

© КАЛИТИН Н.Н., БУРАВЦОВА И.В., 2016

УДК 616-006.448-085.277.3-074

Калитин Н.Н.<sup>1</sup>, Буравцова И.В.<sup>2</sup>

## ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ RAR $\alpha_1$ И RAR $\alpha_2$ В ОТВЕТЕ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ ТЕРАПИЮ И В ОЦЕНКЕ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва; <sup>2</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва, Российская Федерация

**Введение.** RAR $\alpha$  является транскрипционным фактором, играющим важную роль в таких процессах, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз клеток в норме и в опухоли. В то же время мало что известно о значении экспрессии двух основных продуктов транскрипции гена RAR $\alpha$  — изоформ RAR $\alpha_1$  и RAR $\alpha_2$  — в патогенезе солидных и несалидных опухолей, в том числе и множественной миеломы (ММ). Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о неоднозначности того вклада, который вносят изоформы RAR $\alpha_1$  и RAR $\alpha_2$  в процессы опухолеобразования и прогрессии злокачественных опухолей.

**Результаты.** Мы обнаружили, что более высокий уровень экспрессии изоформы RAR $\alpha_2$  в сочетании с увеличенной экспрессией изоформы RAR $\beta_4$  (группа I) статистически достоверно ассоциировался с меньшим снижением концентрации белка Бенс-Джонса в моче пациентов в результате проведенного лечения и, следовательно, меньшей эффективностью ответа на стандартное лечение по протоколу M-2 по сравнению с группой 2, в которую были включены больные с более низкими уровнями экспрессии RAR $\alpha_2$  и RAR $\beta_4$  (32,8 и 62,8% для групп I и 2 соответственно;  $p = 0,037$ ). Анализ показателей выживаемости исследованных пациентов групп I и 2 продемонстрировал, что медиана общей выживаемости пациентов из группы I была достоверно ниже, чем у пациентов, включенных в группу 2 (30 и 84 мес соответственно;  $p = 0,046$ ).

**Заключение.** Наши результаты показывают, что повышенный уровень экспрессии в первую очередь изоформы RAR $\alpha_2$  в сочетании с гиперэкспрессией изоформы RAR $\beta_4$ , но не RAR $\alpha_1$ , может иметь неблагоприятное значение при оценке ответа на лекарственную терапию и прогнозе общей выживаемости у пациентов с ММ.

**Ключевые слова:** изоформы RAR $\alpha_1$  и RAR $\alpha_2$ ; экспрессия генов; ответ на лекарственную терапию; множественная миелома.

**Для цитирования:** Калитин Н.Н., Буравцова И.В. Значение экспрессии изоформ RAR $\alpha_1$  и RAR $\alpha_2$  в ответе на лекарственную терапию и в оценке общей выживаемости больных с впервые выявленной множественной миеломой. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(8): 474-478. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-8-474-478

Kalitin N.N.<sup>1</sup>, Buravtsova I.V.<sup>2</sup>

### THE SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF ISOFORMS RARA1 AND RARA2 IN RESPONSE TO MEDICINAL THERAPY AND IN EVALUATION OF TOTAL SURVIVAL OF PATIENTS WITH PRIMARILY DETECTED MULTIPLE MYELOMA

<sup>1</sup>The N.N. Blokhin Russian oncologic research center, 115478, Moscow; <sup>2</sup>The M.F. Vladimirovskii Moskovskii oblastnoii clinical research institute, 129119 Moscow, Russia

**Introduction.** The RAR $\alpha$  is a transcription factor playing important role in such processes as proliferation, differentiation and apoptosis of cells in norm and in tumor. At the same time, it is little known about significance of expression of two major products of transcription of gene RAR $\alpha$  - isoforms RAR $\alpha_1$  and RAR $\alpha_2$  - in pathogenesis of solid and non-solid tumors, including multiple myeloma. The actual data testify ambiguity of input made by isoforms RAR $\alpha_1$  and RAR $\alpha_2$  into processes of tumor development and progression of malignant tumors.

**The results.** It was established that higher level of expression of isoform RAR $\alpha_2$  in combination with increased expression of isoform RAR $\beta_4$  (group I) statistically reliable associated with lesser decreasing of concentration of Bence Jones protein in urine of patients in the result of applied treatment and, therefore, lesser effectiveness of response to standard treatment according protocol M-2 in comparison with group II which included patients with lesser levels of expression of RAR $\alpha_2$  and RAR $\beta_4$  (32.8% and 62.8% for groups I and II correspondingly;  $p=0.037$ ). The analysis of indices of survival of examined patients in groups I and II demonstrated that median of total survival of patients from group I was reliably lower than in patients included into group II (30 and 84 correspondingly;  $p=0.046$ ).

**Conclusion.** The results of study demonstrate that increased level of expression in the first instance of isoform RAR $\alpha_2$  in combination with hyper-expression of isoform RAR $\beta_4$  but not RAR $\alpha_1$  can have unfavorable significance in case of evaluation of response to medicinal therapy and prognosis of total survival in patients with multiple melanoma.

**Key words:** isoforms RAR $\alpha_1$  and RAR $\alpha_2$ ; gene expression; response to medicinal therapy; multiple melanoma.

**For citation:** Kalitin N.N., Buravtsova I.V. The significance of expression of isoforms RARA1 and RARA2 in response to medicinal therapy and in evaluation of total survival of patients with primarily detected multiple myeloma. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2016; 61 (8): 474-478 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-474-478

**For correspondence:** Kalitin N.N., candidate of biological sciences, research worker of laboratory of tumor cells of the research institute of cancerogenesis. e-mail: f.oskolov@mail.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 13.04.2016

Accepted 20.04.2016

**Введение.** Множественная миелома (ММ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание из группы гемобластозов. В основе патологических изменений при ММ лежат разнообразные нарушения плазматических клеток, представляющих собой конечное звено в дифференцировке В-клеток лимфоидного ряда гемопоэза [1]. Вследствие этого трансформированные плазматические клетки начинают активно синтезировать и секретировать различные типы патологического иммуноглобулина (парапротеина), обнаруживаемого в сыворотке крови и моче больных ММ [2].

Для ММ, как и для других солидных и несоллидных опухолей, характерна высокая степень интраклональной гетерогенности, обуславливающей прогрессию заболевания и формирование резистентности к лекарственной терапии [3]. Следует отметить, что неконтролируемый рост малигнизированных плазматических клеток, продукция ими опухолевого парапротеина, а также значительная внутриклональная гетерогенность при ММ являются, в конечном счете, следствием дисрегуляции рост-индуцирующих и рост-супрессивных сигналов на клеточном и тканевом уровнях [4].

Одним из важных регуляторов пролиферативной активности клеток в нормальных условиях и при онкогенезе служит ядерный рецептор ретиноевой кислоты  $RAR\alpha$  (retinoic acid receptor  $\alpha$ ), функционирующий в виде двух главных изоформ —  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  [5, 6]. Изоформы  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  образуются в процессе транскрипции с общего гена  $RAR\alpha$ , но с разных промоторов, названных P1 и P2 и локализованных выше первого и третьего экзонов соответственно [7].

Несмотря на то, что структурные особенности изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$ , а также продуктов их альтернативного сплайсинга детально изучены, функциональное значение  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  остается практически не исследованным [8]. Так, было показано, что в эстроген-зависимых линиях рака молочной железы T47D и ZR-75-1 подавление экспрессии  $RAR\alpha_1$  (но не  $RAR\alpha_2$ ) приводило к уменьшению количества клеток в S-фазе и, следовательно, пролиферации [9]. В то же время, в другой работе, выполненной также на клетках рака молочной железы, было выявлено негативное влияние экспрессии изоформы  $RAR\alpha_1$  на их пролиферативную активность [10].

Таким образом, можно заключить, что имеющиеся литературные данные по этой проблеме крайне немногочисленны, а полученные результаты зачастую носят противоречивый характер. В связи с этим изучение роли, которую играют изоформы  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в патогенезе ММ, а также исследование их значения в клинике ММ представляют несомненный интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения.

**Цели и задачи.** В данной работе мы исследовали значение экспрессии мРНК изоформ  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  гена рецептора ретиноевой кислоты  $RAR\alpha$  у больных с впервые выявленной ММ и сопоставили полученные данные с эффективностью ответа на лекарственную терапию, а также с общей выживаемостью у исследованных больных.

**Материал и методы.** В исследование были включены 15 больных с впервые выявленной ММ (6 мужчин и 9 женщин) в возрасте от 37 до 75 лет. У всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Диагноз устанавливали на основании жалоб, связанных с основным заболеванием: боли в костях различной интенсивности, боли в поясничном отделе позвоночника, обусловленные корешковым синдромом. Диагноз подтверждали цитологическим исследованием аспиратов костного мозга, где выявлялась плазмноклеточная инфильтрация у всех больных, а также иммунохимическим исследованием белков сыворотки крови и мочи. По изотипу патологического иммуноглобулина IgGк выявили у 8 пациентов, IgG $\lambda$  — у 2, IgAk — у 1, IgMк — у 1, IgGк + B $\lambda$ к — у 2, IgG $\lambda$  + B $\lambda$ к — у 1.

Всем больным была проведена рентгенография костей скелета в двух проекциях. Генерализованный остеолитический синдром диагностирован у 10 из 15 больных. Стадирование проводили по общепринятой методике В. Durie и S. Salmon [11]. Индукционный период лечения включал от 6 до 8 курсов цитостатической терапии по протоколу М-2 (винкристин по 1,2 мг/м<sup>2</sup> внутривенно (в/в), кармустин по 20 мг/м<sup>2</sup> в/в, мелфалан по 8 мг/м<sup>2</sup> внутрь, циклофосфан по 400 мг/м<sup>2</sup> в/в, преднизолон по 40 мг/м<sup>2</sup> внутрь). Поддерживающую терапию проводили по протоколу М-2 1 раз в 3 мес.

Материалом для исследования была моноклеарная фракция клеток, которую получали путем разделения костномозговых пунктатов в градиенте плотности фикола («ПанЭко», Россия). Тотальную РНК выделяли с помощью Trizol Reagent (MRC, США). Все процедуры подробно описаны нами ранее [12]. Для синтеза кДНК в ходе обратной транскрипции использовали праймер Oligo-dT<sub>(18)</sub> (МВІ Fermentas, Литва). Компоненты и условия реакции описаны ранее [12].

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего красителя Eva Green (BIOTIUM, США) по следующей схеме: 95°C в течение 5 мин — 1 цикл, и далее 39 циклов: денатурация — 95°C, 20 с; отжиг праймеров — 59°C, 25 с; синтез — 72°C, 20 с. Для нормирования данных использовали экспрессию гена «домашнего хозяйства» GAPDH. Относительный уровень экспрессии каждого гена определяли по значению  $\Delta C_t$  по формуле:  $[\Delta C_t = C_t(GAPDH) - C_t(\text{исследуемого гена})]$ , где  $C_t$  — минимальный пороговый цикл гена в экспоненциальной фазе амплификационной кривой. Относительную разницу в уровнях экспрессии генов определяли по формуле  $2^n$  (где  $n$  — значение  $\Delta C_t$  исследуемого гена). Все эксперименты выполнены трехкратно. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице.

Статистическую обработку результатов проводили, используя программное обеспечение Graph Pad Prism 5.02. Результаты представлены как  $M \pm EM$  (где  $M$  — среднее арифметическое выборки, а  $EM$  — стандартная ошибка средней). Статистическую значимость определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна—Уитни при значении  $p < 0,05$ . Корреляционные зависимости определяли с помощью критериев Пирсона ( $r$ ) или Спирмена ( $R$ ). Расчет кривых общей выживаемости проводили методом Каплайна—Майера, статистически значимую разницу в выживаемости определяли с помощью теста Мантеля—Кокса.

**Последовательность праймеров, использованных в ПЦР-РВ**

Ген	Последовательность	Размер продукта, пар оснований
$RAR\alpha_1$	5'- GCCAGGCGCTCTGACCACTC- 3' (for) 5'- AGCCCTTGACGCCCTCACAG-3' (rev)	222
$RAR\alpha_2$	5'- ACTCCGCTTTGGAATGGCTCAAAC- 3' (for) 5'- AGCCCTTGACGCCCTCACAG-3' (rev)	182
$RAR\beta_2$	5'- TTCCCTCACTCTGCCAGCT- 3' (for) 5'- CGAGTTCTCAGAGCTGGTG -3' (rev)	86
$RAR\beta_4$	5'- TTGGAAGGAGAAGCTTGGGATC -3' (for) 5'- TCAATTGCATTTCCAGGCT -3' (rev)	71
$GAPDH$	5'- CTGGGCTACACTGAGCACC -3' (for) 5'- AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG -3' (rev)	101

Примечание: for — последовательность прямого праймера, rev — последовательность обратного праймера.

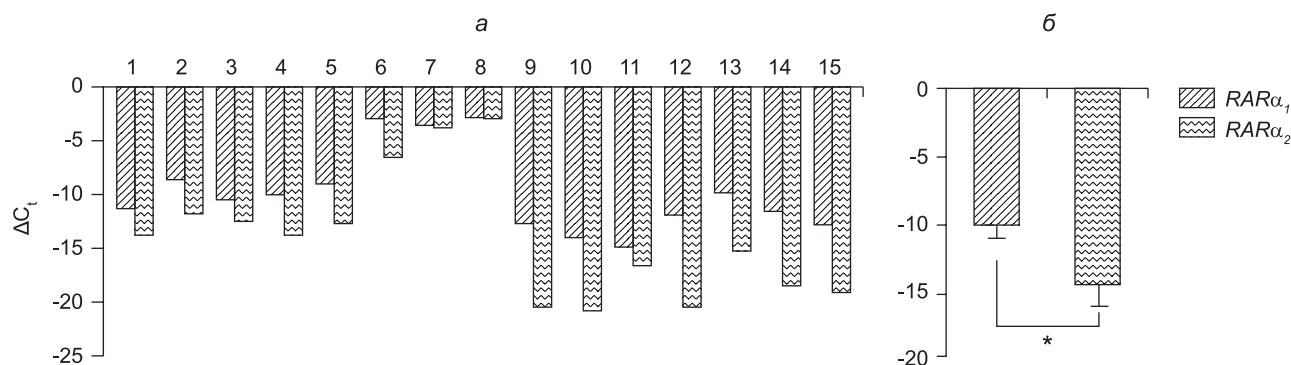


Рис. 1. Экспрессия изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  у пациентов с впервые выявленной ММ.

*a* — гистограмма распределения пациентов по уровням экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$ ; *б* — аддитивные показатели экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в общей группе из 15 обследованных пациентов; \* —  $p < 0,05$ .

Здесь и на рис. 2, 3 по оси абсцисс — порядковые номера больных; по оси ординат — значения  $\Delta C_t$  в виде количества циклов.

**Результаты.** При анализе уровней экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  у исследованных больных оказалось, что изоформы  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  экспрессируются у всех 15 больных, однако уровень экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  отличался значительной вариабельностью (рис. 1, *a*). Так, уровень экспрессии изоформы  $RAR\alpha_1$  находился в диапазоне от -14,75 до -2,65 ( $-10,2 \pm 0,93$ ) и превалировал над экспрессией изоформы  $RAR\alpha_2$  у 13 из 15 больных (86,7%). В то же время у 2 из 15 больных (13,3%) уровни экспрессии обеих изоформ были практически сопоставимы и являлись одними из самых высоких в общей группе больных. Как видно из рис. 1, *б*, сравнение суммарных уровней экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  показало, что среднее значение  $\Delta C_t$  экспрессии изоформы  $RAR\alpha_1$  было достоверно выше относительно среднего значения  $\Delta C_t$  экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$  (в 23,6 раза;  $p = 0,012$ ).

В связи с тем, что ген  $RAR\beta$  является  $RAR\alpha$  индуцибельным геном, и его экспрессия обнаруживается измененной при многих типах злокачественных опухолей, на следующем этапе нашей работы мы исследовали экспрессию двух изоформ гена  $RAR\beta$  —  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$ . Мы определили, что суммарные уровни экспрессии изоформ  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$  в общей группе практически не отличались (рис. 2, *a*). Однако при сравнении индивидуальных значений  $\Delta C_t$  изоформ  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$  каждого пациента оказалось, что у 8 из 15 больных уровень экспрессии изоформы  $RAR\beta_4$  превалировал над экспрессией изоформы  $RAR\beta_2$  (группа 1), в то время

как у 7 больных (группа 2) была отмечена противоположная тенденция:  $\Delta C_t$  экспрессии изоформы  $RAR\beta_2$  была выше, чем  $\Delta C_t$  экспрессии изоформы  $RAR\beta_4$  (рис. 2, *б*). Кроме того, мы обнаружили положительную корреляцию между экспрессией изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\beta_2$  ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,0055$ ), но не между  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\beta_4$ . Экспрессия изоформы  $RAR\alpha_2$  статистически достоверно коррелировала с экспрессией изоформы  $RAR\beta_4$  ( $r = 0,67$ ;  $p = 0,007$ ).

Далее мы проанализировали изменение уровней экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в группах, различающихся по экспрессии изоформ  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$ . Так, для группы 1 ( $RAR\beta_4 > RAR\beta_2$ ) аддитивный показатель экспрессии изоформы  $RAR\alpha_1$  был незначительно повышен (в 1,95 раза;  $p = 0,62$ ) по сравнению с группой 2 ( $RAR\beta_4 < RAR\beta_2$ ). Вместе с тем мы обнаружили кардинальное различие групп 1 и 2 по экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$ : совокупный уровень экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$  был в 10,95 раза выше у больных с преобладанием экспрессии изоформы  $RAR\beta_4$  над  $RAR\beta_2$  (группа 1) в отличие от пациентов из группы 2, у которых экспрессия  $RAR\beta_2$  была повышена относительно изоформы  $RAR\beta_4$  (рис. 3).

Известно, что снижение концентрации опухолевого парпротеина в моче больных (белок Бенс-Джонса) является одним из важнейших маркеров ответа на проводимую противоопухолевую терапию при ММ [13]. Наши данные показывают, что среднее значение снижения концентрации белка Бенс-Джонса в группе 1, в которую были включены пациенты с гиперэкспрессией изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\beta_4$ , равнялось 32,8% и было статистически достоверно ниже аналогичного показателя для группы 2 (62,8%;  $p = 0,037$ ), пациенты из которой характеризовались сниженными значениями  $\Delta C_t$  экспрессии этих изоформ относительно группы 1 (рис. 4, *a*).

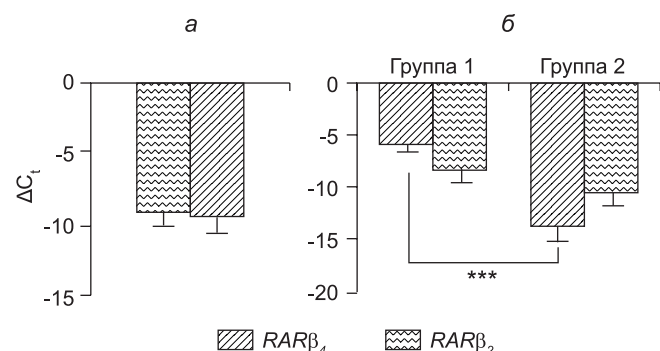


Рис. 2. Экспрессия изоформ  $RAR\beta_4$  и  $RAR\beta_2$  у пациентов с впервые выявленной ММ.

*a* — аддитивные показатели экспрессии изоформ  $RAR\beta_4$  и  $RAR\beta_2$  в общей группе из 15 обследованных пациентов; *б* — дифференциальный характер экспрессии изоформ  $RAR\beta_4$  и  $RAR\beta_2$  в общей группе больных; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ .

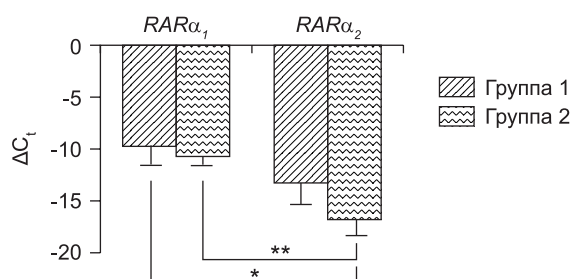


Рис. 3. Экспрессия изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в группах 1 и 2, различающихся по уровням экспрессии изоформ  $RAR\beta_4$  и  $RAR\beta_2$ .

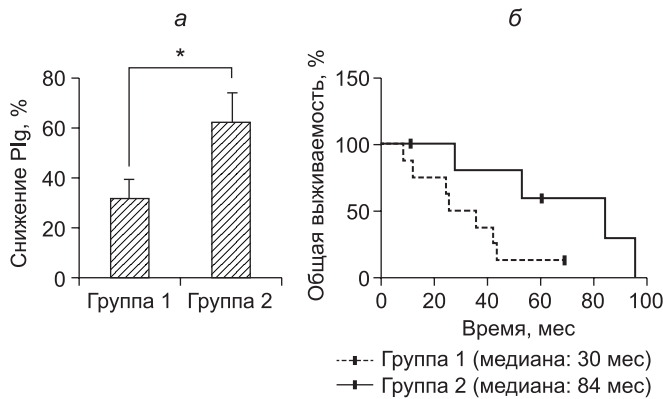


Рис. 4. Эффективность ответа на лекарственную терапию и общая выживаемость в группах 1 и 2, различающихся по экспрессии изоформ  $RAR\alpha_2$ ,  $RAR\beta_4$  и  $RAR\beta_2$ .

*а* — средние значения снижения концентрации патологического иммуноглобулина (IgG) в моче пациентов из групп 1 и 2 после проведенной химиотерапии; \* —  $p < 0,05$ ; *б* — кривые общей выживаемости пациентов из групп 1 и 2.

Сравнение показателей общей выживаемости в группах 1 и 2 также выявило значительное различие между ними. Медиана общей выживаемости больных, включенных в группу 1, равнялась 30 мес и была статистически достоверно более чем в 2 раза ниже данного параметра, определенного для группы 2 (рис. 4, б). В то же время мы не обнаружили статистически значимой корреляции между общей выживаемостью и величиной ответа на проведенное лечение в общей группе из 15 больных ( $r = -0,046$ ;  $p = 0,88$ ). Также мы не выявили достоверной корреляции между общей выживаемостью больных и концентрацией патологического иммуноглобулина ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,47$ ).

**Обсуждение.** ММ характеризуется латентным течением и обнаруживается, как правило, на поздних стадиях с ярко выраженной клинической симптоматикой [14]. Эффективность современных режимов полихимиотерапии в сочетании с аутологичной трансплантацией костного мозга позволяет в ряде случаев увеличить медиану общей выживаемости в сравнении с применявшимся в течение нескольких десятилетий сочетанием «мелфалан—преднизолон» [15—18]. Однако ММ по-прежнему остается инкурабельным заболеванием, а медиана общей выживаемости для данной нозологии в основном не превышает 3—4 лет. Эти обстоятельства создают предпосылки для поиска и изучения новых маркерных факторов, которые могли бы иметь важное значение при выборе оптимальных режимов лекарственной терапии ММ и служить возможными мишенями для известных и вновь синтезируемых таргетных препаратов.

В своей работе мы исследовали значение экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  у первичных больных ММ. Экспрессия изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  была детектирована у всех 15 исследованных пациентов, однако у большинства из них экспрессия изоформы  $RAR\alpha_1$  превалировала над экспрессией изоформы  $RAR\alpha_2$ , с разницей между суммарными уровнями  $\Delta C_t$  более чем в 20 раз (см. рис. 1, б). Полученные данные, вероятно, указывают на то, что изоформа  $RAR\alpha_1$  (но не  $RAR\alpha_2$ ) является доминантно экспрессируемой изоформой, образующейся в процессе транскрипции с общего гена  $RAR\alpha$ . Наши результаты частично подтверждаются работой S. Wang и др., которые установили, что экспрессия изоформы  $RAR\alpha$  обнаруживается у ~ 30% больных с впервые выявленной ММ, тогда как экспрессия изоформы  $RAR\alpha_1$  была выявлена у всех исследованных ими пациентов [19].

Известно, что одним из важнейших  $RAR\alpha$ -таргетных генов является ген рецептора ретиноевой кислоты  $RAR\beta$  [20]. Следу-

ет отметить, что в результате альтернативного сплайсинга гена  $RAR\beta$  происходит образование двух главных изоформ  $RAR\beta$  —  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$ , обладающих антагонистичными функциями [21]. Кроме того, ранее мы установили, что дифференциальный характер экспрессии изоформ  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$  может служить новым прогностическим фактором в оценке общей выживаемости больных ММ [22]. В связи с этим в дальнейшем мы оценили экспрессию изоформ  $RAR\beta_2$  и  $RAR\beta_4$  у исследованных нами больных и сопоставили полученные данные с изменениями экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$ .

Мы обнаружили, что в исходной группе у 53,3% пациентов превалировала экспрессия изоформы  $RAR\beta_4$ , что рассматривается в качестве неблагоприятного прогностического фактора. При этом приблизительно у половины больных (46,7%) наблюдалась обратная картина: значительное снижение экспрессии изоформы  $RAR\beta_4$  в сочетании с гиперэкспрессией изоформы  $RAR\beta_2$ . Высокий уровень экспрессии  $RAR\beta_2$ , ассоциированный с низкой экспрессией изоформы  $RAR\beta_4$  или ее инактивацией, расценивается большинством исследователей как позитивный прогностический фактор, поскольку  $RAR\beta_2$  является опухолевым супрессором, активность которого оказывается частично или полностью подавленной в результате злокачественной трансформации.

Интересно, что при сравнении уровней экспрессии изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в группах, различающихся по преобладанию экспрессии изоформ  $RAR\beta_2$  или  $RAR\beta_4$  (группы 1 и 2), мы не выявили значительных различий между этими двумя группами по среднему уровню экспрессии изоформы  $RAR\alpha_1$ , тогда как по уровню экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$  группы 1 и 2 различались более чем в 10 раз (см. рис. 3).

Полученные молекулярно-биологические различия в группах 1 и 2 по уровню экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$  оказались сопряжены со значительным различием этих групп по таким важным клиническим показателям, как ответ на лекарственную терапию и общая выживаемость больных (рис. 4, а, б). Так, для группы 1 с гиперэкспрессией изоформы  $RAR\alpha_2$  были отмечены меньшая величина ответа на лекарственную терапию и более низкое значение медианы общей выживаемости по сравнению с группой 2, включавшей пациентов с более низким уровнем экспрессии изоформы  $RAR\alpha_2$ .

Таким образом, мы предположили, что экспрессия изоформы  $RAR\alpha_2$ , но не  $RAR\alpha_1$  в первую очередь может играть роль маркерного фактора, изменения которого, вероятно, отражают степень злокачественного потенциала малигнизированных плазматических клеток, выражающуюся в большей агрессивности их фенотипических свойств и высокой резистентности к цитостатической терапии.

**Заключение.** В данной работе мы исследовали значение экспрессии изоформ  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  гена рецептора ретиноевой кислоты  $RAR\alpha$  у 15 больных с впервые выявленной ММ. Мы показали, что различный характер экспрессии — прежде всего, изоформы  $RAR\alpha_2$  в сочетании с гиперэкспрессией изоформы  $RAR\beta_4$ , но не  $RAR\alpha_1$  — может рассматриваться в качестве возможного маркерного фактора при оценке ответа на лекарственную терапию и прогнозе общей выживаемости больных ММ.

Дальнейшее исследование роли изоформ  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  в патогенезе не только ММ, но и других злокачественных опухолей, безусловно, должно расширить и систематизировать наши предварительные результаты, полученные в этой работе, главным образом в направлении изучения и детализации различных эффекторов и сигнальных каскадов, которые могут регулироваться изоформами  $RAR\alpha_1$  и  $RAR\alpha_2$  и вносить существенный вклад в процесс канцерогенеза.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—11, 13—21)  
см. REFERENCES)

12. Калитин Н.Н., Буравцова И.В. Корреляция экспрессии транскрипционного фактора RAR $\alpha$  и генов VEGFR3-зависимой сигнальной системы при множественной миеломе. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2015; 8(1): 31—6.
22. Калитин Н.Н., Буравцова И.В. Дифференциальная экспрессия изоформ  $\beta_2$  и  $\beta_4$  гена рецептора ретиноевой кислоты RAR $\beta$  в качестве возможного прогностического фактора при множественной миеломе. *Вопросы онкологии*. 2015; 61(6): 945—8.

Поступила 13.04.16

REFERENCES

1. LeBien T.W., Tedder T.F. В lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008; 112(5): 1570—80.
2. Palumbo A., Anderson K. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(11): 1046—60.
3. Bjorklund C.C., Baladandayuthapani V., Lin H.Y., Jones R.J., Kuitatse I., Wang H. et al. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications. *Leukemia*. 2014; 28(2): 373—83.
4. Boyle E.M., Davies F.E., Leleu X., Morgan G.J. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*. 2014; 99(4): 605—12.
5. Hjal T.A., Murray J.C. Genomic structure of the human retinoic acid receptor- $\alpha$ 1 gene. *Mamm. Genome*. 1999; 10(5): 528—9.
6. Leroy P., Krust A., Zelent A., Mendelsohn C., Garnier J.M., Kastner P. et al. Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor  $\alpha$  are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.* 1991; 10(1): 59—69.
7. Brand N.J., Petkovich M., Chambon P. Characterization of a functional promoter for the human retinoic acid receptor-alpha (hRAR- $\alpha$ ). *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(23): 6799—806.
8. Parrado A., Despouy G., Kra@ba R., Le Pogam C., Dupas S., Choquette M. et al. Retinoic acid receptor alpha variants, RARalpha1DeltaB and RARalpha1DeltaBC, define a new class of nuclear receptor isoforms. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(24): 4901—8.
9. Salazar M.D., Ratnam M., Patki M., Kisovic I., Trumbly R., Iman M. et al. During hormone depletion or tamoxifen treatment of breast cancer cells the estrogen receptor apoprotein supports cell cycling through the retinoic acid receptor  $\alpha$ 1 apoprotein. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(1): R18.
10. Van der Leede B.J., Folkers G.E., van den Brink C.E., van der Saag P.T., van der Burg B. Retinoic acid receptor alpha 1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995; 109(1): 77—86.
11. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975; 36(3): 842—54.
12. Kalitin N.N., Buravtsova I.V. Correlation between expression of RAR $\alpha$  transcription factor and genes of VEGFR3-dependent signaling system in multiple myeloma. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika*. 2015; 8(1): 31—6. (in Russian)
13. Durie B.G., Bataille R. Therapeutic implications of myeloma staging. *Eur. J. Haematol. Suppl.* 1989; 51: 111—6.
14. Collins C.D. Multiple myeloma. *Cancer Imaging*. 2004; 4 Spec. No A: S47—53.
15. Barlogie B., Jagannath S., Desikan K.R., Mattox S., Vesole D., Siegel D. et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 1999; 93(1): 55—65.
16. Attal M., Harousseau J.L., Stoppa A.M., Sotto J.J., Fuzibet J.G., Rossi J.F. et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Fran@ais du My@lomc. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335(2): 91—7.
17. Child J.A., Morgan G.J., Davies F.E., Owen R.G., Bell S.E., Hawkins K. et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(19): 1875—83.
18. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111(6): 2962—72.
19. Wang S., Tricot G., Shi L., Xiong W., Zeng Z., Xu H. et al. RARalpha2 expression is associated with disease progression and plays a crucial role in efficacy of ATRA treatment in myeloma. *Blood*. 2009; 114(3): 600—7.
20. Pozzi S., Rossetti S., Bistulfi G., Sacchi N. RAR-mediated epigenetic control of the cytochrome P450 Cyp26a1 in embryocarcinoma cells. *Oncogene*. 2006; 25(9): 1400—7.
21. Xu X.C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett.* 2007; 253(1): 14—24.
22. Kalitin N.N., Buravtsova I.V. Differential expression  $\beta_2$  and  $\beta_4$  isoforms of retinoic acid receptor gene RAR $\beta$  as possible prognostic factor at multiple myeloma. *Voprosy onkologii*. 2015; 61(6): 945—8. (in Russian)

Received 13.04.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.72-008.8-076.4

Доценко Т.Г.<sup>1</sup>, Шлыкова Г.И.<sup>1</sup>, Теплякова О.В.<sup>1,2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ — КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

<sup>1</sup> Медицинское объединение «Новая больница», 620109, Екатеринбург; <sup>2</sup> ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, 620028, Екатеринбург, Российская Федерация

В обзоре представлены современные данные об особенностях взятия синовиальной жидкости (СЖ), а также об информативности ряда ее показателей для решения основной клинической дифференциально-диагностической задачи, а именно — выделения группы септических и микрокристаллических артритов. Показано, что минимальный общедоступный объем исследования СЖ должен включать: определение числа лейкоцитов (пороговый уровень для диагностики септических артритов — 50 000—100 000 кл/мкл) и доли полиморфноядерных клеток (пороговый уровень — 90%), исследование с помощью световой микроскопии на содержание кристаллов, окраску по Граму и культуральное исследование СЖ; все это — при обязательном учете клинических данных. Традиционная оценка содержания глюкозы и протеина в СЖ малоинформативна. Определение концентрации прокальцитонина и лактата в СЖ перспективно для установления септического генеза артрита. Чувствительность и специфичность световой микроскопии достаточно высоки, в связи с чем отсутствие поляризационного микроскопа не может являться препятствием для проведения кристаллографического исследования СЖ.

Для корреспонденции: Теплякова Ольга Вячеславовна, д-р мед. наук, проф. каф. поликлинической терапии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, Екатеринбург, e-mail: oteplyakova69@gmail.com