойности, в сравнение с тези на пациентите, лекувани с IFN- β ($190.09 \pm 18.39 \text{ pg/ml}$ vs. $225.97 \pm 18.81 \text{ pg/ml}$; $p=0.48$). В допълнение на това на *фигура 21* се вижда, че серумните концентрации на IL-18 при контролите са значително по-високи в сравнение с пациентите с ПРМС, които са лекувани с GA ($190.09 \pm 18.39 \text{ pg/ml}$ vs. $135.38 \pm 38.15 \text{ pg/ml}$ IQR 17.33-210.39; $p=0.015$).



Фигура 12. Серумни нива на IL-18 на пациенти с ПРМС, лекувани с интерферон бета (IFN- β), пациенти лекувани с глатирамер ацетат (GA) и здрави контроли (HC). Резултатите са представени като медиана с Интерквартилен обхват (IQR 25%-75%). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – Mann-Whitney тест е използван за сравнение между групите.

Дискусия

1. Функционално значение на промоторните полиморфизми в цитокиновите гени върху белтъчния продукт на гена.

TGF- β е плейотропен цитокин, играещ разнообразен набор от роли, включващи клетъчна диференциация, имунна регулация и туморна супресия (Huang et al., 2014). TGF- β 1 е основен цитокин за поддържане на баланса между индуцируеми Т регулаторни клетки (iTregs) и Th17 клетки, които секретират провъзпалителни цитокини (Eisenstein et al., 2009).

Нашите резултати показват, че нивата на TGF- β 1 в серума на групата на пациентите с MC, не се различават съществено в сравнение с контролната група. Тези резултати са сходни с данни докладвани от научен колектив при пациентите с MC [Shirvani-Farsani Z et al., 2015]. В други проучвания обаче резултатите са противоположни на нашите [Nicoletti, F., et al., 1998; Rollnik et al., 1997]. Една вероятна причина за това несъответствие е характеристиките на нашата група пациенти, а именно факта, че всички са на биологично лечение и в ремисия. Тези разлики между резултатите могат да се дължат на различни фактори, включително нивото на витамин D или други лекарства, които използват пациентите [Shirvani-Farsani Z et

al.,2015]. В същото време в групата на контролите наблюдаваме значително по-високи серумни нива на TGF- β 1 при мъжете в сравнение с тези при жените ($p=0.039$). В проучване направено от Shirvani-Farsani et al., те откриват положителна връзка между експресията на TGF- β 1 и TGFBR2, както и между TGF- β 2 и TGFBR1 при пациенти с MC [Shirvani-Farsani et al., 2021]. От тук може да се изкаже предположение, че сравнявайки нашите резултати с разгледаните факти може да се изкаже хипотезата, че различията между двата пола в контролната група по отношение на концентрацията на TGF- β 1 вероятно може да се дължи на разлика в експресията на TGFBR1 рецептора, както и на други все още неустановени причини. По отношение на функционалния ефект на полиморфизма на позиция -509C/T в *TGFB1* гена върху серумната концентрация на TGF- β 1, ние установихме, че анализиранияте генотипове на този полиморфизъм не показват значителна корелация с измерените концентрации на цитокина, сравнени в двете групи. Въпреки това, когато разделихме групите по пол, наблюдаваме при пациентите мъже, носители на -509TT генотип най-ниски серумни нива на TGF- β 1 в сравнение с тези носители на -509CT и -509CC генотип. Освен това нашата група пациенти е на биологично лечение, което също би могло да допринесе за промяна в нивата на серумните цитокини. В други проучвания се съобщава, че носители на -509TT генотипа показват по-високи серумни нива на цитокина в сравнение с индивидите, носители на -509CC генотип [Grainger DJ et al., 1999; Guo W et al., 2012; Cao H et al., 2011]. В предишно изследване от нашия колектив най-високи нива на цитокина са измерени при мъже с КРК, които са хомозиготи по *TGFB1* -509T/T генотипа сравнени с CC генотипа [Stanilova et al., 2018]. Според хипотезата на Shah et al 2006, по-високите нива на TGF- β 1 могат да се дължат на наличието на *TGFB1* -509T алела и загубата на негативна регулация, докато *TGFB1* -509C алелът привлича към промотора транскрипционния фактор AP1, вместо транскрипционния фактор hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A) [Shah et al., 2006]. От друга страна, подобно на нашите резултати, са представени данни от друго изследване, които показват, че алелът -509T се свързва с по-слаб афинитет и води до по-ниски нива на експресия [Healy, J et al., 2009]. От получените резултати относно влиянието на *TGFB2* -875G/A SNP върху нивата на TGF- β 1 не бяха установени статистически значими разлики между пациентите и контролите. При мъжете с ПРМС, носители на GA генотипа наблюдаваме по-високи серумни концентрации на цитокина в сравнение с тези хомозиготи по дивия GG и вариантният AA генотип. Известно е, че ефектът на TGF- β 1 върху прицелните клетки се медира от два рецептора, като TGFBR2 е необходим да активира TGFBR1 чрез свързването на TGF- β 1, за да се създаде хетеротетрамерен комплекс, който да индуцира SMAD-зависим или SMAD-независим вътреклетъчен сигнален път (Shi Y et al., 2003). TGF- β 1 сигнализирането се променя при MC и модулирането

на този вътреклетъчен път може да представлява потенциална цел за терапия. Неспособността на Tregs при пациенти с МС да потискат автоимунитета може да се дължи на намалената експресия на TGFBR2 и/или смущения във вътреклетъчния трансдуциращ път. В скорошно проучване беше показано, че експресията на TGFBR2 е намалена в CD4+ Т-клетките на пациенти с РРМС (Meira M et al., 2014). Също така различни мутации в *TGFBR2* могат да допринесат за намалена рецепторна експресия и да инактивират TGF-β1 сигналния път (Derynck R et al., 2001; de Caestecker MP et al., 2000).

Всички пациенти в нашето проучване са били под модифицираща заболяването терапия с IFN-β и GA в продължение на най-малко 6 месеца и по време на измерването на цитокина са били в период на клинично стабилна фаза на заболяването. Въпреки, че понастоящем няма дефинитивно лечение за МС, има терапии които забавят хода на заболяването и облекчаването на симптомите му. GA и IFN-β са имуномодулиращи лекарства, одобрени като ефективни при лечението на множествена склероза, като точният им механизъм на действие все още не е напълно изяснен. GA е първият нестероиден имуномодулатор, различен от интерферон, и е ефективен при намаляване на честотата на рецидивите и натрупването на инвалидност при пациенти с РРМС, а също така е ефикасно и безопасно лечение [Ganji, A et al., 2020; Boster, A.L et al., 2015; Mikol et al., 2008]. Въпреки това, се смята, че GA има двоен механизъм на действие, като от една страна намалява възпалението в периферията и ЦНС и от друга предизвиква освобождаването на невротрофични фактори в ЦНС. Многобройни проучвания показват, че основният механизъм на действие на GA е способността му да променя отговора на Т-клетките от провъзпалителен към противовъзпалителен път (наричан още Th1 към Th2 превключване). GA-индуцираните имунни клетки се натрупват в ЦНС, където секретират противовъзпалителни цитокини в отговор на миелинови антигени [Coyle., 2017; Aharoni R., 2003; Tsareva, E et al., 2016].

IFN-β има сложни имунорегулаторни свойства, които допринасят за лечебния ефект при МС. В клиничната практика обаче много пациенти имат неоптимален отговор към IFN-β [Martínez-Aguilar, L te al., 2020]. Въпреки, че механизмът на действие на IFN-β при МС е сложен и не е напълно разбран, е описан широк спектър от неговите дейности. IFNβ има решаваща роля за развитието на вида придобит имунен отговор, като намалява производството на провъзпалителни цитокини повишава противовъзпалителните цитокини, предотвратява миграцията на активирани имунни клетки през кръвно-мозъчната бариера, инхибира активирането на Т клетките, понижаване на резистентността на Т клетките към апоптоза и насърчаване на ремиелинизацията в ЦНС [Kay, M. et al., 2013]. По отношение на болест-модифициращата терапия, нашите резултати показват значително по-високи TGF-β1 серумни

нива при пациентите с ПРМС, лекувани с GA в сравнение с тези, лекувани с IFN- β и с нивата на здравите контроли. Тези по-високи нива на TGF- β 1 са в съответствие с проучванията относно действието на GA и способността му да усилва диференциацията на Th17 към iTregs, поради което можем да предположим TGF- β 1 като потенциален биомаркер за отговор на лечение с GA при пациенти с MC. Докато по-ниските нива на TGF- β 1 при пациентите лекувани с IFN- β , могат да се дължат на неоптимален отговор към IFN- β , повлиян от различни фактори като генетични (SNPs), фармакодинамика, метаболизъм или механизма на действие на IFN β , което всъщност може да повлиява на ефикасността на това лекарство.

Въпреки, че етиологията на MC остава неизвестна, клинични проучвания предполагат, че повишената експресия на каспаза-1, IL-1b и IL-18 може да бъде свързана с генетичната предиспозиция, прогресията и тежестта на пациентите към MC [Balashov et al. 1999; Karni et al. 2002; Mann et al. 2002]. В нашето проучване наблюдаваме значително по-високи нива на серумен IL-18 при мъжете с ПРМС, отколкото пациентите жени ($p=0.006$). Подобни резултати са докладвани в проучване, проведено при китайски пациенти с MC [Chen YC et al., 2012].

При пациенти с късно начало на заболяването, се наблюдава значителна разлика в нивото на цитокина при мъжете, което е по-високо спрямо това на жените ($p=0.018$), като нивото на серумния IL-18 при мъжете е значително по-високо дори спрямо мъжете от контролната група ($p=0.048$). Нашите резултати показват, че експресията и секрецията на IL-18 в серума на пациентите зависят от пола и от възрастта на началото на поява на ПРМС.

Резултатите от асоциацията на полиморфизма IL-18 -607C/A върху серумните нива на IL-18, не показват значителна разлика при пациентите с ПРМС и контролната група. Подобни резултати са представени и от други автори [Bao J et al., 2015; Hasan F, Naif H, 2017; Orhan et al., 2016]. Въпреки това има данни, които показват, че именно тези два полиморфизма влияят върху експресията на IL-18, като авторите установяват, че хомозиготните пациенти по C на позиция -607 и по G на позиция -137 имат повишени серумни нива на IL-18 в сравнение с другите генотипове [Giedraitis V., 2001]. От друга страна нашите резултати показват, че при жените с ПРМС, носители на CA+AA генотип нивата на IL-18 са значително по-ниски спрямо тези на мъжете със същия генотип. Базирайки се на тези резултати, можем да отбележим, че този полиморфизъм, намиращ се на позиция -607 в промоторния регион на *IL18* гена влияе на продукцията на IL-18 в зависимост от пола. Едно от обясненията за тази връзка може да е поради това, че този полиморфизъм е функционален, дължащ се на субституция на C към A, което нарушава мястото за свързване с cAMP responsive element-binding protein и така повлиява върху транскрипцията на IL-18 и по-слаба продукция. Следователно, CC генотипът

води до по-висока транскрипционна активност в сравнение с другите генотипове, което води до експресия на по-големи количества IL-18 [Han, M., 2011].

Нашите резултати, по отношение на DMT, показват ясна връзка между DMT и серумните концентрации на IL-18. Пациентите с ПРМС, лекувани с GA показват значително по-ниски серумни нива на цитокина в сравнение с тези на пациентите, лекувани с IFN- β и дори спрямо здравите контроли. Тези данни са в съответствие и с други публикувани резултати относно действието на GA, които също предполагат IL-18 като потенциален биомаркер за оценка на отговора при лечение с GA на пациенти с MC [Losy et al., 2002].

В проведено проучване се установява, че лечението с GA води до тенденция за намаляване на нивата на провъзпалителните Th17 и Th1 цитокини и повишаване на антивъзпалителните/регулаторните цитокини на 3-тия и 6-тия месец от началото на лечението при пациентите с ПРМС [Valenzuela et al., 2016].

2. Промоторни полиморфизми на цитокинови гени и тяхната връзка с генетичното предразположение и тежест към ПРМС и КРК.

Генетичните полиморфизми на различни цитокинови гени се асоциират с MC чрез повлияване на тяхната транскрипционна активност и индивидуална вариация в производството на цитокини [Bakr, N et al., 2021]. Много проучвания с използването на животински модели вече разкриха решаващата роля на TGF- β 1 в диференциацията и патогеността на автореактивни Th1 и Th17 клетки в развитието на MC [Gorelik L, et al., 2000; Lee PW et al., 2015; Liu Y et al., 2008]. Получените от нас резултати показаха, че разпределението на генотипните и алелните честоти на *TGFB1* -509C/T SNP е сходно сред пациентите и контролите. Нашите резултати са в съответствие с резултати докладвани от други автори [Green et al., 2001; Weinshenker et al., 2001]. Разделяйки двете групи по пол, резултатите показват, че *TGFB1* -509T алелът и *TGFB1* -509T/T генотипът се асоциира с генетичен намален риск с OR=0.576 при мъжете с ПРМС. Подобни резултати са публикувани за други два SNPs в *TGFB1* гена, свързани с генетична предиспозиция към MC при холандски кавказки пациенти [Schrijver et al., 2004]. Зависимите от пола разлики в генната експресия, особено за *TGFB1* гена, биха могли да обяснят тези резултати.

TGF- β 1 е основен цитокин за поддържане на баланса между индуцируеми Т регулаторни клетки (iTregs) и Th17 клетки, които секретират провъзпалителни цитокини [Eisenstein et al., 2009]. Една от причините за абнормална функционална активност на Tregs да поттискат автоимунитета при пациенти с MC може да се отдаде на намалената експресия на TGFBR2 върху повърхността на Т-клетките. Освен това, Seijo et al. съобщават, че присъствието на

полиморфен вариант А в позиция -875 в промоторната област, повишава транскрипцията на *TGFBR2* в нормални епителни клетки [Seijo et al., 2000]. В нашите резултати не открихме значителна връзка между генотиповете на този полиморфизъм и генетичната предиспозиция към МС, въпреки че пациентите с херерозиготен генотип показаха тенденция към намаляване на честота в групата на пациентите с ПРМС. Според нашите проучвания и доколкото ни е известно, не е била изследвана преди това ролята на *TGFBR2* -875G/A SNP в асоциация с ПРМС. Според началото на дебюта на МС, установяваме, че алелната честота на вариантния А алел остава значително по-висока при пациентите с ранно начало на заболяването спрямо тези с късно начало. Още по-категорично се, че честотата е двукратно по-висока при жените с ранно начало с -875GA генотип в сравнение с тези с късно начало на ПРМС (36% vs. 17%, $p=0.017$). Функционалният полиморфизъм *TGFBR2* -875G/A има потенциала да модулира TGF β 1 - сигналният път, като това може да е едно от обясненията, че вариантния А алел може да се явява като рисков фактор за ранно начало на заболяването.

Добре е известно двойната роля на TGF- β 1 в развитието и прогресията на различни стомашно-чревни видове рак, който действа едновременно като туморен супресор и туморен промотор при различните фази от възникването и прогресията на неоплазията на тумора [Luo J et al., 2019]. Нашите резултати показват, че най-високият генетичен риск за развитие на КРК е установен при носителите на *TGFBR2* -875GG генотипа при мъже. Повишеният риск от развитие на КРК се асоциира с мъжете, които са хомозиготни по *TGFBR2* -875GG генотипа, докато най-ниският риск се свързва с хетерозиготния *TGFBR2* -875GA генотип. Сходни резултати от проучвания са докладвани при рак на стомаха в китайско население и рак на гърдата при жени в Китайска и Бразилска популация [Vitiello et al. 2019; Xu L et al., 2011; Zhang et al., 2011]. В данни от проучвания е установено, че липсващ или инактивиран *TGFBR2* може да има патогенна роля при образуването на КРК както и че това може да доведе от прогресия на неоплазмите на тумора до инвазивен аденокарцином [Biswas et al., 2004; Grady et al., 2006]. В нашето изследване, вариантния *TGFBR2* -875A алел се свързва с генетична протекция по отношение на развитие на КРК при мъжете изразена с OR=0.644. Също така, след като разделихме пациентите с КРК на пациенти с ранен и с напреднал стадий, ние установяваме, че мъжете, носители на поне един *TGFBR2* -875A алел (GA/GA+AA генотип) имат значително намален генетичен риск от развитие на напреднал стадий на КРК. Причините за тези различия в разпределението на генетичните полиморфизми в популациите, обусловени по пол, още не са напълно изяснени. Както добре е известно, TGF- β 1 действа като туморен промотор в напредналите стадии на канцерогенезата на КРК свързани с епително-мезенхимната

трансформация на туморните клетки, като по-високата експресия на TGF- β 1 е свързана с рецидив и намален процент на преживяемост при пациентите [Friedman E et al., 1995; Robson H et al., 1996].

Въз основа на множеството гени и SNPs участващи в патогенезата на МС и нашите резултати за двата промоторни полиморфизма, анализахме какъв би бил комбинативният им ефект в един генотип към генетичното предразположение към ПРМС. Най-значимата асоциация, която наблюдаваме е при пациенти с ПРМС носители на *TGFB1* -509T/T и *TGFBR2* -875G/A генотипове, при които има най-добре изразен генетичен протективен ефект (OR=0.357; p=0.032). Освен това, когато генотипът при мъжете с ПРМС, състоящ се от поне един *TGFB1* -509T алел (носители на двата *TGFB1* -509C/T и *TGFB1* -509T/T генотипа) в комбинация с хетерозиготния *TGFBR2* -875G/A генотип, то генетичният риск от ПРМС се намалява приблизително четири пъти, в сравнение с мъже, носители на двата типа див хомозиготен генотип *TGFB1* -509C/C и *TGFBR2* -875G/G (OR=0.268, p=0.018). Въпреки, че не се отнасят за МС сходни на нашите резултати, са публикувани данни от други автори за участието на тези два полиморфизма в генетичната предиспозиция за рак [Jin et al., 2007; Jin G, Wang et al., 2008]. Вариантният -509T алел може да увеличи транскрипционната активност сравнена с -509C алела, чрез повишаване афинитета на транскрипционния фактор Yin Yang 1 (YY1) към промотора и да се повишат серумните нива на TGF- β 1 [Luedecking et al. 2000; Silverman et al., 2004; Shah et al 2006]. Вариантният -875/A алел в *TGFBR2* гена повишава транскрипционната активност в нормални епителни клетки [Seijo et al., 2001]. Вземайки в предвид тези факти, както и това че TGF- β 1 серумните нива на пациентите, носители на комбинацията от *TGFB1* -509TT и *TGFBR2* -875GA генотипове, са повишени спрямо тези на контролите със същата комбинация от генотипове, можем да изкажем хипотезата, че тази комбинация би могла да оказва протективен ефект към генетична предиспозиция към ПРМС.

В същото време, нашите резултати показват, че комбинацията от *TGFB1* -509C/C генотип с *TGFBR2* -875G/A / *TGFBR2* -875A/A генотип е много по-податлив генотип за ранно начало на ПРМС (OR=3.757, p=0.019). Когато разделихме групите по пол, установихме, че тази комбинация от генотипове се асоциира с по-висок генетичен риск от ранно начало на ПРМС при жените (OR=3.742, p=0.030). Тези резултати ясно демонстрират значението на двата полиморфизма за генетичното предразположение към ПРМС. По този начин нашите данни потвърждават предишни резултати от много други проучвания за ролята на сигналният път на TGF- β 1 в развитието на това автоимунно заболяване, медирано от диференциацията на Т-клетките. Неотдавна бяха открити нови доказателства за въздействието на miRNA върху сигналният път на TGF- β 1 и неговата дисрегулация при множествената склероза [Severin et

al., 2016]. По този начин е възможно комбинацията от *TGFB1* -509C/C и *TGFBR2* -875G/A / *TGFBR2* -875A/A генните полиморфизми да оказва синергичен ефект върху предразположението към ранно начало на ПРМС.

Нашите резултати не показват значими разлики в разпределението на генотипните честоти на *IL18* -607C/A SNP между пациентите с ПРМС и здравите контроли, въпреки че генотипната честота на CA+AA генотипа при жените с МС е по-висока в сравнение с тази на мъжете с МС. По отношение на началото на дебюта на ПРМС също не бяха установени разлики при разпределението на генотипите. Съобщава се, че вариантния А алел променя афинитета на cAMP responsive element-binding protein и засяга транскрипцията на IL-18 както и нивата на неговата продукция [Li J et al., 2014]. В редица проучвания се открива асоциация на този SNP с риска от МС в египетска, иранска, турска популация, както и генетичната предиспозиция към различни видове рак [Bakr et al., 2021; Jahanbani-Ardakani et al., 2019; Orhan et al., 2016; Back et al., 2014; Zhao et al., 2017; Yuanyuan et al., 2019]. Причините за разликата в отчетените резултати сред горните проучвания може да са резултат от вариабилността в генотипното разпределение на *IL18* -607C/A сред различните етнически популации, размера на изследваните кохорти, раса, географска област както и от факторите на околната среда, които участват в патогенезата на МС.

3. Заключение

В заключение, можем да отбележим, че за първи път ние демонстрираме връзка между генотипа *TGFB1* -509C/T, както и *TGFBR2* -875G/A към генетичната предиспозиция към ПРМС. Мъжете носители на поне един *TGFB1* -509T алел имат по-нисък генетичен риск от развитие на ПРМС, който е допълнително намален, когато генотипът съществува съвместно с *TGFBR2* -875A алела. Комбинацията от носителството на тези генотипи играе защитна роля за всички пациенти в нашата група, докато комбинацията от *TGFB1* -509C/C и *TGFBR2* -875G/A / *TGFBR2* -875A/A изглежда, че предразполага към ранно начало на развитие на ПРМС. Също така настоящото ни проучване показва значителни разлики в серумното ниво на TGF-β1 и IL-18 при пациенти с ПРМС в зависимост от техния пол и терапия, които могат да се използват като потенциални биомаркери за по-прецизни терапевтични стратегии. Нашите резултати показват, че *TGFBR2* -875GA и AA генотипове са свързани с намален риск от КРК, като мъжете, носители на А алел имат по-нисък риск от развитие и прогресия на КРК.

Изводи

1. Промоторният полиморфизъм -509C/T в *TGFB1* е асоцииран с генетичното предразположение към развитие на ПРМС и влияе на серумната концентрация на цитокина. Хомозиготният генотип по вариантния алел е протективен фактор при мъже и се асоциира с понижена серумна концентрация на цитокина.
2. Промоторният полиморфизъм на -875G/A в гена за рецептора на TGF- β 1 (*TGFBR2*) е асоцииран с дебюта на ПРМС, като носителството на вариантния алел е рисков за ранно начало на заболяването.
3. Комбинирането на вариантите алели по двата изследвани полиморфизма, в *TGFB1* и неговият рецептор, в общ генотип има различен генетичен ефект върху развитието на ПРМС в зависимост от пола. При мъже води до понижен генетичен риск от развитие на ПРМС, докато при жени комбинацията от CC/GA+AA е рисков фактор за ранно начало.
4. Полиморфизмът -875G/A в гена за рецептора TGF- β 1 не влияе съществено на серумните нива на TGF- β 1, но в комбинацията с -509C/T полиморфизма в гена за цитокина води до слабо повишение на концентрациите на цитокина в серума на пациентите с -509TT /-875GA генотипове.
5. Промоторният полиморфизъм на -875G/A в гена за рецептора на TGF- β 1 (*TGFBR2*) е асоцииран с развитието на колоректален рак, като вариантният алел носи 2 пъти по-нисък генетичен риск за развитието на заболяването.
6. Установено е участието на IL-18 в патогенезата на ПРМС особено отчетливо при мъжете, носители на вариантния -607A алел и при тези с късен дебют на заболяването.
7. Болест-модифициращото лечение на ПРМС повлиява серумните нива на TGF- β 1 и IL-18, като терапията с GA води до значително повишение на TGF- β и понижение на IL-18 в сравнение с лечението с IFN- β .

Приноси

С оригинален характер:

1. Доказани са полово-специфични разлики във функционалният ефект на изследваните полиморфизми при пациенти с ПРМС и КРК.
2. Установен е синергичният ефект на алели -509T в *TGFB1* и -875A в *TGFBR2*, които са протективни по отношение на развитието на -ПРМС при мъже.
3. Установена е значимата роля на комбинация от *TGFB1* -509C/C генотип и *TGFBR2* -875G/A + *TGFBR2* -875A/A генотип като рискови фактори за ранна проява на ПРМС, под 30 годишна възраст при жени.
4. Установена е протективната роля на хетерозиготното носителство по *TGFBR2* -875GA полиморфизма в предразположеността към КРК при мъже.

С потвърдителен характер:

1. Потвърдено е участието на TGF- β 1 и IL-18 в имунопатогенетичните механизми на ПРМС както и тяхното повлияване от провежданата терапия.
2. Потвърждава се функционалният ефект на изследваните полиморфизми в промоторните области на *TGFB1* и *IL18* гените.

Списък на публикации и участия в научни форуми, във връзка с дисертационния труд

Публикации:

1. Grigorova A, Trenova A, Stanilova S. A link between promoter polymorphisms of the transforming growth factor β 1 (TGFB1) and TGF- β 1 receptor II (TGFB2) genes and relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathol.* 2020;58(4):307-316. doi: 10.5114/fn.2020.102433. PMID: 33480235. (SJR₂₀₂₀=0.459) Q3, (IF₂₀₂₀= 2.038), Q3.
2. Grigorov, B., Trenova, A., Grigorova, A., & Stanilova, S. (2020). IL-18 promoter polymorphism and IL-18 serum levels in association with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers*, 26(4), 3475-3480. (SJR₂₀₂₀=0.225) Q3.
3. Stanilov, N., Grigorova, A., Velikova, T., & Stanilova, S. A. (2021). Genetic variation of TGFBR2 as a protective genotype for the development of colorectal cancer in men. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(11), 1766. (SJR₂₀₂₁=0.761) Q2, (IF₂₀₂₁=3.404), Q3.

Участия в научни форуми:

1. Grigorova A., Trenova A., Stanilova S. Promotor polymorphism in TGFB2 is associated with RRMS onset. *SECOND YOUNG SCIENTISTS SEMINAR ON GENETICS WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION – SGIP 2018*, October 3-5, 2018, Sofia, Poster session-MHGP-2.
2. Grigorova A., Trenova A., Stanilova S. TGFB1 and TGFB2 promoter polymorphisms in relapsing-remitting multiple sclerosis. *5th NATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY*, October 25-28, 2018 Plovdiv, Bulgaria, poster session1- P1.4.
3. Grigorov B, Trenova A, Grigorova A, Stanilova S. IL-18 promoter polymorphism and IL-18 serum levels in association with relapsing-remitting multiple sclerosis. 29th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria IMAB, 9-12 May 2019, Varna, Bulgaria, poster session – MP-32.

Научно-изследователски проекти във връзка с дисертационния труд:

1. Научно-изследователски проект към Тракийски Университет, НИП № 2/2017
Тема на проекта: Регулация и динамика на Treg и Th17 цитокиновия синтез.
2. Научно-изследователски проект към Тракийски Университет, НИП № 3/2017
Тема на проекта: Проучвания върху индуцираната експресия на проинфламаторни и процесирани по инфламозомен път цитокини и нейната регулация от вътреклетъчни активационни и сигнални пътища.
3. Научно-изследователски проект към Медицински факултет, Тракийски Университет НИП №2/2019
Тема на проекта: Отклонения в генната експресия в цитокини от Th1/Th17 – остта в зависимост от генотипа при имуномедиирани заболявания.

Summary

It is well known that dysregulation of cytokine synthesis is involved in the development of autoimmune and allergic diseases at the time and place of the development of the immune response. In recent years, data has been accumulated that disturbances in the balance of cytokines have an essential role in the development of malignant diseases. With an emphasis on the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines, promoter polymorphisms in both the *TGFB1* gene and its receptor *TGFBR2* and the *IL18* gene have the potential to influence the severity and susceptibility to various immune-mediated diseases including autoimmune and oncological disorders.

The current study aimed - to investigate the association of selected cytokine gene polymorphisms in *TGFB1* (*TGFB1* -509C/T) its receptor *TGFBR2* (*TGFBR2* -875G/A) and *IL18* (*IL18* -607C/A) on serum cytokine concentrations and genetic predisposition to immune-mediated diseases, such as multiple sclerosis (MS) and colorectal cancer (CRC) among Bulgarian female and male patients.

Genotyping of the selected genetic polymorphisms was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR, by primer-introduced restriction analysis (PIRA)-PCR and by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR. Serum concentrations of TGF- β 1 and IL-18 were determined by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical data processing was performed using Statistica version 12.0.

This study included a group of 183 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), consisting of 132 women and 51 men, who were diagnosed with RRMS according to McDonald's criteria (2010). The average age of patients with RRMS was 40.50 ± 9.01 years. Also, 184 histologically confirmed patients with colorectal carcinoma (CRC) were studied. The study also included 307 healthy controls - 240 females and 67 males, with a mean ($\pm$ SD) age of 42.28 ± 13.28 years.

The results regarding *TGFB1* -509C/T single nucleotide polymorphism (SNP) indicated that the homozygous TT genotype was associated with a 2.7-fold reduced genetic risk of developing RRMS in males compared to the CC genotype. With regards to the *TGFBR2* -875G/A SNP we found that in women with RRMS, carrying the variant A allele in homo- or heterozygous genotype was associated with a 2.3-fold increased genetic risk of early onset of disease compared to the carriers of the G allele. Based on the obtained data, we analyzed the effect of the combination of the both SNPs and demonstrated that carrying of the -509T and -875A variant alleles in a homo- or heterozygous genotype was associated with a reduced genetic risk of RRMS compared with homozygous genotypes. In addition, the -509CC and -875GA/AA genotypes were associated with a 3.7-fold higher risk of early-onset RRMS in women. Also, our results demonstrated that the *TGFBR2* -875AG and

AA genotypes were associated with a reduced risk for the development and progression of CRC in men. Regarding to the *IL18* -607C/A promoter SNP our results showed no significant differences between allele and genotype distribution among RRMS patients and controls.

The results showed that the serum levels of TGF- β 1 and IL-18 in patients with RRMS were significantly influenced by gender, the genotype of study polymorphisms as well as by the type of disease-modifying therapy. Men with RRMS, carriers of the *TGFB1* -509T allele, showed lower cytokine serum levels in comparison with carriers of the C-allele. A significantly increased IL-18 level was observed in men with RRMS, carriers of the -607/CA+AA genotype than in women. In addition, the therapy with glatiramer acetate was associated with significantly higher TGF- β 1 and lower IL-18 serum levels in comparison with therapy with IFN- β .

In conclusion, our results showed that studied promoter polymorphisms may be accepted as potential genetic factors influencing the predisposition and severity to immune-mediated diseases such as multiple sclerosis and colorectal cancer. In addition, sex-specific differences in the functional effect of the studied polymorphisms might contribute to the sex bias in immune responses in RRMS and CRC.

Библиография

- Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14157-62. doi: 10.1073/pnas.2336171100. Epub 2003 Nov 12. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 23;102(34):12288. PMID: 14614135; PMCID: PMC283562.
- Back LK, Farias TD, da Cunha PA, Muniz YC, Ribeiro MC, Fernandes BL, Fernandes CK, de Souza IR. Functional polymorphisms of interleukin-18 gene and risk of breast cancer in a Brazilian population. *Tissue Antigens*. 2014 Aug;84(2):229-33. doi: 10.1111/tan.12367. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24898701.
- Bakr NM, Hashim NA, El-Baz HAE, Khalaf EM, Elharoun AS. Polymorphisms in proinflammatory cytokines genes and susceptibility to Multiple Sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021 Jan;47:102654. doi: 10.1016/j.msard.2020.102654. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33302229.
- Bakr NM, Hashim NA, El-Baz HAE, Khalaf EM, Elharoun AS. Polymorphisms in proinflammatory cytokines genes and susceptibility to Multiple Sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021 Jan;47:102654. doi: 10.1016/j.msard.2020.102654. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33302229.
- Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6873-8. doi: 10.1073/pnas.96.12.6873. PMID: 10359806; PMCID: PMC22009.
- Bao J, Lu Y, Deng Y, Rong C, Liu Y, Huang X, Song L, Li S, Qin X. Association between IL-18 polymorphisms, serum levels, and HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population: a retrospective case-control study. *Cancer Cell Int*. 2015 Jul 25;15:72. doi: 10.1186/s12935-015-0223-z. PMID: 26213495; PMCID: PMC4513629.
- Biswas S, Chytil A, Washington K, Romero-Gallo J, Gorska AE, Wirth PS, Gautam S, Moses HL, Grady WM. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4687-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3255. PMID: 15256431.
- Boster, A. L., Ford, C. C., Neudorfer, O., & Gilgun-Sherki, Y. (2015). Glatiramer acetate: long-term safety and efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics*, 15(6), 575-586.
- Cao H, Zhou Q, Lan R, Røe OD, Chen X, Chen Y, Wang D. A functional polymorphism C-509T in TGFβ-1 promoter contributes to susceptibility and prognosis of lone atrial fibrillation in Chinese population. *PLoS One*. 2014 Nov 17;9(11):e112912. doi: 10.1371/journal.pone.0112912. PMID: 25402477; PMCID: PMC4234495.
- Chen YC, Chen SD, Miao L, Liu ZG, Li W, Zhao ZX, Sun XJ, Jiang GX, Cheng Q. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2012 Feb 29;243(1-2):56-60. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.12.008. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22230485.
- Coyle, P. K. (2017). Pharmacogenetic biomarkers to predict treatment response in multiple sclerosis: current and future perspectives. *Multiple sclerosis international*, 2017.
- de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sep 6;92(17):1388-402. doi: 10.1093/jnci/92.17.1388. PMID: 10974075.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):117-29. doi: 10.1038/ng1001-117. Erratum in: *Nat Genet* 2001 Nov;29(3):351. PMID: 11586292.
- Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res*. 2009 May;65(5 Pt 2):26R-31R. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e76c7. PMID: 19218879.
- Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res*. 2009 May;65(5 Pt 2):26R-31R. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e76c7. PMID: 19218879.

- Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 Jul-Aug;4(5):549-54. PMID: 7549813.
- Ganji, A., Monfared, M. E., Shapoori, S., Nourbakhsh, P., Ghazavi, A., Ghasami, K., & Mosayebi, G. (2020). Effects of interferon and glatiramer acetate on cytokine patterns in multiple sclerosis patients. *Cytokine*, 126, 154911.
- Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol.* 2001 Jan 1;112(1-2):146-52. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00407-0. PMID: 11108943.
- Gorelik, L., & Flavell, R. A. (2000). Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*, 12(2), 171-181.
- Grady WM, Willis JE, Trobridge P, Romero-Gallo J, Munoz N, Olechnowicz J, Ferguson K, Gautam S, Markowitz SD. Proliferation and Cdk4 expression in microsatellite unstable colon cancers with TGFBR2 mutations. *Int J Cancer.* 2006 Feb 1;118(3):600-8. doi: 10.1002/ijc.21399. PMID: 16108056.
- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):93-7. doi: 10.1093/hmg/8.1.93. PMID: 9887336.
- Green AJ, Barcellos LF, Rimmler JB, Garcia ME, Caillier S, Lincoln RR, Bucher P, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL, Oksenberg JR; Multiple Sclerosis Genetics Group. Sequence variation in the transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene and multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol.* 2001 May 1;116(1):116-24. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00283-1. PMID: 11311337.
- Guo W, Dong Z, Guo Y, Chen Z, Yang Z, Kuang G. Association of polymorphisms in transforming growth factor- β receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Biol Rep.* 2012 Apr;39(4):4301-9. doi: 10.1007/s11033-011-1217-0. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21785915.
- Hasan, F. T., & Naif, H. M.. Association of gene polymorphisms and serum levels of IL-18 with the susceptibility to infection with hepatitis B virus. *J Infect Dis Med.* 2017; 2(3), 117-25.
- Healy J, Dionne J, Bélanger H, Larivière M, Beaulieu P, Labuda D, Sinnett D. Functional impact of sequence variation in the promoter region of TGFB1. *Int J Cancer.* 2009 Sep 15;125(6):1483-9. doi: 10.1002/ijc.24526. PMID: 19536820.
- Huang YS, Zhong Y, Yu L, Wang L. Association between the TGFBR2 G-875A polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(20):8705-8. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8705. PMID: 25374194.
- Jahanbani-Ardakani H, Alsahebhosoul F, Etemadifar M, Abtahi SH. Interleukin 18 Polymorphisms and its serum level in Patients with Multiple Sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol.* 2019 Oct-Dec;22(4):474-476. doi: 10.4103/aian.AIAN_515_18. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31736573; PMCID: PMC6839318.
- Jin G, Deng Y, Miao R, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Wang L, Chen W, Shen J, Wang X, Xu Y, Shen H. TGFB1 and TGFBR2 functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008 Mar;134(3):345-51. doi: 10.1007/s00432-007-0290-1. Epub 2007 Aug 7. PMID: 17680270.
- Jin G, Wang L, Chen W, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Shen J, Zhang Z, Wang X, Xu Y, Shen H. Variant alleles of TGFB1 and TGFBR2 are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer.* 2007 Mar 15;120(6):1330-5. doi: 10.1002/ijc.22443. PMID: 17187359.

- Karni A, Koldzic DN, Bharanidharan P, Khoury SJ, Weiner HL. IL-18 is linked to raised IFN-gamma in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J Neuroimmunol.* 2002 Apr;125(1-2):134-40. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00018-8. PMID: 11960649.
- Kay M, Hojati Z, Dehghanian F. The molecular study of IFN β pleiotropic roles in MS treatment. *Iran J Neurol.* 2013;12(4):149-56. PMID: 24250925; PMCID: PMC3829308.
- Lee PW, Yang Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. Analysis of TGF- β 1 and TGF- β 3 as regulators of encephalitogenic Th17 cells: Implications for multiple sclerosis. *Brain Behav Immun.* 2015 May;46:44-9. doi: 10.1016/j.bbi.2014.12.007. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25499467; PMCID: PMC4414699.
- Li J, Wu S, Wang MR, Wang TT, Li BK, Zhu JM. Association of the interleukin-18 -137 C/G, -607 A/C polymorphisms with type 1 diabetes: A meta-analysis. *Biomed Rep.* 2014 Jan;2(1):57-62. doi: 10.3892/br.2013.186. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24649069; PMCID: PMC3916980.
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):632-40. doi: 10.1038/ni.1607. Epub 2008 Apr 27. PMID: 18438410.
- Losy, J., Michałowska-Wender, G., & Wender, M. Interleukin 12 and interleukin 10 are affected differentially by treatment of multiple sclerosis with glatiramer acetate (Copaxone). *Folia neuropathologica* 2002; 40(4), 173-175.
- Luedecking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 2000 May;106(5):565-9. doi: 10.1007/s004390000313. PMID: 10914688.
- Luo J, Chen XQ, Li P. The Role of TGF- β and Its Receptors in Gastrointestinal Cancers. *Transl Oncol* 2019; **12**: 475-484. doi: 10.1016/j.tranon.2018.11.010. PMID: 30594036
- Mann CL, Davies MB, Stevenson VL, Leary SM, Boggild MD, Ko Ko C, Jones PW, Fryer AA, Strange RC, Thompson AJ, Hawkins CP. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. *J Neuroimmunol.* 2002 Aug;129(1-2):197-204. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00181-9. PMID: 12161036.
- Martínez-Aguilar, L., Pérez-Ramírez, C., del Mar Maldonado-Montoro, M., Carrasco-Campos, M. I., Membrive-Jiménez, C., Martínez-Martínez, F., ... & Jiménez-Morales, A. (2020). Effect of genetic polymorphisms on therapeutic response in multiple sclerosis relapsing-remitting patients treated with interferon-beta. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 785, 108322.
- Meira M, Sievers C, Hoffmann F, Rasenack M, Kuhle J, Derfuss T, Kappos L, Lindberg RL. Unraveling natalizumab effects on deregulated miR-17 expression in CD4+ T cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol Res.* 2014;2014:897249. doi: 10.1155/2014/897249. Epub 2014 May 12. PMID: 24901013; PMCID: PMC4036714.
- Mikol, D. D., Barkhof, F., Chang, P., Coyle, P. K., Jeffery, D. R., Schwid, S. R., ... & Uitdehaag, B. M. (2008). Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *The Lancet Neurology*, 7(10), 903-914.
- Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, Zacccone P, Stivala F, Meroni PL, Reggio A. Blood levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon-beta 1b (IFN-beta1b). *Clin Exp Immunol.* 1998 Jul;113(1):96-9. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00604.x. PMID: 9697990; PMCID: PMC1905006.
- Orhan G, Erucar E, Mungan SÖ, Ak F, Karahalil B. The association of IL-18 gene promoter polymorphisms and the levels of serum IL-18 on the risk of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2016 Jul;146:96-101. doi: 10.1016/j.clineuro.2016.04.027. Epub 2016 May 3. PMID: 27177146.

- Orhan G, Eruyar E, Mungan SÖ, Ak F, Karahalil B. The association of IL-18 gene promoter polymorphisms and the levels of serum IL-18 on the risk of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2016 Jul;146:96-101. doi: 10.1016/j.clineuro.2016.04.027. Epub 2016 May 3. PMID: 27177146.
- Robson H, Anderson E, James RD, Schofield PF. Transforming growth factor beta 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. *Br J Cancer.* 1996 Sep;74(5):753-8. doi: 10.1038/bjc.1996.432. PMID: 8795578; PMCID: PMC2074698.
- Rollnik JD, Sindern E, Schweppe C, Malin JP. Biologically active TGF-beta 1 is increased in cerebrospinal fluid while it is reduced in serum in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 1997 Aug;96(2):101-5. doi: 10.1111/j.1600-0404.1997.tb00248.x. PMID: 9272186.
- Schrijver HM, Crusius JB, García-González MA, Polman CH, Peña AS, Barkhof F, Uitdehaag BM. Gender-related association between the TGFB1+869 polymorphism and multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res.* 2004 Sep;24(9):536-42. doi: 10.1089/jir.2004.24.536. PMID: 15450129.
- Seijo ER, Song H, Lynch MA, Jennings R, Qong X, Lazaridis E, Muro-Cacho C, Weghorst CM, Muñoz-Antonia T. Identification of genetic alterations in the TGFbeta type II receptor gene promoter. *Mutat Res.* 2001 Nov 1;483(1-2):19-26. doi: 10.1016/s0027-5107(01)00217-2. PMID: 11600128.
- Seijo ER, Song H, Lynch MA, Jennings R, Qong X, Lazaridis E, Muro-Cacho C, Weghorst CM, Muñoz-Antonia T. Identification of genetic alterations in the TGFbeta type II receptor gene promoter. *Mutat Res.* 2001 Nov 1;483(1-2):19-26. doi: 10.1016/s0027-5107(01)00217-2. PMID: 11600128.
- Severin ME, Lee PW, Liu Y, Selhorst AJ, Gormley MG, Pei W, Yang Y, Guerau-de-Arellano M, Racke MK, Lovett-Racke AE. MicroRNAs targeting TGFβ signalling underlie the regulatory T cell defect in multiple sclerosis. *Brain.* 2016 Jun;139(Pt 6):1747-61. doi: 10.1093/brain/aww084. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27190026; PMCID: PMC4892757.
- Shah R, Hurley CK, Posch PE. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta1 expression due to the common SNP -509C-T (c. -1347C > T). *Hum Genet.* 2006 Nov;120(4):461-9. doi: 10.1007/s00439-006-0194-1. Epub 2006 Aug 1. PMID: 16896927.
- Shah R, Hurley CK, Posch PE. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta1 expression due to the common SNP -509C-T (c. -1347C > T). *Hum Genet.* 2006 Nov;120(4):461-9. doi: 10.1007/s00439-006-0194-1. Epub 2006 Aug 1. PMID: 16896927.
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x. PMID: 12809600.
- Shirvani-Farsani Z, Behmanesh M, Mohammadi SM, Naser Moghadasi A. Vitamin D levels in multiple sclerosis patients: Association with TGF-β2, TGF-βRI, and TGF-βRII expression. *Life Sci.* 2015 Aug 1;134:63-7. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.017. Epub 2015 May 31. PMID: 26037400.
- Shirvani-Farsani, Z., Behmanesh, M., & Sahraian, M. A. (2021). TGF-β Isoforms and Receptors: A Gene Expression Analysis in Multiple Sclerosis Patients and Normal Individuals.
- Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, Faffe DS, Shikanai T, Raby BA, Weiss ST, Shore SA. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan 15;169(2):214-9. doi: 10.1164/rccm.200307-973OC. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14597484.
- Stanilova S, Stanilov N, Julianov A, Manolova I, Miteva L. Transforming growth factor-β1 gene promoter -509C/T polymorphism in association with expression affects colorectal cancer development and depends on gender. *PLoS One.* 2018 Aug 2;13(8):e0201775. doi: 10.1371/journal.pone.0201775. PMID: 30071009; PMCID: PMC6072135.

- Valenzuela RM, Kaufman M, Balashov KE, Ito K, Buyske S, Dhib-Jalbut S. Predictive cytokine biomarkers of clinical response to glatiramer acetate therapy in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016 Nov 15;300:59-65. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.06.005. Epub 2016 Jul 2. PMID: 27390072.
- Vitiello GAF, Amarante MK, Banin-Hirata BK, Campos CZ, de Oliveira KB, Losi-Guembarovski R, Watanabe MAE. Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) promoter region polymorphism in Brazilian breast cancer patients: association with susceptibility, clinicopathological features, and interaction with TGFB1 haplotypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Nov;178(1):207-219. doi: 10.1007/s10549-019-05370-1. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31364002.
- Weinshenker BG, Hebrink D, Kantarci OH, Schaefer-Klein J, Atkinson E, Schaid D, McMurray CM. Genetic variation in the transforming growth factor beta1 gene in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001 Nov 1;120(1-2):138-45. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00424-6. PMID: 11694328.
- Xu L, Zeng Z, Chen B, Wu X, Yu J, Xue L, Tian L, Wang Y, Chen M, Sung JJ, Hu P. Association between the TGFB1 -509C/T and TGFB2 -875A/G polymorphisms and gastric cancer: a case-control study. *Oncol Lett.* 2011 Mar;2(2):371-377. doi: 10.3892/ol.2011.249. Epub 2011 Jan 21. PMID: 22866090; PMCID: PMC3410591.
- Yuanyuan G, Xue Y, Yachao L, Xiao F, Xu C. Association between IL-18 -607 C/A Polymorphism and the Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Jun 1;20(6):1595-1602. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.6.1595. PMID: 31244277; PMCID: PMC7021598.
- Zhang M, Guo LL, Cheng Z, Liu RY, Lu Y, Qian Q, Lei Z, Zhang HT. A functional polymorphism of TGFB2 is associated with risk of breast cancer with ER(+), PR(+), ER(+)PR(+) and HER2(-) expression in women. *Oncol Lett.* 2011 Jul;2(4):653-658. doi: 10.3892/ol.2011.312. Epub 2011 May 13. PMID: 22848244; PMCID: PMC3406483.
- Zhao, Y., Wang, S., Zhang, Z., Qin, C., Yang, X., & Xie, Q. Association of IL-18 genetic polymorphisms and haplotypes with breast cancer risk in a Chinese population. *Biomed Res.* 2017, 28(19), 8433-7.

Благодарности

Изказвам моята най-сърдечна благодарност на научния ми ръководител проф. Спаска Станилова за ценните съвети, експертното ръководство и насоките при разработването и оформянето на настоящия дисертационен труд!

Отправлям моите благодарности към колегите от катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ за техническата помощ и приятелска подкрепа!

Огромна благодарност изказвам към моя съпруг и семейството ми за безрезервната подкрепа и търпение, което ми даде сили да завърша това мое начинание!