

УДК: 616/618, 616-074, 614.88:621.039.586713, 575.113.616.831:616-006.6:616-001.28

Ж. М. Мінченко<sup>1</sup>, О. О. Дмитренко<sup>1</sup>, Т. Ф. Любарець<sup>2</sup>✉, Ю. О. Сілаєв<sup>1</sup>, Д. О. Строй<sup>3</sup>,  
В. В. Балан<sup>1</sup>, Т. Ю. Шляхтиченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна

<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна

<sup>3</sup>Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, м. Київ, 01024, Україна

## КОМПЛЕКСНИЙ АНАЛІЗ РОЛІ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ЦИТОКІНІВ ЯК ПРОГНОСТИЧНОГО ЧИННИКА РИЗИКУ ПЛАЗМОКЛІТИННОЇ МІЕЛОМИ У ОСІБ, ПОСТРАЖДАЛИХ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС

**Мета:** надати порівняльну характеристику поширеності поліморфних варіантів генів цитокінів у хворих на плазмноклітинну мієлому (ПКМ), постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи, та пацієнтів, які контактували з іонізуючим випромінюванням в межах природного радіаційного фону, на підставі зіставлення з популяційним контролем для визначення їх внеску як генетичних маркерів ризику захворювання.

**Матеріали і методи.** Молекулярно-генетичні дослідження поліморфізму генів цитокінів (*TNF-α*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN-γ*) та комплексного аналізу частот зустрічальності в три-, чотири-, п'ятилокусних комбінаціях їх алельних варіантів як прогностичних маркерів ризиків плазмноклітинної мієломи проведено у 102 пацієнтів – 56 постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС та 46 хворих, опромінених у межах природного радіаційного фону, у зіставленні з групою контролю (364 практично здорових осіб, жителів Центрального гено-географічного регіону України).

**Результати.** Встановлено тотожне вірогідне підвищення поширеності генотипу *TGF-β codon 10 T/T* гена *TGF-β1* в групах опромінених внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС і неопромінених хворих. У хворих на плазмноклітинну мієлому визначено протективний ефект для *IL-10 -1082 A/G* і асоціація з ризиком виникнення захворювання для *IL-10 -1082 G/G*.

**Висновок.** Вірогідна відмінність частоти генотипу *TGF-β codon 10 T/T* в групах спостереження щодо контрольної групи надає підставу розглядати цей однонуклеотидний поліморфізм гена *TGF-β1* як незалежний від екзогенних чинників імуногенетичний фактор схильності до розвитку ПКМ. Дослідження внеску мультигенних комбінацій взаємодії «ген–ген» свідчить про їх роль в механізмах виникнення плазмноклітинної мієломи і підтверджує наявність адитивної взаємодії.

**Ключові слова:** плазмноклітинна мієлома, цитокіни *TNF-α*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN-γ*, іонізуюче випромінювання, аварія на Чорнобильській АЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2022. Вип. 27. С. 374–384. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-374-384

✉ Любарець Тетяна Федорівна, e-mail: tliubarets@yahoo.com

Zh. M. Minchenko<sup>1</sup>, O. O. Dmytrenko<sup>1</sup>, T. F. Liubarets<sup>2</sup>✉, Yu. O. Silaev<sup>1</sup>, D. O. Stroy<sup>3</sup>, V. V. Balan<sup>1</sup>, T. Yu. Shlyakhtychenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>O. O. Bogomolets National Medical University, 13 Taras Shevchenko Blvd., Kyiv, 01601, Ukraine

<sup>3</sup>O. O. Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, 4 Bogomoletz St., Kyiv, 01024, Ukraine

## COMPLEX ANALYSIS OF THE ROLE OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS AS PROGNOSTIC FACTOR OF THE RISK OF PLASMA CELL MYELOMA IN PERSONS SUFFERED AFTER THE CHORNOBYL NPP ACCIDENT

**Objective:** to provide a comparative characterization of the prevalence of polymorphic variants of cytokine genes in plasma cell myeloma (PCM) patients suffered after the Chernobyl disaster and patients who were in contact with ionizing radiation within the natural radiation background, based on comparison with population controls to determine their contribution as genetic markers of disease risk.

**Materials and methods.** Molecular genetic studies of polymorphism of cytokine genes (*TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* ) and complex frequency analysis of occurrence in three-, four-, and five-locus combinations of their allelic variants as prognostic markers of the risks of plasma cell myeloma was carried out in 102 patients – 56 victims of the Chernobyl nuclear power plant accident and 46 patients irradiated within the limits of the natural radiation background, in comparison with the control group (364 practically healthy people, residents of the Central geno-geographical region of Ukraine).

**Results.** The same probable increase in the prevalence of the *TGF- $\beta$ 1* genotype *codon10 T/T* of the *TGF- $\beta$ 1* gene was established in the groups of patients irradiated after the Chernobyl NPP accident and non-irradiated patients. In patients with plasma cell myeloma a protective effect for *IL-10 -1082 A/G* and an association with the risk of disease occurrence for *IL-10 -1082 G/G* were determined.

**Conclusion.** Probable difference in the frequency of the *TGF- $\beta$ 1* genotype *codon10 T/T* of the *TGF- $\beta$ 1* gene in the observed groups relative to the control group provides grounds for considering this single-nucleotide polymorphism of the *TGF- $\beta$ 1* gene as an immunogenetic factor of predisposition to the development of PCM independent of exogenous factors. The study of the contribution of multigene combinations of «gene-gene» interaction indicates their role in the mechanisms of plasma cell myeloma occurrence and confirms the presence of an additive interaction.

**Key words:** plasma cell myeloma, cytokines *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* , ionizing radiation, Chernobyl NPP accident.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2022;27:374-384. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-374-384*

### ВСТУП

Комплексна взаємодія факторів зовнішнього середовища і генів імунної відповіді людини є вагомим складовим розв'язком розвитку хронічних лімфопроліферативних новоутворень, зокрема плазмоклітинної мієломи (ПКМ), у осіб з різноманітними мутаціями генів вродженого імунітету, які мають високий ступінь поліморфізму і на сьогодні розглядаються як чинники ризику захворювань людини, залежно від конкретних генетичних варіантів [1]. У світовій науковій літературі представлені дослідження щодо асоціативного зв'язку ПКМ з однонуклеотидними замінами в промоторному регіоні генів ряду

### INTRODUCTION

The complex interaction of environmental factors and the genes of the human immune response is an important component of the development of chronic lymphoproliferative neoplasms, in particular, plasma cell myeloma (PCM) in individuals with various mutations in the genes of innate immunity, which have a high degree of polymorphism and are currently considered as risk factors for human diseases, depending from specific genetic variants [1]. In the world scientific literature there are studies on the association of PCM with single-nucleotide substitutions in the promoter region of a number of

✉ Tetiana F. Liubarets, e-mail: tliubarets@yahoo.com

*TLRs* (*TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR10*) та генів інтерлейків (*IL-1, IL-10, IL-6*), які впливають на кінцевий рівень секреції, або експресію білків, що кодуються даними генами, і обумовлюють їхню функціональну активність [2]. Разом з тим, дискутуються суперечливі питання щодо поширеності генетичних маркерів і ступеня їх асоціації, які пояснюють етнічними особливостями популяцій, географічними умовами проживання пацієнтів та особливостями впливу чинників зовнішнього середовища [3]. Тому дослідники вважають за необхідне проведення подальшого вивчення поширеності поліморфних варіантів генів імунної відповіді як генетичних маркерів скринінгу пацієнтів ПКМ і уточнення причин розбіжностей в коефіцієнтах асоціації поліморфізму генів з характеристиками захворювання [4, 5].

#### МЕТА

Надати порівняльну характеристику поширеності поліморфних варіантів генів цитокінів у хворих на ПКМ, постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи, та пацієнтів, які контактували з іонізуючим випромінюванням (ІВ) в межах природного радіаційного фону, на підставі зіставлення з популяційним контролем для визначення їх внеску як генетичних маркерів ризику захворювання.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

До пріоритетної групи спостереження було включено 102 пацієнти, у тому числі 46 хворих, опромінених у межах природного радіаційного фону (1-ша група) та 56 постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) (2-га група). Вік пацієнтів варіював від 49 до 76 років. У всіх пацієнтів на етапі первинного обстеження проведено стадіювання ПКМ за класифікацією Durie-Salmon (I–III ст.) [6]. Хворі на ПКМ знаходились на лікуванні у відділенні радіаційної онкогематології Інституту клінічної радіології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України». В якості контролю прийнято результати дослідження імуногенетичної паспортизації 364 практично здорових осіб, жителів Центрального гено-географічного регіону України. Молекулярно-генетичні дослідження поліморфізму генів цитокінів *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$*  із застосуванням полімеразно ланцюгової реакції проводили з використанням набору Cytokine Genotyping Tray («One Lambda», США) [7].

*TLRs* genes (*TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR10*) and interleukin genes (*IL-1, IL-10, IL-6*) which affect the final level of secretion or expression of proteins encoded by these genes and determine their functional activity [2]. However, controversial issues regarding the prevalence of genetic markers and the degree of their association are discussed, which are explained by the ethnic characteristics of the population, the geographical conditions of the patients' residence, and the peculiarities of the influence of environmental factors [3]. Therefore, researchers consider it is necessary to conduct a further study of the prevalence of polymorphic variants of immune response genes as genetic markers for screening PCM patients and clarify the reasons for discrepancies in the coefficients of association of gene polymorphisms with disease characteristics [4, 5].

#### OBJECTIVE

To provide a comparative characterization of the prevalence of polymorphic variants of cytokine genes in PCM patients suffered after the Chornobyl disaster and patients exposed to ionizing radiation (IR) within the natural radiation background, based on comparison with population controls to determine their contribution as genetic markers of disease risk.

#### MATERIALS AND METHODS

102 patients were included in the priority observation group, including 46 patients irradiated within the limits of the natural radiation background (1st group) and 56 ones injured after the Chornobyl NPP (ChNPP) accident (2nd group). The age of the patients varied from 49 to 76 years. PCM was staged according to Durie-Salmon classification (I–III stages) at the primary investigation in all patients [6]. Patients with PCM were treated in the Department of Radiation Oncohematology of the Institute of Clinical Radiology of the State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine». The results of the study of immunogenetic passporting of 364 practically healthy people, residents of the Central geno-geographical region of Ukraine, were taken as a control. Molecular genetic studies of the polymorphism of the cytokine genes *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10* and *IFN- $\gamma$*  using the polymerase chain reaction were performed using the Cytokine Genotyping Tray («One Lambda», USA) [7].

Результат обчислювали за допомогою електронних таблиць фірми виробника до набору Cytokine Genotyping Tray («One Lambda», США). Статистичний аналіз проводили за програмою Arlequin v.3.11 та за методом бінарної логістичної регресії для розрахунку відношення шансів (OR – odds ratio) [8]. Метод багатofакторного зменшення просторовості (multifactorial dimensionality reduction, MDR) [9] використано для визначення взаємодії між поліморфними варіантами генів. Для визначення типу цієї взаємодії застосовувався метод випадкового лісу (Random forest), а графічне зображення епістазу представлено за допомогою дендрограм взаємодії [10].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення поширеності алельних варіантів генів, генотипів та гаплотипових сполучень цитокінів *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$*  у хворих на ПКМ, залежно від наявності дії ІВ в анамнезі, проводилось у зіставленні з поширеністю досліджених імуногенетичних факторів в популяції Центрального гено-географічного регіону України (табл. 1).

Виявлено вірогідну відмінність частоти генотипу *TGF- $\beta$ 1 codon 10 T/T* гена *TGF- $\beta$ 1*, яка була вищою за контрольні значення майже вдвічі, як в групі пацієнтів, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, так і в опозитній групі. Даний факт складає основу формування однонаправленого асоціативного зв'язку з ризиком виникнення захворювання у групах порівняння і надає підставу розглядати цей одонуклеотидний поліморфізм гену *TGF- $\beta$ 1* як незалежний від екзогенних чинників імуногенетичний фактор схильності до розвитку ПКМ.

Дослідження особливостей поширеності гаплотипових сполучень генів цитокінів у пацієнтів з ПКМ проводили з урахуванням належності алельних варіантів генів як продуцентів з різним рівнем секреції цитокінів (табл. 2).

Отримані дані (табл. 2) свідчать, що розподіл частот низьких, середніх і високих продуцентів має свої характерні риси. Так, поширеність гаплотипу *TGF- $\beta$ 1 codon 10/codon 25 TG* (продуцента з високим рівнем секреції) в досліджуваних групах хворих не має вірогідних відмінностей, проте реєструється частіше, ніж у контрольній групі. Оскільки, *TGF- $\beta$ 1* відповідає за індукцію експансії пухлинного клону при ПКМ шляхом підвищення рівня *IL-6* [11], пригнічення проліферації нормальних В-клітин і секреції імуноглобулінів, мож-

The result was calculated using electronic spreadsheets of the manufacturer's Cytokine Genotyping Tray kit (One Lambda, USA). Statistical analysis was performed using the Arlequin v.3.11 program and the method of binary logistic regression to calculate the odds ratio (OR – odds ratio) [8]. The method of multifactorial dimensionality reduction (MDR) [9] was used to determine the interaction between polymorphic variants of genes. To determine the type of this interaction, the «random forest» method was used, and the graphic representation of epistasis is presented using dendrograms of interaction [10].

## RESULTS AND DISCUSSION

The study of the prevalence of allelic variants of genes, genotypes and haplotype combinations of cytokines *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$*  in PCM patients, depending on the presence of IR effects in the anamnesis, was carried out in comparison with the prevalence of the investigated immunogenetic factors in the population of the Central geographical region of Ukraine (Table 1).

A probable difference in the frequency of the *TGF- $\beta$ 1 codon 10 T/T* genotype of the gene *TGF- $\beta$ 1* was revealed, which was higher than the control values almost twice, both in the group of patients suffered after the Chernobyl NPP accident, and in the opposite group. This fact forms the basis for the formation of a unidirectional associative relationship with the risk of the disease in the comparison groups and provides a reason to consider this single-nucleotide polymorphism of the *TGF- $\beta$ 1* gene as an immunogenetic factor of predisposition to the development of PCM independent of exogenous factors.

The study of the peculiarities of the prevalence of haplotype combinations of cytokine genes in patients with PCM was carried out taking into account the relevance of allelic variants of genes as producers with different levels secretion of cytokines (Table 2).

The obtained data (Table 2) show that the frequency distribution of low, medium and high producers has its own characteristic features. As well, haplotype prevalence *TGF- $\beta$ 1 codon 10/codon 25 TG* (a producer with a high level of secretion) in the studied groups of patients has no probable differences, but it is registered more often than in the control group. Thus *TGF- $\beta$ 1* is responsible for inducing the expansion of the tumor clone in PCM by increasing the level of *IL-6* [11], inhibiting the proliferation of normal B-cells and the secretion of immunoglobu-

**Таблиця 1**

**Розподіл генотипів цитокінів у групі хворих на ПКМ залежно від наявності дії ІВ в анамнезі**

**Table 1**

**Distribution of cytokine genotypes in the group of PCM patients depending on the presence of IR irradiation in the anamnesis**

Цитокіни Cytokines	Генотипи Genotypes	Частота розподілу / Distribution frequency		
		група контролю control group n = 364	хворі на ПКМ / PCM patients	
			1-ша група / 1 <sup>st</sup> group n = 46	2-га група / 2 <sup>nd</sup> group n = 56
<i>TNF-α</i> -308	G/G	0,728	0,728	0,750
	G/A	0,135	0,136	0,250
	A/A	0,137	0,136	–
<i>IFN-γ</i> +847	T/T	0,181	0,182	0,220
	T/A	0,140	0,227	0,230
	A/A	0,679	0,591	0,550
<i>IL-6</i> -147	G/G	0,272	0,227	0,160
	G/C	0,549	0,546	0,600
	C/C	0,179	0,227	0,220
<i>TGF-β1</i> codon 10	T/T	0,228	0,591 <sup>1</sup>	0,570 <sup>1</sup>
	T/A	0,457	0,327	0,320
	A/A	0,187	0,182	0,210
<i>TGF-β1</i> codon 25	G/G	0,772	0,773	0,840
	G/C	0,228	0,227	0,140
	C/C	0,000	–	0,020
<i>IL-10</i> -1082	G/G	0,181	0,227	0,170
	G/A	0,544	0,546	0,600
	A/A	0,275	0,227	0,230
<i>IL-10</i> -819	T/T	0,044	–	0,060
	T/C	0,368	0,455	0,430
	C/C	0,588	0,545	0,510
<i>IL-10</i> -592	A/A	0,044	0,060	0,070
	A/C	0,368	0,360	0,390
	C/C	0,588	0,570	0,540

Примітки. 1-ша група – хворі на ПКМ, які не зазнали дії ІВ; 2-га група – хворі на ПКМ, які зазнали дії ІВ; n – кількість спостережень; <sup>1</sup>вірогідність розбіжностей порівняно з показниками групи контролю, p < 0,05.

Notes. The 1<sup>st</sup> group is PCM patients who were not exposed to IR; the 2<sup>nd</sup> group is PCM patients who have undergone the effects of IR; n – is the number of observations;

<sup>1</sup>the probability of discrepancies compared to the indicators of the control group, p < 0.05.

**Таблиця 2**

**Розподіл гаплотипів цитокінів в групах хворих на ПКМ залежно від наявності дії ІВ в анамнезі**

**Table 2**

**Distribution of cytokine haplotypes in the groups of PCM patients, depending on the presence of IR irradiation in the anamnesis**

Цитокін Cytokine	Гаплотип / продуцент Haplotype / Producer	Частота розподілу / Distribution frequency		
		група контролю / control group n = 364	1-ша група / 1 <sup>st</sup> group n = 46	2-га група / 2 <sup>nd</sup> group n = 56
	CG (C)	0,215	0,187	0,183
	TG (B)	0,309	0,584 <sup>1</sup>	0,641 <sup>1</sup>
	TC (C)	0,068	0,075	0,049
<i>IL-10</i> (-1082 / -819 / -592)	ACA (C)	0,084	0,094	0,137
	ACC (H)	0,182	0,147	0,146
	ATA (H)	0,208	0,187	0,183
	GCC (B)	0,261	0,118 <sup>1</sup>	0,092 <sup>1</sup>

Примітки. 1-ша група – хворі на ПКМ, які не зазнали дії ІВ; 2-га група – хворі на ПКМ, які зазнали дії ІВ; n – кількість спостережень; <sup>1</sup>вірогідність розбіжностей порівняно з показниками групи контролю, p < 0,05.

Notes. The 1<sup>st</sup> group is PCM patients who were not exposed to IR; the 2<sup>nd</sup> group is PCM patients who have undergone the effects of IR; n – is the number of observations;

<sup>1</sup>the probability of discrepancies compared to the indicators of the control group, p < 0.05.

ливо припустити, що носійство даного гаплотипу може бути підґрунтям для підвищення ризику захворювання. Що стосується промоторних доменів гена *IL-10*, поширеність гаплотипів у опромінених хворих на ПКМ, які відповідають низьким (*ATA*), середнім (*ACC*) та високим (*GCC*) продуцентам секретії, в основному тотожна поширеності в опозитній групі хворих і контрольній популяції. Винятком є достовірно нижчий відсоток носіїв гаплотипу *IL-10 -1082/ -819/ -592 GCC*, що відповідає продуцентам з високим рівнем секретії *IL-10*. Оскільки вважається, що даний цитокін пригнічує поверхневу експресію молекул головного комплексу гістосумісності, стимулює деградацію мРНК прозапальних цитокінів і забезпечує перехід з фази гострого запалення до стадії толерантності, зниження його поширеності може свідчити про можливість впливу даного гаплотипу на процеси постцитостатичного відновлення після проведення хіміотерапії [12].

Проведені на сьогодні дослідження показали досить обмежену спроможність поодиноких алельних варіантів генів цитокінів мати сильні асоціативні зв'язки з ризиком ПКМ. Активно обговорюються можливі механізми виникнення адитивного ефекту при поєднанні алелів декількох генів з предиктивними функціями, що може підвищувати ризик виникнення злоякісного захворювання [13, 14]. Для перевірки даної гіпотези нами проведено комплексний аналіз частот зустрічальності сполучень генотипів у три-, чотири-, п'ятилокусних композиціях алельних варіантів генів імунної відповіді (*TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* ) з урахуванням внеску мультигенних комбінацій факторів взаємодії «ген–ген» в механізми асоціації маркерів з предикторними і протекторними функціями на основі моделі бінарної логістичної регресії і методу багатофакторного зменшення просторовості [9]. Даний підхід дозволив підвищити рівень ідентифікації асоціативних зв'язків. Так, до активних предикторів були віднесені три з 8 поліморфних варіантів генів цитокінів: *IL-6 -174 (rs1800795)*, *TGF- $\beta$ 1 codon 10 (rs1800470)*, *IL-10 -1082 (rs1800896)*. В якості протекторного варіанта гена з протекторною функцією нами виділено *TNF- $\alpha$  -308 (rs1800629)*. Ефективність практичного застосування даної моделі при прогнозуванні ризиків дозволяє з 80 % точністю прогнозувати ризик реалізації захворювання, навіть у випадках, коли за умов великого спектру поліморфних варіантів генів досліджуваної системи неможливо встанови-

lines, it is possible to assume that the carrier of this haplotype may be the basis for increasing the risk of the disease. Regarding the promoter domains of the *IL-10* gene, the prevalence of haplotypes in irradiated PCM patients corresponding to low (*ATA*), medium (*ACC*) and high (*GCC*) secretory producers is basically identical to the prevalence in the opposite group of patients and the control population. The exception is a significantly lower percentage of carriers of the *IL-10 -1082/ -819/ -592 GCC* haplotype, which corresponds to producers with a high level of *IL-10* secretion. Since it is believed that this cytokine suppresses the surface expression of molecules of the major histocompatibility complex, stimulates the degradation of mRNA of pro-inflammatory cytokines and ensures the transition from the phase of acute inflammation to the stage of tolerance, a decrease in its prevalence may indicate the possibility of the influence of this haplotype on the processes of postcytostatic recovery after chemotherapy [12].

Studies conducted to date have shown a rather limited ability of single allelic variants of cytokine genes to have strong associative links with PCM risk. The possible mechanisms of the occurrence of an additive effect in the combination of alleles of several genes with predictive functions, which can increase the risk of the occurrence of a malignant disease, are actively discussed [13, 14]. To test this hypothesis, we conducted a comprehensive analysis of the frequency of occurrence of combinations of genotypes in three-, four-, and five-locus compositions of allelic variants of immune response genes (*TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* ) taking into account contribution of multigene combinations of «gene-gene» interaction factors to association mechanisms markers with predictor and protector functions on the basis models of binary logistic regression and the method of multifactorial spatial reduction [9]. This approach made it possible to increase the level of identification of associative relationships. Thus, three out of 8 polymorphic variants of cytokine genes were classified as active predictors: *IL-6 -174 (rs1800795)*, *TGF- $\beta$ 1 codon 10 (rs1800470)*, *IL-10 -1082 (rs1800896)*. We identified *TNF- $\alpha$  -308 (rs1800629)* as a polymorphic variant of the gene with a protective function. The effectiveness of the practical application of this model in predicting risks allows predicting the risk of disease with 80 % accuracy, even in cases where, under the conditions of a large spectrum of polymorphic variants of the genes of the studied system, it is impossible to

**Таблиця 3**

**Результати асоціації поліморфних варіантів генів цитокінів з ризиком ПКМ (метод логістичної регресії)**

**Table 3**

**Results of the association of polymorphic variants of cytokine genes with PCM risk (logistic regression method)**

Генотип / Genotype	$\beta$	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp ( $\beta$ )
1	2	3	4	5	6	7
<i>TGF-<math>\beta</math>1 codon 10</i>			40,077	2	0,000	
<i>TGF-<math>\beta</math>1 codon 10-1</i>	0,279	0,393	0,503	1	0,478	1,321
<i>TGF-<math>\beta</math>1 codon 10-2</i>	1,782	0,387	21,186	1	0,000	5,939
<i>IL-10 -1082</i>		12,210	2	0,002		
<i>IL-10 -1082-1</i>	- 0,546	0,287	3,623	1	0,030	0,579
<i>IL-10 -1082-2</i>	0,603	0,385	2,454	1	0,020	1,828
<i>IL-6 -174</i>		12,782	2	0,002		
<i>IL-6 -174-1</i>	- 0,663	0,333	3,970	1	0,040	0,515
<i>IL-6 -174-2</i>	0,307	0,335	0,840	1	0,020	1,360
Константа	- 1,705	0,477	12,757	1	0,000	0,182

Примітки.  $\beta$  – коефіцієнт BLR; d. f. – ступені свободи;  $p$  – статистична значущість; Exp ( $\beta$ ) – відношення шансів.  
Notes.  $\beta$  – the BLR coefficient; df – degrees of freedom;  $p$  – statistical significance; Exp ( $\beta$ ) – the odds ratio.

ти коефіцієнт асоціації з ризиком захворювання за ізольованими генами. Принципи формування моделі представлені у табл. 3.

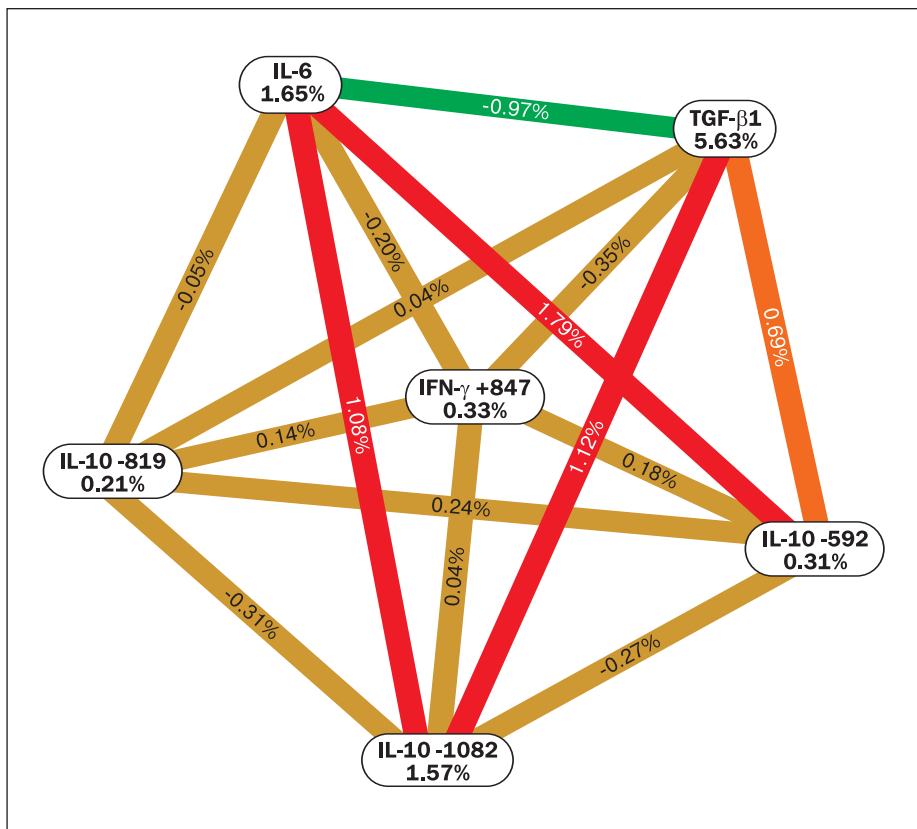
Так, *TGF- $\beta$ 1 codon 10* як найбільш поширений генотип (мажорний), віднесений до референт-категорії (щодо якої порівнюються два інших), був представлений варіантом *TGF- $\beta$ 1 codon 10-1*, який кодує гетерозиготний генотип, і варіантом *TGF- $\beta$ 1 codon 10-2*, який кодує мінорний генотип. Мінорний генотип *TGF- $\beta$ 1 codon 10-2* у шість разів частіше асоційований (Exp ( $\beta$ )) із захворюванням порівняно з мажорним генотипом ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). Разом з тим, гетерозиготний варіант асоційований з ПКМ у 1,3 раза частіше, ніж мажорний генотип ( $p > 0,05$ ), що вказує на мінімальну позитивну асоціацію з ризиком формування захворювання. В той же час, у хворих на ПКМ у порівнянні з контрольною групою спостерігався різнонаправлений асоціативний зв'язок хвороби з поліморфізмом *IL-10 -1082*, залежно від наявності мутантного алеля в гомозиготному стані. Так, для *IL-10 -1082 A/G* визначено протективний ефект, оскільки Exp ( $\beta$ )  $< 1$  (0,579). Навпаки, *IL-10 -1082 G/G* має позитивну асоціацію з ризиком захворювання – Exp ( $\beta$ ) = 2,85.

Застосування методу багатомірного зменшення розмірності дозволило виявити наявність взаємозв'язку між поліморфними варіантами генів імунної відповіді і визначити типи даних зв'язків. Відповідно до рис. 1, *TGF- $\beta$ 1 codon 10* є найбільш вагомим і активним предиктором ризику захворювання, оскільки коефіцієнт ентропії складає 5,6 %. Другими за значущістю слід вважати *IL-6 -174* і *IL-10 -1082*. Червоний колір свідчить про синергіч-

establish the association coefficient with the risk of the disease for isolated genes. The principles of model formation are presented in Table. 3.

Thus, *TGF- $\beta$ 1 codon 10* as the most common genotype (major) assigned to the referent category (in relation to which the other two are compared) was represented by the variant *TGF- $\beta$ 1 codon 10-1*, which encodes a heterozygous genotype, and a variant *TGF- $\beta$ 1 codon 10-2*, which encodes a minor genotype. Minor genotype *TGF- $\beta$ 1 codon 10-2* six times more often associated (Exp ( $\beta$ )) with the disease compared to the major genotype ( $p < 0.05$ ) (Table 3). However, the heterozygous variant is associated with PCM 1.3 times more often than the major genotype ( $p > 0.05$ ), which indicates a minimal positive association with the risk of developing the disease. At the same time, in PCM patients compared with the control group, a multidirectional associative relationship of the disease with the *IL-10 -1082* polymorphism was observed, depending on the presence of the mutant allele in the homozygous state. Thus, a protective effect was determined for *IL-10 -1082 A/G*, as Exp ( $\beta$ )  $< 1$  (0.579). In contrast, *IL-10 -1082 G/G* has a positive association with disease risk – Exp ( $\beta$ ) = 2.85.

The application of the method of multivariate dimensionality reduction made it possible to reveal the existence of a relationship between polymorphic variants of immune response genes and to determine the types of these relationships. According to fig. 1, *TGF- $\beta$ 1 codon 10* is the most important and active predictor of disease risk because the entropy coefficient is 5.6 %. *IL-6 -174* and *IL-10 -1082* should be considered second in importance. The red color indicates a



**Рисунок 1.** Дендрограма взаємодії між генами цитокінів

Лінії червоного та оранжевого кольору – синергічна взаємодія SNP; лінії жовтого і коричневого кольору – головні незалежні ефекти; лінії зеленого кольору – надлишковість або кореляція. Кожна точка відповідає певній популяції, лініями виділені географічні регіони розташування зазначених популяцій. Stress = 0.074.

**Figure 1.** Dendrogram of interactions between cytokine genes

Synergistic interaction of SNPs is indicated by red and orange lines; yellow and brown lines indicate the main independent effects; green lines indicate redundancy or correlation. Each point corresponds to a certain population, the geographical regions of the location of the specified populations are highlighted by lines. Stress = 0.074.

ний тип взаємозв'язку, коли два поліморфних варіанти генів при взаємодії викликають ефект значно більшої сили, ніж сума окремих ефектів дії їхніх поліморфних варіантів. Коричневим кольором позначена нейтральна взаємодія, тобто кожен ген виконує винятково свою функцію за кодомінантним типом і будь-яке поєднання не впливає на загальний ефект. Зелений колір позначає «генетичну надлишковість», або кореляцію. Графічне зображення зв'язків між дослідженими поліморфізмами генів доказово свідчить про синергічні взаємовідносини між *IL-6 -174* та *IL-10 -1082*; між *IL-6 -174* та *IL-10 -10592*; між *TGF-β1 codon 10* і *IL-10 -1082*; а також між *TGF-β1 codon 10* і *IL-10 -1082* (рис. 1).

synergistic type of interaction, when two polymorphic variants of genes when interacting cause an effect much stronger than the sum of the individual effects of their polymorphic variants. Neutral interaction is indicated by brown color, that is, each gene performs its function exclusively according to the codominant type and any combination does not affect the overall effect. Green indicates «genetic redundancy,» or correlation. The graphic representation of the relationships between the investigated gene polymorphisms proves the synergistic relationship between *IL-6 -174* and *IL-10 -1082*; between *IL-6 -174* and *IL-10 -10592*; between *TGF-β1 codon 10* and *IL-10 -1082*; and also between *TGF-β1 codon 10* and *IL-10 -1082* (Fig. 1).

## ВИСНОВОК

Отримані результати надають підставу розглядати однонуклеотидний поліморфізм гену *TGF-β* і *IL-10 -1082 GG*, як незалежні від екзогенних чинників предиктори розвитку ПКМ. Також визначено протективний ефект для *IL-10 -1082 AG*. Важливо, що при оцінці генетичної схильності до розвитку ПКМ за генами цитокінів доцільно враховувати взаємодію трьох алельних варіантів генів: поліморфізму генів *IL-6 -174* та *IL-10 -1082* (SNP 1,97 %); *IL-6 -174* та *IL-10 -10592* (SNP 1,79 %); *TGF-β1 codon 10* та *IL-10 -1082* (SNP 1,12 %). Факт перерозподілу коефіцієнтів асоціації, залежно від

## CONCLUSION

The obtained results give reason to consider the single nucleotide polymorphism of the *TGF-β* gene and *IL-10 -1082 GG* as predictors of PCM development independent of exogenous factors. A protective effect was also determined for *IL-10 -1082 AG*. The obtained data indicate that when assessing the genetic predisposition to the development of PCM by cytokine genes, it is advisable to take into account the interaction of three allelic gene variants: polymorphism of gene *IL-6 -174* and *IL-10 -1082* (SNP 1.97%); *IL-6 -174* and *IL-10 -10592* (SNP 1.79%); *TGF-β1 codon 10* and *IL-10 -1082* (SNP 1.12 %).



сполучень генів, свідчить про складні взаємовідносини між генетичними детермінантами в межах гена та системи в цілому і підтверджує нашу концепцію щодо можливості адитивної взаємодії генів імунної відповіді за наявності синергізму між поліморфними варіантами генів, що певною мірою ускладнює механізми асоціативного зв'язку з розвитком захворювання. Отримані результати підтверджують вагомий роль кандидатних маркерів генів імунної відповіді як критеріїв ризику формування мультифакторіальної патології, зокрема ПКМ, що у поєднанні з клінічними характеристиками складає основу для розширення спектру критеріїв – предикторів щодо ризику захворювання і чинників з протекторними функціями, з урахуванням особливостей радіаційного анамнезу пацієнтів.

The fact of the redistribution of association coefficients, depending on gene combinations, indicates complex relationships between genetic determinants within the gene and the system as a whole and confirms our concept regarding the possibility of additive interaction of immune response genes based on the presence of synergism between polymorphic variants of genes, which to some extent complicates the mechanisms of associative connection with the development of the disease. The obtained results confirm the important role of candidate markers of immune response genes as risk criteria for the formation of multifactorial pathology, in particular PCM, which, in combination with clinical characteristics, forms the basis for expanding the spectrum of criteria – predictors of disease risk and factors with protective functions, taking into account the peculiarities of the radiation exposure of patients.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis / H. Yan, G. Zheng, J. Qu, Y. Liu, et al. *J. Cell. Physiol.* 2019. Vol. 234, no. 12. P. 23785–97. doi: 10.1002/jcp.28947.
2. Inflammatory and anti-inflammatory equilibrium, proliferative and antiproliferative balance: the role of cytokines in multiple myeloma / C. Musolino, A. Allegra, V. Innao, A. G. Allegra, et al. *Mediators Inflamm.* 2017. Vol. 2017. P. 185–191. doi: 10.1155/2017/1852517.
3. Prognostic or predictive value of circulating cytokines and angiogenic factors for initial treatment of multiple myeloma in the GIMEMA MM0305 randomized controlled trial / I. Saltarella, F. Morabito, N. Giuliani, C. Terragna, et al. *J. Hematol. Oncol.* 2019. Vol. 12, no. 1. P. 4. doi: 10.1186/s13045-018-0691-4.
4. Zhaoyun L, Rong F. Predictive Role of immune profiling for survival of multiple myeloma patients. *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 663748. doi: 10.3389/fimmu.2021.663748.
5. Cytokine and chemokine profile in patients with multiple myeloma treated with bortezomib / P. Robak, E. Weglowska, I. Drozd, D. Mikulski, et al. *Mediators Inflamm.* 2020. Vol. 2020. P. 1835836. doi: 10.1155/2020/1835836.
6. International Myeloma Working Group 2003 Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group / R. A. Kyle, J. A. Child, K. Anderson, B. Barlogie, et al. *Br. J. Haematol.* 2003. Vol. 121. P. 749–757. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04355.x.
7. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988. Vol. 16, no 3. P. 1215–1218. doi: 10.1093/nar/16.3.1215.
8. Machine learning methods are comparable to logistic regression techniques in predicting severe walking limitation following total knee

## REFERENCES

1. Yan H, Zheng G, Qu J, Liu Y, Huang X, Zhang E, et al. Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):23785-23797. doi: 10.1002/jcp.28947.
2. Musolino C, Allegra A, Innao V, Allegra AG, Pioggia G, Gangemi S. Inflammatory and anti-inflammatory equilibrium, proliferative and antiproliferative balance: the role of cytokines in multiple myeloma. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:185-191. doi: 10.1155/2017/1852517.
3. Saltarella I, Morabito F, Giuliani N, Terragna C, Omede P, Palumbo A, et al. Prognostic or predictive value of circulating cytokines and angiogenic factors for initial treatment of multiple myeloma in the GIMEMA MM0305 randomized controlled trial. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):4. doi: 10.1186/s13045-018-0691-4.
4. Zhaoyun L, Rong F. Predictive Role of immune profiling for survival of multiple myeloma patients. *Front Immunol.* 2021;12:663748. doi: 10.3389/fimmu.2021.663748.
5. Robak P, Weglowska E, Drozd I, Mikulski D, Jarych D, Ferlinska M, et al. Cytokine and chemokine profile in patients with multiple myeloma treated with bortezomib. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:1835836. doi: 10.1155/2020/1835836.
6. Kyle RA, Child JA, Anderson K, Barlogie B, Bataille R, Bensinger W, et al. International Myeloma Working Group 2003 Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* 2003;121:749-757. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04355.x.
7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988;16(3):1215-1218. doi: 10.1093/nar/16.3.1215.
8. Pua YH, Kang H, Thumboo J, Clark RA, Chew ES, Poon CL, et al. Machine learning methods are comparable to logistic regression

- arthroplasty / Y. H. Pua, H. Kang, J. Thumboo et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020. Vol. 28. P. 3207–3216. doi: 10.1007/s00167-019-05822-7.
9. Hahn L. W., Ritchie M. D., Moore J. H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19, no. 3. P. 376–382. doi: 10.1093/bioinformatics/btf869. PMID: 12584123.
  10. Mitsialis V, Wall S, Liu P, Ordovas-Montanes J, Parmet T, Vukovic M, et al. Single-cell analyses of colon and blood reveal distinct immune cell signatures of ulcerative colitis and crohn's disease. *Gastroenterology.* 2020;159(2):591-608. doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.074.
  11. Vandenbroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *J Interferon Cytokine Res.* 2012. Vol. 32, no. 4. P. 139–151. doi: 10.1089/jir.2011.0103.
  12. Effect of cytokine genes in the pathogenesis and on the clinical parameters for the treatment of multiple myeloma / H. Haydaroglu, S. Oguzkan Balci, S. Pehlivan et al. *Immunol. Invest.* 2017. Vol. 46, no. 1. P. 10–21. doi: 10.1080/08820139.2016.1208219.
  13. Are minor alleles more likely to be risk alleles? / T. Kido, W. Sikora-Wohlfeld, M. Kawashima et al. *BMC Med Genet.* 2018. Vol. 11, no. 1. P. 3. doi: 10.1186/s12920-018-0322-5.
  14. Lee J. W, Lee S. A comparative study on the unified model based multifactor dimensionality reduction methods for identifying gene-gene interactions associated with the survival phenotype. *BioData Min.* 2021. Vol. 14, no. 1. P. 17. doi: 10.1186/s13040-021-00248-9.

## ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Мінченко Жанна Миколаївна** – доктор біологічних наук, професор, завідувач лабораторії імуногенетики відділу гематології та трансплантології Інституту клінічної радіології ННЦРМ, Київ, Україна

**Дмитренко Олена Олександрівна** – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії імуногенетики відділу гематології та трансплантології Інституту клінічної радіології ННЦРМ, Київ, Україна

**Любарєць Тетяна Федорівна** – доктор медичних наук, професор, доцент кафедри загальної практики (сімейної медицини) Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

**Сілаєв Юрій Олегович** – лікар-гематолог відділення радіаційної гематології клініки ННЦРМ, Київ, Україна

**Строй Дмитро Олександрович** – кандидат медичних наук, науковий співробітник Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

**Балан Валентина Володимирівна** – молодший науковий співробітник лабораторії імуногенетики відділу гематології та трансплантології Інституту клінічної радіології ННЦРМ, Київ, Україна

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Zhanna M. Minchenko** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Immunogenetic Laboratory of Hematology and Transplantology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Olena O. Dmytrenko** – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Immunogenetic Laboratory of Hematology and Transplantology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Tetiana F. Liubarets** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Associate Professor of the Department of General Practice (Family Medicine), O. O. Bomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**Yurii O. Silaiev** – Staff Hematologist, Radiation Hematology Department, NRCRM Clinic, Kyiv, Ukraine

**Dmytro O. Stroy** – Candidate of Medical Sciences, Researcher of O. O. Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Valentyna V. Balan** – Junior Researcher, Immunogenetic Laboratory of Hematology and Transplantology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Шляхтиченко Тетяна Юріївна** – кандидат медичних наук, молодший науковий співробітник лабораторії імунотенетики відділу гематології та трансплантології Інституту клінічної радіології ННЦРМ, Київ, Україна

**Tetiana Yu. Shlyakhtychenko** – Candidate of Medical Sciences, Junior Researcher, Immunogenetic Laboratory of Hematology and Transplantology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

---

*Стаття надійшла до редакції 23.05.2022*

*Received: 23.05.2022*