

На правах рукописи

Неупокоева Мария Николаевна

**Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность: молекулярно-
генетические механизмы развития и возможности ранней
персонифицированной диагностики**

14.01.05 – кардиология
14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт кардиологии

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Тепляков Александр Трофимович

Доктор медицинских наук

Шилов Сергей Николаевич

Официальные оппоненты:

Барбараш Ольга Леонидовна

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», директор

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук", г. Новосибирск.

Защита состоится «___» _____ 201__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.279.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт кардиологии по адресу г. Томск, ул. Киевская 111а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 201__ года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук



Гракова Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Данные статистики России свидетельствуют о неуклонном увеличении заболеваемости злокачественными новообразованиями с 469,2 тыс. человек в 2005 году до 617,1 тыс. человек в 2017 году. Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным опухолевым заболеванием у женщин, представляя собой актуальную проблему здравоохранения России и других экономически развитых стран мира [Каприн А.Д. и соавт., 2018]. За последние десятилетия новые технологии химиотерапевтического лечения, а также использование более агрессивных протоколов для лечения онкологических больных обеспечили весьма существенное повышение выживаемости при злокачественных новообразованиях. Так, в США 5-летняя выживаемость пациенток при раке молочной железы ранней стадии увеличилась с 79% в 1990 г. до 89% в 2015 г. [Miller K.D. et al., 2016]. Но, вместе с этим, также значимо возросла частота отсроченных кардиоваскулярных осложнений, ассоциируемых с химиотерапевтическим лечением.

Установлено, что осложнения, вызванные кардиотоксичностью полихимиотерапии (ПХТ), оказывают негативное влияние на качество жизни и общую выживаемость пациентов, независимо от прогноза, связанного с опухолевым процессом. По мнению ведущих экспертов АСС/АНА фактическая угроза преждевременной сердечно-сосудистой смертности от кардиотоксических осложнений может быть выше, по сравнению с риском смерти от онкологического заболевания [Bonow R.O. et al., 2005].

Кардиотоксическим действием обладают антрациклины, и другие биологические агенты, такие как трастузумаб, мультикиназные ингибиторы, например, сунитиниб, применение которых способно вызывать развитие неблагоприятных клинических состояний сердечно-сосудистой системы [Васюк А.Ю и соавт., 2016; Zamorano J.L. et al., 2016; Ginzac A. et al., 2019].

Широкое клиническое использование антрациклинов ограничивается их кумулятивным и дозозависимым кардиотоксическим действием, которое может проявляться как бессимптомной систолической дисфункции левого желудочка, так и клинически выраженной сердечной недостаточности (СН), сопровождающейся снижением качества жизни и крайне неблагоприятным прогнозом с высокой отдаленной летальностью [Васюк А.Ю и соавт., 2016; Zamorano J.L. et al., 2016; Nebigil C.G. et al., 2018; Almuwaqqat Z. et al., 2019; Sala V. et al., 2019].

Многие исследователи признают важность раннего выявления кардиотоксичности, поскольку кардиомиопатия, индуцированная применением антрациклинов, ассоциируется с более плохим прогнозом, по сравнению с кардиомиопатиями от других причин [Ganame J. et al., 2007; Zamorano J.L. et al., 2016; Nebigil C.G. et al., 2018; Almuwaqqat Z. et al., 2019]. При этом развивается резистентная к медикаментозной терапии левожелудочковая СН с неуклонно ухудшающимся прогнозом выживаемости [Cardinale D. et al., 2010].

Одним из предполагаемых механизмов кардиотоксичности антрациклинов является индуцированное свободными радикалами повреждение миокарда [Montañez-Valverde R.A., et al., 2018; Hantson P, 2019; Songbo M. et al., 2019]. Однако гипотеза окислительного стресса, как основного механизма повреждения миокарда при терапии антрациклинами, была подвергнута сомнению серией исследований, в которых лечение антиоксидантами не предотвращало сердечную токсичность, вызванную доксорубицином [Kalam K. et al., 2013]. Описаны некоторые другие клеточные изменения, включающие повреждение ДНК, ингибирование синтеза белка, дегенерацию миофибрилл и апоптоз кардиомиоцитов [Wang Y. et al., 2018]. В экспериментальных исследованиях показано, что фармакологическое или генетическое ингибирование активности p53 снижает индуцированный доксорубицином апоптоз кардиомиоцитов и эндотелиоцитов с сопутствующим улучшением функции сердца [Zhu W. et al., 2014].

В качестве возможного патогенетического механизма кардиотоксичности химиотерапии была предложена гипотеза, которая обосновывает повышенный выброс Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула кардиомиоцитов с избыточной продукцией активных форм кислорода и локальным высвобождением провоспалительных цитокинов из макрофагов, вызывающих индукцию апоптоза кардиомиоцитов [Sawyer D.B. et al., 2013]. Тем не менее, анализ современной литературы свидетельствует о том, что в настоящее время выполняется явно недостаточное количество исследований, касающихся фундаментальных аспектов структурно-функциональных нарушений миокарда в процессе развития кардиотоксичности и антрациклиновой кардиомиопатии в результате целевого воздействия сочетанной терапии доксорубицином и лучевой терапии.

В связи с трудностями ранней диагностики кардиотоксичности применяются и усовершенствуются различные методы клинической оценки состояния сердца. На сегодняшний день диагностика кардиомиопатии, связанной с приемом противоопухолевых химиопрепаратов, традиционно основана на серийной регистрации ЭКГ и использовании двухмерной эхокардиографии (Эхо-КГ) [Васюк А.Ю и соавт., 2016; Zamorano J.L. et al., 2016; Anqi Y. et al., 2019].

Однако, в силу особенностей патофизиологических механизмов развития кардиотоксичности химиотерапии мониторинг фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) по данным двухмерной Эхо-КГ обладает сравнительно низкой чувствительностью для ранней диагностики повреждения миокарда; снижение ФВ ЛЖ идентифицируется только при большом объеме повреждения кардиомиоцитов [Селиверстова Д.В. и соавт., 2016; Васюк А.Ю и соавт., 2016; Anqi Y. et al., 2019]. В связи с этим в настоящее время уделяется особое внимание разработке инновационных технологий, позволяющих диагностировать нарушения сократимости миокарда на самых ранних субклинических стадиях развития кардиотоксичности либо прогнозировать развитие сердечно-сосудистых

осложнений еще до начала курса полихимиотерапии [Riddell E. et al, 2018; Skála M. et al, 2019].

Таким образом, кардиоонкология - стала новой медицинской дисциплиной по нескольким причинам. Во-первых, выжившие с опухолевыми заболеваниями имеют риск сердечно-сосудистых заболеваний, так как заболевания сердечно-сосудистой системы широко распространены среди населения в целом. Во-вторых, как традиционные так и новые методы лечения рака связаны с кардиотоксичностью [Koutsoukis A. et al. 2018]. Появление новых классов химиотерапевтических препаратов часто не снижает, а порой даже повышает риск развития кардиотоксичности.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования по раннему выявлению кардиотоксичных повреждений химиотерапией, разработки и внедрению в клиническую практику новых более эффективных алгоритмов, программ эффективной и безопасной химиотерапии, способных защитить от возможного повреждающего действия сердце и другие внутренние органы человека. Обращают на себя внимание впечатляющие достижения в отношении онкологической диагностики, успехи, связанные с широким применением современных химиотерапевтических препаратов в онкологической практике, достижения в лечении злокачественных новообразований и неуклонно увеличивающееся число пациентов с хорошей отдаленной выживаемостью. С другой стороны, статистика возрастающей смертности от сердечно-сосудистой патологии у женщин с раком молочной железы, у которых в предшествующем периоде жизни не было поражения сердечно-сосудистой системы, диктует необходимость дальнейших углубленных исследований в этом направлении, обеспечение комплексного междисциплинарного подхода, направленного на оптимальную коррекцию и профилактику всех модифицируемых факторов риска. Все это делает проблему кардиотоксичности химиотерапии весьма актуальной и социально значимой. Механизмы, в результате которых антрациклины вызывают кардиотоксичность остаются неизвестными, и на сегодняшний день не существует надежных методов прогнозирования риска развития антрациклиновой кардиомиопатии.

Цель исследования: изучить молекулярно-генетические механизмы развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности для идентификации ранних предикторов риска развития хронической сердечной недостаточности.

Задачи исследования

1. Провести анализ распространенности и клинических проявлений кардиотоксического ремоделирования миокарда во время проведения полихимиотерапии и в течение 12-месячного проспективного наблюдения после завершения химиотерапии с использованием антрациклиновых антибиотиков у женщин с раком молочной железы.
2. Оценить роль генов белков апоптоза (белка p53 и каспазы 8), про- и антиоксидантной систем (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутаза и NADPH-оксидазы), функционального состояния эндотелия (эндотелиальной

NO-синтазы и А-рецептора эндотелина-1) и цитокиновой системы (интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α) в развитии ремоделирования миокарда при химиотерапии рака молочной железы антрациклинами для идентификации генетических детерминант повышенного риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности.

3. Выявить молекулярные механизмы ремоделирования миокарда на фоне полихимиотерапии с антрациклинами с целью определения ранних объективных предикторов развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы.

4. Охарактеризовать влияние полихимиотерапии рака молочной железы с использованием антрациклиновых антибиотиков на развитие дисфункции эндотелия.

5. Обосновать современную стратегию прогноза и ранней диагностики развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы.

Научная новизна

На основе исследований генетических факторов риска и молекулярных механизмов развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности выработана стратегия персонифицированного прогнозирования развития сердечно-сосудистых осложнений при полихимиотерапии рака молочной железы антрациклиновыми антибиотиками. Проведен комплексный анализ роли растворимого Fas-лиганда, провоспалительных цитокинов, мозгового натрийуретического пептида и дисфункции эндотелия в развитии антрациклин-индуцированного ремоделирования миокарда.

Впервые показано, что плазменные уровни растворимого Fas-лиганда (sFas-лиганд) и предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) после окончания полихимиотерапии являются более информативными показателями прогноза развития антрациклин-индуцированного ремоделирования сердца через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии по сравнению с уровнями цитокинов - фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), а также эндотелина-1.

Впервые проведен комплексный анализ полиморфизмов генов белков, участвующих в регуляции апоптоза и функционального состояния эндотелия, реализации окислительного стресса и воспалительной реакции в патогенезе антрациклин-индуцированной кардиотоксичности, что позволило идентифицировать генетические маркеры в качестве этиологических факторов, ассоциированных с высоким риском развития поражения сердца при терапии антрациклинами.

Получены новые данные свидетельствующие о том, что высокий риск развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности ассоциирован с носительством генотипов Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522), T/T гена *NADPH-оксидазы* (rs4673) и T/T гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) (rs1799983).

Впервые представлена информативная модель прогноза развития кардиотоксического поражения миокарда через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии на основе многофакторной оценки, включающей уровень NT-proBNP и наличие генотипа Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522).

Теоретическая и практическая значимость

На основе многофакторного анализа этиологических и патогенетических факторов развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности получены новые данные, которые открывают широкие возможности для разработки современных подходов к доклинической диагностике и патогенетической первичной профилактике поражения миокарда при терапии опухолевых заболеваний антрациклиновыми антибиотиками. Возможными мишенями для разработки патогенетической профилактической терапии, направленной на защиту сердца от его антрациклин-индуцированного поражения, могут явиться выявленные в исследовании патогенетические факторы повреждения миокарда при полихимиотерапии: активация апоптоза, цитокиновая агрессия и дисфункция эндотелия.

Повышенные концентрации sFas-лиганда и NT-proBNP в плазме крови после завершения полихимиотерапии позволяют выделять группы пациентов с повышенным риском развития антрациклин-индуцированного поражения сердца для осуществления профилактических мероприятий, направленных на предотвращение или уменьшения негативного влияния антрациклинов на миокард.

Выявление носителей генотипов Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522), T/T гена *NADPH-оксидазы* (rs4673) и T/T гена *NOS3* (rs1799983) еще до начала противоопухолевой терапии дает возможность проводить необходимые научно-обоснованные профилактические мероприятия, направленные на предотвращение развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности, еще до начала применения антрациклинов.

Использование прогностической модели с одновременной оценкой концентрации NT-proBNP и полиморфизма гена белка *p53* (rs1042522) позволяет выделять группы высокого риска развития антрациклин-индуцированного поражения сердца для осуществления эффективных персонифицированных профилактических мероприятий, направленных на предотвращение развития патологического процесса и снижение смертности.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кардиотоксичность, характеризующаяся снижением фракции выброса левого желудочка более 10% от исходной и развитием признаков ХСН через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии, возникает у 29,5% больных с раком молочной железы после комбинированного лечения, включающего антрациклины.

2. В патогенезе антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы имеют значение активация апоптоза, повышение содержания провоспалительных цитокинов в крови и дисфункция эндотелия.

3. К развитию антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы предрасполагает носительство генотипов Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522), Т/Т гена *NADPH-оксидазы* (rs4673) и Т/Т гена *NOS3* (rs1799983).

4. Плазменные уровни sFas-лиганда и NT-proBNP после окончания полихимиотерапии у женщин с раком молочной железы являются более информативными показателями прогноза развития антрациклин-индуцированного ремоделирования сердца через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии, чем повышение содержания провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 β , а также эндотелина-1 в крови.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели проведено исследование, включающее несколько последовательных этапов. На первом этапе была изучена отечественная и зарубежная литература, посвященная данной тематике.

За время наблюдения обследовано 176 пациенток с раком молочной железы, получавших антрациклиновые антибиотики в составе схем полихимиотерапевтического лечения. Основной задачей второго этапа являлась оценка роли генов апоптоза (белок *p53* и *каспаза 8*), про- и антиоксидантных систем (глутатионпероксидаза (*GPX1*), супероксиддисмутаза (*SOD*) и *НАДФН-оксидазы*), провоспалительных цитокинов (*ИЛ-1 β* и *ФНО- α*), эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) и А-рецептора эндотелина-1 (*ENDRA*), а также биохимических маркеров (цитокинов (*ИЛ-1 β* и фактора ФНО- α), sFas-лиганда, эндотелина-1 и NT-proBNP в развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности. Исследование генетических полиморфизмов проводилось однократно. Биохимические маркеры определялись - трехкратно: до начала полихимиотерапии, после завершения и через 12 месяцев после окончания лечения рака молочной железы с использованием антрациклинов.

На третьем этапе исследования оценивали прогностическую и диагностическую значимость изученных генетических факторов и биомаркеров в оценке риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности. Проводилась статистическая обработка результатов проведенного исследования.

Степень достоверности результатов

О достоверности результатов диссертационного исследования свидетельствует достаточная выборка больных (общий объем исследуемой выборки составил 176 человек), применение современных методов

исследований, непосредственное участие соискателя в получении исходных данных, использование адекватных методов статистического анализа, что обеспечивает достаточную объективность и достоверность результатов.

Внедрение результатов исследования в практику

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, внедрены в учебный процесс кафедр патологической физиологии и клинической патофизиологии, поликлинической терапии и ОВП ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России (г. Новосибирск), используются в работе клиники НИИ кардиологии Томского НИМЦ (г. Томск).

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конгрессе «Сердечная недостаточность, 2016» (Москва, 2016 г.); VIII международном конгрессе «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2017 г.), IX международном конгрессе «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2018 г.), конгрессе «Сердечная недостаточность, 2018» (Москва, 2018 г.), X международном конгрессе «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2019).

Публикации

По теме опубликовано 16 научных работ, в том числе 4 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в участии планирования исследования; изучении и анализе литературы по теме диссертации; отборе больных с раком молочной железы, получавших в составе схем полихимиотерапевтического лечения антрациклины, для включения их в исследование, проспективном наблюдении включенных в исследование больных; формировании баз данных, статистической обработке материала и его анализе; написании тезисов, научных статей, в оформлении патента Российской Федерации; выступлениях с устными и стендовыми докладами на ведущих российских конгрессах по кардиологии; во внедрении в практику результатов исследований по теме диссертационной работы.

Объем и структура диссертации

Текст диссертации изложен на 154 страницах, состоит из введения, обзора литературы, характеристики обследованных больных и методов исследования, результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и списка литературы из 31 отечественных и 199 зарубежных источников. Диссертация содержит 35 таблиц и 12 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 176 женщин с раком молочной железы в возрасте от 35 до 55 лет, получавших антрациклиновые антибиотики в составе схем полихимиотерапевтического лечения. В исследование вошли пациенты с установленным диагнозом РМЖ II-III стадии. Для лечения РМЖ применялись схемы АС и ТАС (комбинация доксорубицина, циклофосфамида и паклитаксела) и АС (комбинация доксорубицина и циклофосфамида). Кумулятивная доза доксорубицина составляла 300-360 мг/м². Также до начала курса ПХТ всем больным проводилась лучевая терапия.

Пациентки, участвующие в данном исследовании, не имели доказанной патологии со стороны сердечно-сосудистой системы, выраженной сопутствующей патологии, сахарного диабета до начала противоопухолевого лечения. Отсутствие кардиологической патологии было подтверждено данными анамнеза, ЭКГ, ЭхоКГ. В исследование не включались женщины с прогрессированием основного заболевания на фоне проводимого противоопухолевого лечения.

Наличие любого из ниже перечисленных заболеваний являлось критерием исключения из исследования: ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, кардиомиопатии любой этиологии и пороки сердца, предшествующие онкологическому заболеванию.

Исключались из группы наблюдаемых больные при наличии: 1) поражений клапанного аппарата сердца; 2) кардиомиопатий (гипертрофической, дилатационной, рестриктивной); 3) ишемической болезни сердца; 4) артериальной гипертензии; 5) сахарного диабета 1-го и 2-го типа; 6) заболеваний щитовидной железы; 7) тяжелой печеночной и почечной недостаточности; 8) клинически выраженных нарушений функции внешнего дыхания; 9) хронического алкоголизма, психических расстройств.

Все исследования были выполнены с информированного согласия больных и соответствовали этическим нормам Хельсинской декларации (2000 г.). Выполнено открытое клинически контролируемое 12-месячное проспективное исследование по изучению патогенетической роли и прогностической значимости биомаркеров цитокиновой и эндотелиновой систем, системы натрийуретических пептидов, маркеров апоптоза, а также генетических детерминант, определяющих инициацию и прогрессирование поражения миокарда при терапии РМЖ антрациклинами.

Наблюдение пациенток проводилось в четыре этапа: до начала лечения антрациклиновыми антибиотиками, после проведения первого курса полихимиотерапии, по окончании лечения и через 12 месяцев после завершения лечения основного заболевания. При ухудшении самочувствия пациентов в периоды между установленными сроками наблюдения, проводились дополнительные обследования. После первого курса ПХТ оценивались клинические признаки развития острой кардиотоксичности

(развитие транзиторной дисфункции левого желудочка, наджелудочковой аритмии, неспецифических изменений на ЭКГ, симптомов СН).

Всем пациенткам в динамике (до начала курса ПХТ, после завершения ПХТ и через 12 месяцев после завершения ПХТ) проводили общеклиническое обследование с оценкой жалоб и клинического статуса, толерантности к физической нагрузке, качества жизни; лабораторное обследование с проведением общего анализа мочи, общего и биохимического анализов крови, и инструментальные обследования (электрокардиографию (ЭКГ), эхокардиографию (Эхо-КГ), R-графию органов грудной клетки). Дополнительно однократно проводилось генетическое исследование (типировали аллели генов апоптоза (белок *p53* и *каспаза 8*), про- и антиоксидантных ферментов (*GPX1*, *SOD* и *НАДФН-оксидаза*), провоспалительных цитокинов (*ИЛ-1 β* и *ФНО- α*), эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) и А-рецептор эндотелина-1 (*ENDRA*)).

Помимо этого у пациенток с раком молочной железы методом иммуноферментного твердофазного анализа проводили биохимическое исследование крови для измерения сывороточной концентрации цитокинов (*ИЛ-1 β* и *ФНО- α*), sFas-лиганда, эндотелина-1 и NT-proBNP до начала курса ПХТ, после завершения ПХТ и через 12 месяцев после завершения ПХТ. До начала курса ПХТ и через 12 месяцев после завершения ПХТ оценивали функцию эндотелия.

Разделение пациентов на функциональные классы проводили согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) (1964 г.), с использованием теста с 6-минутной ходьбой и по Шкале оценки клинического состояния при ХСН (ШОКС). Липидный спектр крови определяли на биохимическом анализаторе «A25» фирмы «BioSystems» (Испания). Электрокардиографическое исследование проводили по общепринятой методике на компьютерном 12-канальном кардиографе ДК-01 "СЭМ" (Россия). Эхокардиографическое исследование проводилось на ультразвуковом аппарате "Mindray DC-70".

Функцию эндотелия оценивали на ультразвуковом аппарате. Оценивали следующие параметры: 1) исходный диаметр плечевой артерии; 2) прирост диаметра плечевой артерии (ПА) после сжатия манжетой – проба с реактивной гиперемией, характеризующая эндотелийзависимую дисфункцию (ЭЗД); 3) прирост диаметра плечевой артерии после сублингвального приема нитроглицерина, характеризующий эндотелий независимую дисфункцию (ЭНЗД).

Для выделения ДНК из клеток буккального эпителия использовали метод фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили методом ПЦР.

Статистическая обработка материала

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ STATISTICA v. 13.3. Количественные переменные определяли в виде медианы (Me), а также 25-й и 75-й квартилей (25Q и 75Q). Для сравнительного анализа значений этих показателей

использовали Н-критерий Краскела-Уоллеса с последующим post-hoc (множественным) сравнением между отдельными группами двусторонним вариантом точного критерия Фишера (Fisher exact, two-tailed) с поправкой Бонферрони (*Bonferroni-Korrektur*). Характер распределения полученных данных оценивали, используя критерии нормальности Колмогорова–Смирнова, а также метод Шапиро–Уилкса. В условиях нормального распределения выборки достоверность различия определить с помощью t-критерия Стьюдента (непарный для независимых наблюдений, парный – для зависимых). При отсутствии нормального распределения для независимых наблюдений использовать U-критерии Манна-Уитни.

Для контроля результатов генетического исследования случайной выборки особей из популяции использовали тест на равновесие Харди-Вайнберга. Соответствие равновесию Харди-Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера (p exact). Точный тест Фишера на соблюдение распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга осуществляли с помощью онлайн программы на сайте Института генетики человека (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) (г. Мюнхен, Германия). Определение ассоциации генотипа с вариантами течения заболевания проводили с помощью многофакторного логистического регрессионного анализа, на основании результатов которого вычисляли OR (odds ratios, отношение шансов), его доверительный интервал (95%С.I.) и уровень значимости полученных результатов (p-value). Отношение шансов вычислить с поправкой на возраст, кумулятивную дозу химиотерапевтических препаратов, схему ПХТ и без поправок на таковые.

Для оценки прогностического влияния факторов выполнили анализ соответствующих ROC (receiver operating characteristic)-кривых. На ROC-кривой определяли точку, соответствующую оптимальному соотношению чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-функциональные изменения, установленные у исследованных больных, в процессе 12-месячного проспективного наблюдения

По итогам обследования через 12 месяцев после окончания ПХТ пациентки, находившиеся в состоянии ремиссии основного заболевания, были разделены на 2 группы: больные с развитием кардиотоксического ремоделирования (группа 1 - 52 человека, возраст - 45,0 [42,0; 47,0] лет) и женщины с сохраненной функцией сердца (группа 2 - 124 человека, возраст - 45,0 [42,0; 50,0] лет). По возрасту, схемам ПХТ, кумулятивной дозе доксорубицина, стадии РМЖ, суммарной очаговой дозе при лучевой терапии и пораженной молочной железе (правая или левая) исследованные группы были сопоставимы. Однако в 1-й группе через 12 месяцев после завершения ПХТ у всех пациенток были выявлены признаки ХСН по показателям ТШХ и ШОКС, соответствующие 1 ФК (75%) и 2 ФК (25%).

До начала ПХТ с использованием антрациклинов все ЭхоКГ-показатели в исследованных группах были сопоставимы, - в пределах физиологических значений (табл 1).

Таблица 1

Данные ЭхоКГ в исследованных группах до начала курса ПХТ (Me [Q25; Q75])

Показатель	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U-критерии Манна-Уитни
ФВ ЛЖ (%)	65,5 [62; 70]	67,0 [62; 70]	0,663
ЛП (мм)	28 [26; 31]	28 [25,5; 31]	0,871
КДР (мм)	44 [42; 48,5]	45,5 [43; 49]	0,284
КСР (мм)	28 [26; 31]	28 [26; 31]	0,764
МЖП (мм)	10 [9; 11]	10 [9; 11]	0,992
ЗСЛЖ (мм)	10 [10; 11]	10 [10; 11]	0,774

Примечание. ПХТ – полихимиотерапия, КДР – конечный диастолический размер, КСР – конечный систолический размер, ЛП – левое предсердие, МЖП – межжелудочковая перегородка, ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ФВ ЛЖ - фракция выброса левого желудочка.

В динамике наблюдения после окончания курса ПХТ все ЭхоКГ-показатели в исследованных группах также были сопоставимы. Однако через 12 месяцев после окончания ПХТ в группе 1 регистрировалось существенно ($p=0,001$) более низкий показатель ФВ ЛЖ, более высокие значения КДР и КСР. Также выявлены различия в исследованных группах по размерам МЖП и ЗСЛЖ (табл. 2).

Таблица 2

Эволюция показателей внутрисердечной гемодинамики в исследованных группах в процессе 12-месячного наблюдения (Me [Q25; Q75])

Показатель	После завершения ПХТ			Через 12 месяцев после завершения ПХТ		
	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U-критерии Манна-Уитни	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U-критерии Манна-Уитни
ФВ ЛЖ (%)	66,5 [62; 69]	65 [63; 69,5]	0,773	54,5 [51,5; 58]	66 [63; 69]	<0,000001
ЛП (мм)	28,5 [27; 31]	28 [26; 31]	0,589	30 [28; 32]	29 [27; 31]	0,064
КДР (мм)	47 [43,5; 49]	46 [43; 48]	0,213	51 [49; 54,5]	47 [44; 49]	<0,000001
КСР (мм)	28,5 [26; 30]	28 [26,5; 30]	0,789	33 [31; 35]	29 [27; 31]	<0,000001
МЖП (мм)	10 [9; 11]	10 [9; 11]	0,992	10,5 [10; 11]	10 [9; 11]	0,041
ЗСЛЖ (мм)	10 [10; 11]	10 [10; 11]	0,774	11 [10; 12]	10,5 [10; 11]	0,008

Примечание. ПХТ – полихимиотерапия, КДР – конечный диастолический размер, КСР – конечный систолический размер, ЛП – левое предсердие, МЖП – межжелудочковая перегородка, ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ФВ ЛЖ - фракция выброса левого желудочка.

Следовательно, установленные результаты свидетельствовали о том, что показатели структурно-функционального состояния сердца и внутрисердечной гемодинамики в группе 1 через 12 месяцев после окончания ПХТ существенно ($p=0,041-0,001$) ухудшились, в отличие от таковых в группе 2, что отражало прогрессивное развитие дисфункции миокарда после перенесенной ПХТ.

Состояние эндотелиальной дисфункции при развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности

В работе проводили исследование сосудодвигательной функции эндотелия с помощью ультразвукового метода по реакции плечевой артерии на реактивную гиперемию и сублингвальный прием нитроглицерина.

Исходно диаметр ПА в исследованных группах был сопоставим. Однако через 12 месяцев после окончания ПХТ данный показатель в группе 1 с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью стал существенно ($p<0,001$) меньшего диаметра ПА в группе 2. (табл. 3).

В обеих группах ЭЗД была сопоставима до начала лечения РМЖ с использованием антрациклиновых антибиотиков. Через 12 месяцев после завершения ПХТ в 1-группе прирост диаметра ПА оказался на 33,9% ниже ($p<0,001$) аналогичного показателя до начала лечения опухолевого процесса с использованием антрациклинов и на 33,% ниже ($p<0,001$) показателя в группе 2 после завершения ПХТ.

Таблица 3

Оценка состояния вазодилатации плечевой артерии в исследованных группах в процессе 12-месячного проспективного наблюдения (Me [Q25; Q75])

Показатель	До начала ПХТ			Через 12 месяцев после завершения ПХТ		
	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U- критерии Манна- Уитни	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U- критерии Манна- Уитни
Диаметр ПА, мм	4,85 [4,65; 5,1]	4,9 [4,7; 5,2]	0,437	3,95 [3,7; 4,1]	4,9 [4,7; 5,1]	<0,000001
ЭЗД, %	12,4 [11,95; 12,6]	12,8 [12,4; 13,3]	<0,000001	8,2 [7,3; 8,75]	12,3 [11,8; 12,85]	<0,000001
ЭНЗД, %	19,8 [19,1; 20,6]	20,6 [19,3; 21,4]	<0,000001	14,4 [13,7; 15,0]	19,7 [18,6; 20,5]	<0,000001

Примечание. ПХТ - полихимиотерапия, ПА - плечевая артерия, ЭЗД - эндотелийзависимая вазодилатация, ЭНЗД - эндотелийнезависимая вазодилатация

Оценка ЭНЗД показала, что прирост диаметра ПА в пробе с нитроглицерином в исследованных группах до начала курса ПХТ был сопоставимым. Через 12 месяцев после завершения ПХТ прирост диаметра ПА в 1 группе оказался на 27,3% меньше ($p<0,001$) аналогичного показателя до начала ПХТ и на 26,9% меньше ($p<0,001$) показателя ЭНЗД в группе 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных с антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью диагностируется

дисфункция эндотелия, проявляющаяся нарушениями ЭЗД и ЭНЗД вазодилатации. Снижение вазодилатации ПА у пациентов с кардиотоксическим ремоделированием миокарда, вероятнее всего, отражает повышение влияния эндотелиальных вазоконстрикторов, в частности, эндотелина-1, с одной стороны, а также нарушение ЭЗД вазодилатации (прежде всего, за счет дефицита NO) и снижение реакции эндотелия на увеличение «напряжения сдвига» во время пробы с реактивной гиперемией с другой стороны.

Полиморфные варианты генов, предрасполагающие к развитию антрациклин-индуцированной кардиотоксичности

Распределение частот встречаемости генотипов исследованных полиморфизмов генов в группах соответствовало ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга (табл. 4).

На основании анализа по распределению частот встречаемости генотипов гена белка *p53* Arg72Pro экзон 4 (rs1042522) установлены различия в исследованных группах. Оказалось, что у пациенток с развившейся кардиотоксичностью по сравнению с группой женщин без проявлений сердечно-сосудистых осложнений ПХТ частота встречаемости генотипа Arg/Arg была достоверно выше ($p=0,001$), а частота встречаемости генотипа Pro/Pro была значимо меньше ($p=0,028$).

Таблица 4

Частоты встречаемости генотипов в исследованных группах (n, %)

Ген	Генотип	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	χ^2 Пирсона	p-value
<i>P53</i> (Arg72Pro экзон 4, rs1042522)	Arg/Arg	30 (57,7)	38 (30,6)	11,05	0,0008
	Arg/Pro	16 (30,7)	53 (42,7)	2,2	0,137
	Pro/Pro	6 (11,5)	33 (26,6)	4,8	0,028
<i>Каспаза 8</i> (rs3834129)	Del/del	17 (32,7)	41 (33,1)	0,002	0,961
	Ins/del	24 (46,1)	60 (48,4)	0,073	0,786
	Ins/Ins	11 (21,2)	23 (18,5)	0,159	0,689
<i>Каспаза 8</i> (rs1045485)	G/G	40 (76,9)	93 (75,0)	0,073	0,786
	G/C	10 (19,2)	28 (22,6)	0,242	0,622
	C/C	1 (1,9)	3 (2,4)	0,041	0,840
<i>GPX1</i> (rs1050450)	C/C	21 (40,4)	74 (59,7)	5,48	0,019
	C/T	25 (48,1)	44 (35,5)	2,43	0,118
	T/T	6 (11,5)	6 (4,8)	2,58	0,107
<i>SOD2</i> , rs4880	C/C	10 (19,2)	41 (33,1)	3,406	0,064
	C/T	25 (48,1)	59 (44,6)	0,003	0,952
	T/T	17 (32,7)	24 (19,4)	3,641	0,056
<i>NADPH- оксидаза</i> (rs4673)	C/C	13 (25,0)	43 (34,7)	1,34	0,246
	C/T	21 (40,4)	61 (49,2)	1,142	0,285
	T/T	18 (34,6)	20 (16,1)	7,395	0,006

Таблица 4 (продолжение)

Ген	Генотип	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	χ^2 Пирсона	p-value
NOS3 (rs1799983)	G/G	22 (42,3)	72 (58,1)	3,65	0,058
	G/T	19 (36,5)	42 (34,7)	0,115	0,734
	T/T	11 (21,5)	10 (8,1)	5,97	0,014
EDNRA (rs5335)	G/G	10 (19,2)	22 (17,7)	0,102	0,775
	C/G	28 (53,8)	71 (57,3)	0,173	0,677
	C/C	14 (26,9)	31 (25,0)	0,123	0,702
ФНО- α (rs1800629)	G/G	41 (78,8)	95 (76,6)	0,104	0,747
	G/A	9 (17,3)	25 (20,2)	0,114	0,661
	A/A	2 (3,8)	4 (3,2)	0,428	0,836
ИЛ-1 β (rs1143634)	C/C	29 (55,8)	61 (49,2)	0,634	0,425
	C/T	18 (34,6)	48 (38,7)	0,262	0,608
	T/T	5 (9,6)	15 (12,1)	0,224	0,636

Примечание. GPX1 - глутатионпероксидаза, SOD2 - супероксиддисмутаза, NOS3 - эндотелиальная NO-синтаза, EDNRA - рецептор эндотелина-1 типа А, ФНО- α - фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β - интерлейкин-1 β .

Таким образом, наличие генотипа Arg/Arg полиморфного локуса Arg72Pro экзон 4 гена p53 было ассоциировано с поражением миокарда при проведении полихимиотерапии (OR=2,972; 95%С.І.=1,523-5,797; p=0,001), тогда как генотип Pro/Pro значимо чаще встречался во второй группе пациенток, что, вероятно, свидетельствует о протективном влиянии (OR=0,360; 95%С.І.=0,141-0,920; p=0,028) данного генотипа на развитие кардиотоксического поражения сердца (табл. 5).

Таблица 5

Прогностическая значимость генотипов в оценке риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности

Ген	Генотип	Odds Ratio	95% CI	p-value
P53 (Arg72Pro экзон 4, rs1042522)	Arg/Arg	2,9720	1,523-5,7971	0,0014
	Arg/Pro	0,5954	0,2992-1,1847	0,1396
	Pro/Pro	0,3597	0,1406-0,9202	0,0329
Каспаза 8 (rs3834129)	Del/del	0,9833	0,4933-1,9598	0,9618
	Ins/del	0,9143	0,4777-1,7498	0,7867
	Ins/ins	1,1782	0,5267-2,6351	0,6898
Каспаза 8 (rs1045485)	G/G	1,1111	0,5183-2,3818	0,7865
	G/C	0,8163	0,3639-1,8313	0,6225
	C/C	0,7908	0,0804-7,7838	0,8406
GPX1 (rs1050450)	C/C	0,4577	0,2366-0,8856	0,0203
	C/T	1,6835	0,8730-3,2465	0,1200
	T/T	2,5652	0,7868-8,3630	0,1182

Таблица 5 (продолжение)

Ген	Генотип	Odds Ratio	95% CI	p-value
SOD2, rs4880	C/C	0,4820	0,2199-1,0563	0,0683
	C/T	1,0201	0,5335-1,9505	0,9520
	T/T	2,0238	0,9744-4,2034	0,0587
NADPH- оксидаза (rs4673)	C/C	0,6508	0,3137-1,3499	0,2485
	C/T	0,6996	0,3629-1,3487	0,2861
	T/T	2,7529	1,3066-5,8005	0,0077
NOS3 (rs1799983)	G/G	0,5296	0,2749-1,0203	0,0574
	G/T	1,1241	0,5718-2,2099	0,7345
	T/T	3,0585	1,2094-7,7348	0,0182
EDNRA (rs5335)	G/G	1,10	0,4826-2,5341	0,8242
	C/G	0,8709	0,4542-1,6700	0,6773
	C/C	1,1154	0,5372 – 2,3156	0,8176
ФНО- α (rs1800629)	G/G	1,1378	0,5191-2,4939	0,7471
	G/A	0,8288	0,3572-1,9234	0,6620
	A/A	1,2000	0,2129-6,7633	0,8363
ИЛ-1 β (rs1143634)	C/C	1,3022	0,6793-2,4963	0,4264
	C/T	0,8382	0,4264-1,6480	0,6089
	T/T	0,7730	0,2656-2,2501	0,6368

Примечание. GPX1 - глутатионпероксидаза, SOD2 - супероксиддисмутаза, NOS3 - эндотелиальная NO-синтаза, EDNRA - рецептор эндотелина-1 типа А, ФНО- α - фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β - интерлейкин-1 β .

На основании анализа по распределению частот встречаемости генотипов гена *GPX1* установлены различия по сравнению в исследованных группах. Оказалось, что у больных с развившейся кардиотоксичностью по сравнению с группой женщин без проявлений сердечно-сосудистых осложнений ПХТ частота встречаемости генотипа C/C была достоверно ниже ($p=0,019$). В то же время, генотип T/T гена *NADPH-оксидазы* существенно чаще ($p=0,006$) встречался в группе 1 с развитием поражения миокарда после терапии с использованием антрациклинов. (табл. 4).

Таким образом, наличие генотипа T/T полиморфизма rs4673 гена *NADPH-оксидазы* было ассоциировано с поражением миокарда при проведении полихимиотерапии (OR=2,753; 95%CI=1,307-5,801; $p=0,008$), тогда как генотип C/C гена *GPX1* (rs1050450) значимо чаще встречался во второй группе пациенток, что свидетельствовало о протективном влиянии (OR=0,458; 95%CI=0,237-0,887; $p=0,020$) данного генотипа на развитие кардиотоксического поражения сердца (табл. 5).

У больных с развившейся кардиотоксичностью по сравнению с группой женщин без проявлений сердечно-сосудистых осложнений ПХТ частота встречаемости генотипа T/T гена *NOS3* была достоверно выше ($p=0,014$) (табл. 4). Таким образом, наличие генотипа T/T полиморфного локуса Glu298Asp (rs1799983) гена *NOS3* было ассоциировано с поражением

миокарда при проведении полихимиотерапии (OR=3,059; 95%С.І.=1,21-7,37; p=0,018) (табл. 5).

Проведенный анализ не выявил достоверных различий в распределении частот встречаемости генотипов полиморфизмов 308G/A (rs1800629) гена *ФНО-α*, +3953 (rs1143634) гена *ИЛ-1β*, C+70G (rs5335) гена *EDNRA*, rs4880 гена *SOD2*, rs3834129 и rs1045485 гена *каспазы-8* в исследованных группах.

Таким образом, носители генотипа Arg/Arg гена *p53* (rs1042522), генотипа T/T гена *NOS3* rs1799983 и генотипа T/T гена *NADPH-оксидазы* rs4673 представляют особую группу высокого генетического риска развития ХСН, поэтому именно эти пациенты с опухолевым заболеванием, которым планируется терапия антрациклинами, должны составлять, прежде всего, приоритетную группу наблюдения с организацией эффективных целевых профилактических мероприятий, направленных на улучшение качества жизни пациентов и предотвращение у них преждевременной смертности.

Прогностическое и патогенетическое значение биомаркеров при развитии кардиотоксичности антрациклиновой химиотерапии

Концентрация sFas-L после окончания противоопухолевой ПХТ у больных 1-й группы была значимо выше по сравнению с аналогичным показателем во 2-й группе (p=0,001), а также по сравнению с исходным показателем (p=0,001) (табл. 6). Через 12 месяцев после окончания ПХТ уровень sFas-L в 1-й группе женщин с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью сохранялся на высоком уровне, значимо превышая аналогичный показатель до начала ПХТ (p=0,001), а также уровень данного маркера в группе 2 через 12 месяцев после окончания ПХТ (p=0,001). Такая динамика уровня sFas-L являлась показателем высокой активности апоптоза в организме у пациенток 1-й группы, отражая высокий риск необратимой гибели кардиомиоцитов. У пациенток 2-й группы произошло снижение концентрации sFas-L по отношению к исходному показателю и по отношению к уровню после окончания ПХТ, что, вероятно, связано с уменьшением активности апоптоза в связи с отсутствием выраженных стимулирующих воздействий ФНО-α, уровень которого повышается при опухолевых заболеваниях, и, соответственно, концентрация которого оказалась повышенной у больных до начала ПХТ, и поддерживалась на высоком уровне у больных в группе 1 после окончания ПХТ.

Уровень sFas-L более 95,8 пг/мл после окончания курса ПХТ позволил с наибольшей вероятностью (чувствительность – 92,1%, специфичность – 92,2%; AUC=0,951; 95%С.І.=0,910-0,991; p=0,0001) прогнозировать развитие сердечно-сосудистых осложнений у женщин, получавших терапию антрациклинами.

Концентрация NT-proBNP после окончания противоопухолевой ПХТ у больных 1-й группы была значимо выше по сравнению с аналогичным показателем во 2-й группе (p=0,001), а также по сравнению с исходным показателем (p=0,001).

Таблица 6

Динамика уровней биомаркеров в исследованных группах (Me [Q25; Q75])

Показатель	До начала ПХТ			После окончания ПХТ			Через 12 месяцев после окончания ПХТ		
	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U- критери и Манна- Уитни	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U- критери Манна- Уитни	Группа 1 (n=52)	Группа 2 (n=124)	p-value U- критери Манна- Уитни
sFas-L (пг/мл)	72,2 [63,1; 81,95]	70,7 [59,5; 81,1]	0,149	125,3 [111,85; 133,95]	69,8 [59,8; 77,6]	<0,000001	107,75 [99,1; 114,7]	56,85 [48,85; 65,9]	<0,000001
NT-proBNP (пг/мл)	49,65 [41,65; 56,9]	46,95 [40,6; 56,35]	0,604	113 [101,8; 126,15]	53,8 [43,4; 63,0]	<0,000001	295,3 [197,9; 370,4]	57,4 [45,7; 70,3]	<0,000001
ФНО-α (пг/мл)	8,1 [7,05; 10,05]	8,7 [6,95; 9,8]	0,933	8,1 [6,5; 9,5]	7,3 [5,8; 8,4]	0,036	5,1 [4,65; 5,4]	2,5 [2,1; 2,9]	<0,000001
ИЛ-1β (пг/мл)	26,7 [21,35; 34,0]	25,95 [18,15; 34,6]	0,551	22,8 [18,6; 28,35]	20,45 [15,5; 25,9]	0,069	14,55 [12,15; 16,85]	8,0 [6,95; 8,7]	<0,000001
Эндотелин-1 (пг/мл)	0,54 [0,43; 0,72]	0,62 [0,46; 0,8]	0,212	0,79 [0,6; 1,07]	0,64 [0,53; 0,77]	0,00003	0,67 [0,51; 0,85]	0,63 [0,44; 0,78]	0,025

Примечание. ПХТ – полихимиотерапия, sFas-L - растворимый Fas-лиганд, NT-proBNP - предшественник мозгового натрийуретического пептида, ФНО-α - фактор некроза опухоли-α, ИЛ-1β - интерлейкин-1β.

Через 12 месяцев после окончания ПХТ уровень NT-proBNP в 1-группе женщин с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью значительно повысился по отношению к концентрации этого пептида после окончания ПХТ ($p=0,001$). Вариабельность NT-proBNP в группе 2 после окончания ПХТ оказалась значительно менее существенной ($p=0,001$). Такая динамика уровня NT-proBNP у пациенток с РМЖ во 2-й группе являлась доказательством развития бессимптомной дисфункции миокарда, развивавшейся после окончания ПХТ, но неуклонно прогрессировавшей, сопровождаясь дальнейшим повышением концентрации NT-proBNP в крови.

Уровень NT-proBNP более 71,5 пг/мл после окончания курса ПХТ позволил с наибольшей вероятностью (чувствительность – 100%, специфичность – 91,9%; $AUC=0,994$; $95\%C.I.=0,969-1,000$; $p=0,0001$) прогнозировать развитие сердечно-сосудистых осложнений у женщин, получавших терапию антрациклинами.

Концентрация ФНО- α после окончания противоопухолевой ПХТ у больных 1-й группы существенно не отличалась от исходных показателей, но была значимо выше таковых по сравнению со 2-й группой ($p=0,036$). Также у женщин 2-группы концентрация данного цитокина существенно снижалась по сравнению с исходным уровнем ($p=0,001$).

Концентрации ИЛ-1 β после окончания противоопухолевой ПХТ в исследованных группах существенно снизились по сравнению с показателями, зафиксированными до начала лечения антрациклинами. При этом полученные значения ИЛ-1 β в группах 1 и 2 значимо не отличались.

Через 12 месяцев произошло существенное снижение концентрации ФНО- α и ИЛ-1 β в исследованных группах по отношению к уровню после завершения ПХТ. Однако, в 1-й группе женщин с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью уровни цитокинов существенно превышали таковые во 2-группе с сохраненной функцией сердца ($p=0,001$).

Повышенная концентрация ФНО- α и ИЛ-1 β до начала ПХТ была обусловлена, вероятнее всего, высокой активностью опухолевого процесса, при котором активизировались провоспалительные цитокины. В 1-й группе более высокий уровень цитокинов ассоциировался с развитием бессимптомной дисфункции миокарда после окончания ПХТ, которая неуклонно прогрессировала в дальнейшем после прекращения химиотерапии антрациклинов.

Концентрация эндотелина-1 в крови в группе 2 в динамике проспективного наблюдения существенно не изменялась. Тогда как в группе 1 после окончания противоопухолевой ПХТ и через 12 месяцев уровень этого биомаркера был существенно выше по сравнению с группой 2. При этом после завершения курса ПХТ в 1-й группе женщин с развившейся в последствии антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью концентрация эндотелина-1 существенно превышала исходный уровень ($p=0,0002$). Через 12 месяцев отмечалось значимое ($p=0,008$) снижение уровня эндотелина-1, но данный показатель существенно ($p=0,009$) превышал таковой до начала ПХТ лечения.

Такая динамика уровня эндотелина-1 у пациенток 1-й группы является показателем дисфункции эндотелия с преобладанием вазоконстрикторных влияний, способствующей апоптозу кардиомиоцитов.

Чувствительность и специфичность прогностической значимости концентраций эндотелина-1 (при уровне более 0,68 пг/мл: чувствительность – 38,5%, специфичность – 100%; AUC=0,699; 95%С.І.=0,626-0,766; p=0,0001), ФНО-α (при уровне более 7,5 пг/мл: чувствительность – 44,2%, специфичность – 75,8%; AUC=0,600; 95%С.І.=0,524-0,673; p=0,035) и ИЛ-1β (при уровне более 21,3 пг/мл: чувствительность – 76,9%, специфичность – 42,7%; AUC=0,587; 95%С.І.=0,511-0,661; p=0,067) после окончания ПХТ значительно уступали таковым в отношении NT-proBNP и sFas-L.

Таким образом, из исследованных нами биомаркеров (sFas-L, NT-proBNP, ФНО-α, ИЛ-1β и эндотелина-1) наибольшей прогностической значимостью в отношении оценки риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности по данным ROC-анализа обладают плазменные уровни sFas-L и NT-proBNP.

Для разработки наиболее информативной модели прогнозирования развития антрациклиновой кардиомиопатии в нашем исследовании использовался модуль «Нелинейное оценивание» (Nonlinear Estimation) с функцией Quick logit regression пакета статистических программ STATISTICA. В результате применения данного метода моделирования была получена логистическая модель оценки вероятности развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности через 12 месяцев после окончания ПХТ.

Процедура моделирования включала первоначально выбор наиболее значимого предиктора из всех исследованных - им оказался уровень NT-proBNP (2), пг/л ($\chi^2=179,689$; p=0,0012). Затем методом пошагового включения (forward stepwise) был выбран второй предиктор – наличие генотипа Arg/Arg гена p53 (Arg72Pro экзон 4, rs1042522). Модель (mod-1), включающая в себя эти две переменные, обладала более высокой статистической значимостью по сравнению с монопараметрической ($\chi^2=187,414$; p<0,0001). Перебор остальных независимых переменных не позволил включить другие переменные.

Для того чтобы получить индивидуальные значения полученного интегрального показателя вероятности развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности вначале необходимо рассчитать значение Y по формуле:

$$Y = -20,19 + 0,22 * \text{NT-proBNP (пмоль/л)} + 3,16 * \text{наличие Arg/Arg}$$

Затем применяется формула:

$$P = \frac{e^Y}{1 + e^Y}, \text{ где}$$

P - расчетная вероятность наступления неблагоприятного сердечно-сосудистого события;

e – число Эйлера = 2,718281828459045.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток с раком молочной железы через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии, включающей антрациклины, в 29,5% случаев диагностируется кардиотоксичность химиотерапии, характеризующаяся снижением фракции выброса левого желудочка, повышением конечного систолического и конечного диастолического размеров левого желудочка более 10% от исходной, а также развитием признаков ХСН.
2. К развитию антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы предрасполагает носительство генотипов Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522) (OR=2,972; $p=0,001$), T/T гена *NADPH-оксидазы* (rs4673) (OR=2,753; $p=0,008$) и T/T гена *NOS3* (rs1799983) (OR=3,059; $p=0,018$). Полиморфизмы генов белка *p53* (rs1042522) (генотип Pro/Pro - OR=0,360; $p=0,028$) и *GPX1* (rs1050450) (генотип C/C - OR=0,458; $p=0,020$) оказывают протективный эффект на сердце при полихимиотерапии с использованием антрациклинов у женщин с раком молочной железы.
3. Повышение содержания растворимого Fas-лиганда в крови у больных с раком молочной железы через 12 месяцев после окончания полихимиотерапии и носительство генотипа Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522) свидетельствуют об активации апоптоза при токсическом поражении миокарда на фоне терапии антрациклинами.
4. У больных с раком молочной железы и развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью через 12 месяцев после окончания полихимиотерапии выявляется повышенный уровень ФНО- α и ИЛ-1 β , что свидетельствует о патогенетической роли провоспалительных цитокинов в развитии поражения сердца при терапии антрациклинами.
5. Кардиоваскулярные повреждения, возникающие при химиотерапии антрациклинами рака молочной железы, сопровождаются дисфункцией эндотелия через 12 месяцев после окончания полихимиотерапии, что подтверждается нарушением эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации, а также повышенным уровнем эндотелина-1 в плазме крови.
6. Определение уровня предшественника мозгового натрийуретического пептида более 71,5 пг/мл (чувствительность – 100%, специфичность – 91,9%; AUC=0,994; $p=0,0001$) и уровня растворимого Fas-лиганда более 95,8 пг/мл (чувствительность – 92,1%, специфичность – 92,2%; AUC=0,951; $p=0,0001$) после завершения полихимиотерапии с антрациклинами позволяет прогнозировать развитие антрациклин-индуцированной кардиотоксичности через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии у женщин с раком молочной железы.
7. Наиболее информативной моделью прогноза развития кардиотоксического поражения миокарда через 12 месяцев после завершения полихимиотерапии у женщин с раком молочной железы является модель на основе многофакторной оценки, включающей уровень NT-proBNP в крови и носительство генотипа Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. До начала полихимиотерапии рака молочной железы пациенткам рекомендуется проводить определение полиморфизмов генов *p53* (rs1042522), *NADPH-оксидазы* (rs4673), а также *NOS3* (rs1799983), и при подтверждении носительства даже одного из них считать риск развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности повышенным.
2. Для прогноза развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы рекомендуется после завершения полихимиотерапии определять содержание NT-proBNP и sFas-лиганда в плазме крови.
3. Для оптимизации персонифицированной ранней диагностики сердечной недостаточности на фоне антрациклин-индуцированной кардиотоксичности целесообразно шире использовать модель многофакторной оценки, включающей уровень NT-proBNP и наличие генотипа Arg/Arg гена белка *p53* (rs1042522).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Неупокоева М.Н. Состояние сердечно-сосудистой системы у больных с антрациклиновой кардиомиопатией / Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Молоков А.В., Копьева К.В., Калюжин В.В. // Бюллетень сибирской медицины. - 2017. - Том 16. - №3. - С. 127-136.
2. Неупокоева М.Н. Роль полиморфных вариантов генов NO-синтазы, рецептора эндотелина-1 и NADPH-оксидазы при развитии сердечной недостаточности, индуцированной кардиотоксичностью химиотерапии / Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н., Валеева А.М., Тулеутаев Ш.М., Копьева К.В. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. - 2018. - Т. 7. - №3. - С. 33-43.
3. Неупокоева М.Н. Прогностическое значение биомаркеров предшественника мозгового натрийуретического пептида и растворимого Fas-лиганда в оценке риска кардиотоксичности антрациклиновой химиотерапии / Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Гракова Е.В., Копьева К.В. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2019. - Т. 18. - №1. - С. 127-133.
4. Неупокоева М.Н. Прогностическое значение полиморфизма гена белка *p53* в оценке риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности / Шилов С.Н., Тепляков А.Т., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Гракова Е.В., Валеева А.М., Тулеутаев Ш.М. // Кардиология. - 2019. - Т. 59 - № 7S. - С. 14-20.
5. Патент на изобретение 2680139 Российская Федерация, МПК G01N 33/50. Способ прогнозирования развития кардиотоксичности у женщин с раком молочной железы на фоне химиотерапии препаратами антрациклинового ряда / Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Шилов С.Н.,

Березикова Е.Н., Попова А.А., Неупокоева М.Н. – Заявитель патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». - № 2018114228; заявл. 17.04.2018; опубл. 18.02.2019, Бюл. № 5. – 12 с.

Материалы конференций

1. Неупокоева М.Н. Состояние сердечно-сосудистой системы у больных раком молочной железы, получавших антрациклиновые антибиотики / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н., Молоков А.В., Яковлева И.В. // Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. - Екатеринбург. - 2016. - С. 492.
2. Неупокоева М.Н. Сердечно-сосудистые осложнения у больных раком молочной железы, получавших терапию антрациклиновыми антибиотиками / Шилов С.Н., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Неупокоева М.Н. // Тезисы докладов конгресса "Сердечная недостаточность-2016". - Москва. - 2016. - С. 14.
3. Неупокоева М.Н. Сердечно-сосудистые осложнения у больных раком молочной железы, получавших терапию антрациклинами / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н., Молоков А.В., Яковлева И.В. // Тезисы докладов VII Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук». - Нижний Новгород. - 2016. - С. 253.
4. Неупокоева М.Н. Оценка риска сердечно-сосудистых осложнений у онкологических больных, получавших терапию антрациклинами / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н. // Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. - Санкт-Петербург. - 2017. - С. 796.
5. Неупокоева М.Н. Оценка риска кардиотоксичности у онкологических больных, получавших антрациклины / Шилов С.Н., Тепляков А.Т., Неупокоева М.Н., Попова А.А. // Тезисы докладов конгресса "Сердечная недостаточность-2017". - Москва. - 2017. - С. 64-65.
6. Неупокоева М.Н. Кардиотоксичность антрациклинов: диагностика и патогенез / Попова А.А., Шилов С.Н., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Молоков А.В., Яковлева И.В., Неупокоева М.Н. // Тезисы докладов VIII Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук». - Тюмень. - 2017. - С. 319-321.
7. Неупокоева М.Н. Прогностическое значение биомаркеров в оценке риска кардиотоксичности антрациклиновой химиотерапии / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н. // Тезисы докладов IX Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук». - Тюмень. - 2018. - С. 208-210.
8. Неупокоева М.Н. Значение биомаркеров в оценке риска кардиотоксичности антрациклинов при полихимиотерапии / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н.

// Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. - Москва. - 2018. - С. 882.

9. Неупокоева М.Н. Роль полиморфизма гена белка р53 при развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н. // Тезисы докладов конгресса "Сердечная недостаточность-2018". - Москва. - 2018. - С. 17.

10. Неупокоева М.Н. Роль полиморфизмов генов NO-синтазы, рецептора эндотелина-1 и NADPH-оксидазы при развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности / Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Валеева А.М., Тулеутаев Ш.М., Румынская В.С., Уженцева М.С. // Материалы X юбилейного терапевтического форума "Актуальные вопросы диагностики и лечения наиболее распространенных заболеваний внутренних органов". - Тюмень. - 2018. - С. 108-109.

11. Неупокоева М.Н. Прогностическое значение полиморфизмов генов белков апоптоза р53 и каспазы 8 при развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности / Шилов С.Н., Тепляков А.Т., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Гракова Е.В., Валеева А.М., Тулеутаев Ш.М. Шилов С.Н., Тепляков А.Т., Попова А.А., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Гракова Е.В., Валеева А.М., Тулеутаев Ш.М. // Тезисы докладов X Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук». - Тюмень. - 2019. - С. 209-211.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка
ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β
КДР – конечный диастолический размер
КСР – конечный систолический размер
ЛЖ – левый желудочек
Me – медиана
МЖП – межжелудочковая перегородка
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПА – плечевая артерия
ПХТ – полихимиотерапия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМЖ – рак молочной железы
СН – сердечная недостаточность
ТШХ – тест 6-минутной ходьбы
ФВ – фракция выброса
ФК – функциональный класс
ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
ХСН – хроническая сердечная недостаточность
ШОКС – шкала оценки клинического состояния
ЭЗД – эндотелийзависимая дилатация
ЭКГ – электрокардиограмма
ЭНЗД – эндотелийнезависимая дилатация
Эхо-КГ – эхокардиография
EDNRA – рецептор эндотелина-1 типа А
eNOS – эндотелиальная синтаза окиси азота
GPX – глутатионпероксидаза
NT-proBNP – предшественник мозгового натрийуретического пептида
NYHA – Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация
OR – отношение шансов
sFas-L – растворимый Fas-лиганд
SOD – супероксиддисмутаза

Научное издание

Неупокоева Мария Николаевна

**АНТРАЦИКЛИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ КАРДИОТОКСИЧНОСТЬ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И
ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ
ДИАГНОСТИКИ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать _____.

Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. _____. Уч.-изд. л. _____.

Тираж 100 экз. Заказ № _____.

Название типографии

Контакты типографии:

Адрес

Телефон

Эл. почта

Сайт (при наличии)