

Аллельный вариант 6A (rs35068180) промоторной области гена *MMP-3* как предиктор развития кардиотоксичности после окончания адъювантной химиотерапии доксорубицином у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы

Карпуть И.А.¹, Снежицкий В.А.¹, Курбат М.Н.¹, Горустович О.А.¹, Бабенко А.С.²

Цель. Оценить взаимосвязь полиморфных вариантов rs2232228 гена *HAS3*, rs8187710 гена *ABCC2*, rs35068180 гена *MMP-3* с развитием кардиотоксического эффекта после окончания адъювантной химиотерапии (ХТ) у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы.

Материал и методы. В исследование включено 100 пациентов (женщины, средний возраст 52,5±9,4 года) с диагнозом рак молочной железы, получавших терапию с применением антибиотиков антрациклинового ряда (доксорубин, суммарная доза 240 мг/м² или 360 мг/м²). Эхокардиографию выполняли до начала и после окончания ХТ. Определение полиморфного статуса выбранных мишеней проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. После окончания ХТ на основании динамики показателей фракции выброса левого желудочка и глобальной продольной деформации миокарда кардиотоксичность (КТ) выявили у 20 пациентов. Статистически значимые различия между подгруппами: rs8187710 гена *ABCC2* — не выявлены; rs2232228 гена *HAS3* — генотип AA, отношение шансов (ОШ) 3,37 (95% доверительный интервал (ДИ): 1,14–9,97) и аллельный вариант A, ОШ 2,17 (95% ДИ: 0,98–4,80) статистически значимо чаще ($p < 0,05$) встречаются в подгруппе КТ+; rs35068180 гена *MMP-3* — генотип 6A/6A, ОШ 2,53 (95% ДИ: 0,93–6,88) и аллельный вариант 6A, ОШ 2,19 (95% ДИ: 1,08–4,44) статистически значимо чаще ($p < 0,05$) встречаются в подгруппе КТ+.

Заключение. Генотип 6A/6A, аллельный вариант 6A rs35068180 гена *MMP-3*, генотип AA и аллельный вариант A rs2232228 гена *HAS3* могут рассматриваться как предикторы развития ранней КТ на этапе после окончания ХТ у пациентов с диагнозом рак молочной железы, получающих лечение доксорубицином.

Ключевые слова: рак молочной железы, кардиотоксичность, антрациклины, доксорубин, металлопротеиназы, rs35068180 гена *MMP-3*, rs2232228 гена *HAS3*, rs8187710 гена *ABCC2*, ЭхоКГ.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках задания программы — 3.57 Государственной программы научных исследований "Трансляционная медицина", подпрограммы 4.3 "Инновационные технологии клинической медицины" 2023–2025гг (взятие образцов биологического материала, выделение общей фракции ДНК, молекулярно-генетический анализ статуса полиморфного варианта гена *MMP-3*).

¹УО Гродненский государственный медицинский университет, Гродно;

²УО Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь.

Карпуть И.А.* — аспирант (1-ая кафедра внутренних болезней), ORCID: 0000-0003-0478-9419, Снежицкий В.А. — д.м.н., профессор (1-ая кафедра внутренних болезней), ORCID: 0000-0002-1706-1243, Курбат М.Н. — к.м.н., доцент, зав. научно-исследовательской лабораторией, ORCID: 0000-0002-8518-2450, Горустович О.А. — к.м.н., старший преподаватель, кафедра нормальной анатомии, ORCID: 0009-0007-3089-8543, Бабенко А.С. — к.х.н., доцент, кафедра биорганической химии, ORCID: 0000-0002-5513-970X.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): karputirina@gmail.com

ДИ — доверительный интервал, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, КМО — критерий Кайзера-Мейера-Олкина, КТ — кардиотоксичность, MMP — металлопротеиназы, мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота, ЛЖ — левый желудочек, ОШ — отношение шансов, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, РМЖ — рак молочной железы, ФВ — фракция выброса, ХТ — адъювантная химиотерапия, ЭхоКГ — эхокардиография, GLS — продольная деформация миокарда (global longitudinal strain).

Рукопись получена 09.08.2023

Рецензия получена 04.10.2023

Принята к публикации 15.10.2023



Для цитирования: Карпуть И.А., Снежицкий В.А., Курбат М.Н., Горустович О.А., Бабенко А.С. Аллельный вариант 6A (rs35068180) промоторной области гена *MMP-3* как предиктор развития кардиотоксичности после окончания адъювантной химиотерапии доксорубицином у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(1):5579. doi:10.15829/1560-4071-2024-5579. EDN VCZFCO

Allelic variant 6A (rs35068180) of the *MMP-3* promoter region as a predictor of cardiotoxicity after the end of adjuvant chemotherapy with doxorubicin in patients with breast cancer

Karput I. A.¹, Snezhitsky V. A.¹, Kurbat M. N.¹, Gorustovich O. A.¹, Babenko A. S.²

Aim. To evaluate the relationship of polymorphic variants rs2232228 of the *HAS3* gene, rs8187710 of the *ABCC2* gene, rs35068180 of the *MMP-3* gene with cardiotoxicity after the end of adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer.

Material and methods. The study included 100 patients (women, mean age 52,5±9,4 years) diagnosed with breast cancer who received anthracycline antibiotics (doxorubicin, total dose 240 mg/m² or 360 mg/m²). Echocardiography was performed before and after the end of chemotherapy. Polymorphic status of selected targets was determined using the real-time polymerase chain reaction.

Results. After the end of chemotherapy, based on the changes of left ventricular ejection fraction and global longitudinal strain, cardiotoxicity (CT) was detected in 20 patients. There were following significant differences between subgroups: rs8187710 of the *ABCC2* gene — not identified; rs2232228 of the *HAS3* gene — genotype AA, odds ratio (OR) 3,37 (95% confidence interval (CI) 1,14; 9,97) and

allelic variant A, OR 2,17 (95% CI 0,98; 4,80) are significantly more common ($p < 0,05$) in the cardiotoxicity+ subgroup; rs35068180 of the *MMP-3* gene — genotype 6A/6A, OR 2,53 (95% CI 0,93; 6,88) and allelic variant 6A, OR 2,19 (95% CI 1,08; 4,44) are significantly more often ($p < 0,05$) in the cardiotoxicity+ subgroup.

Conclusion. Genotype 6A/6A, allelic variant 6A rs35068180 of the *MMP-3* gene, genotype AA and allelic variant A rs2232228 of the *HAS3* gene can be considered as predictors of early cardiotoxicity after the end of chemotherapy in patients with breast cancer receiving doxorubicin.

Keywords: breast cancer, cardiotoxicity, anthracyclines, doxorubicin, metalloproteinases, rs35068180 of the *MMP-3* gene, rs2232228 of the *HAS3* gene, rs8187710 of the *ABCC2* gene, echocardiography.

Relationships and Activities. The study was carried out within the State Research Program "Translational Medicine", subprogram 4.3 "Innovative technologies of clinical medicine" 2023-2025 (taking samples of biological material, isolating the total DNA fraction, molecular genetic analysis of *MMP-3* gene polymorphic status).

¹Grodno State Medical University, Grodno; ²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus.

Karput I.A.* ORCID: 0000-0003-0478-9419, Snezhitsky V.A. ORCID: 0000-0002-1706-1243, Kurbat M.N. ORCID: 0000-0002-8518-2450, Gorustovich O.A. ORCID: 0009-0007-3089-8543, Babenko A.S. ORCID: 0000-0002-5513-970X.

*Corresponding author: karputirina@gmail.com

Received: 09.08.2023 **Revision Received:** 04.10.2023 **Accepted:** 15.10.2023

For citation: Karput I.A., Snezhitsky V.A., Kurbat M.N., Gorustovich O.A., Babenko A.S. Allelic variant 6A (rs35068180) of the *MMP-3* promoter region as a predictor of cardiotoxicity after the end of adjuvant chemotherapy with doxorubicin in patients with breast cancer. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(1):5579. doi:10.15829/1560-4071-2024-5579. EDN VCZFCO

Ключевые моменты

- На этапе после окончания адъювантной химиотерапии у пациентов с диагнозом рак молочной железы, получающих лечение доксорубицином, генотип 6A/6A, аллельный вариант 6A rs35068180 гена *MMP-3*, генотип AA и аллельный вариант A rs2232228 гена *HAS3* могут рассматриваться как предикторы развития ранней кардиотоксичности.

На протяжении последних 60 лет доксорубицин и другие препараты антрациклинового ряда используются для лечения злокачественных новообразований различных локализаций. По данным ретроспективных исследований, именно благодаря применению антрациклинов общая пятилетняя выживаемость в ряде случаев достигает 80% [1]. Основываясь на этих результатах, FDA (Food and drug administration, США) одобрило антрациклины как одни из наиболее эффективных и часто применяемых противоопухолевых препаратов. Также они были включены Всемирной организацией здравоохранения в список основных лекарственных средств [2]. К сожалению, использование доксорубицина сопровождается развитием кардиотоксического эффекта. Это связано с реализацией механизма действия веществ и является неотъемлемой частью их природы [3]. В связи с этим поиск и внедрение в рутинную клиническую практику новых предикторов развития кардиотоксичности (КТ) является одной из самых актуальных задач современных медико-биологических исследований в области онкологии [4].

В настоящее время много внимания уделяется молекулярно-генетическим механизмам инициации и развития патологических процессов в организме человека. Несмотря на то, что накопленных данных все еще недостаточно для полного понимания природы КТ, получено немало свидетельств, подтверждающих важность использования ряда индивидуальных генетических и эпигенетических параметров для прогнозирования этого эффекта на фоне химиотерапии [5].

Key messages

- After the end of chemotherapy in patients with breast cancer receiving doxorubicin, genotype 6A/6A, allelic variant 6A rs35068180 of the *MMP-3* gene, genotype AA and allelic variant A rs2232228 of the *HAS3* gene can be considered as predictors of early cardiotoxicity.

Установлено, что порядка 70 полиморфных вариантов генов связаны с инициацией и развитием антрациклин-опосредованной КТ. Причем около половины из них (45%) расположены в генах, ответственных за транспорт доксорубицина внутрь (семейство SLC) или наружу (семейство ABC) клеточной мембраны, 27% связаны с эскалацией/ингибированием окислительного стресса и свободно-радикальных процессов, 19% с метаболизмом антрациклинов и всего 9% отвечают за репарацию повреждений, наносимых препаратами в клеточном ядре [6]. Важно отметить, что при низких концентрациях препарата в крови роль белков-переносчиков минимальна и проникновение осуществляется преимущественно путем пассивной диффузии, однако в зависимости от индивидуальных особенностей (полиморфного статуса генома) скорость поступления доксорубицина в клетку может изменяться в широких пределах. Особую важность переносчики приобретают при использовании высоких суммарных доз. Например, аллельный вариант A полиморфизма rs8187710 гена *ABCC2* связывают со снижением скорости выведения доксорубицина из клетки, что повышает риск развития КТ [7, 8].

Несмотря на разнообразие проявлений токсического эффекта доксорубицина, главную роль большинство исследователей отводят свободно-радикальным процессам иницируемым активными формами препарата, например, образующимися при взаимодействии с оксидоредуктазами (ферменты NADH-дегидрогеназы), кодируемые генами *NOX2* и *NOX4*. Образующиеся свободные радикалы повреждают все мембранные структуры клетки, белки цитоплазмы, нарушают работу дыхательной цепи

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	Единицы измерения	%
Половая структура		
— женщины	100	100%
— мужчины	0	—
Возрастная структура		
— средний, лет	52,5 (±9,4)	—
— старше 65 лет (фактор риска), n	11	11%
Курение, n	15	15%
Ожирение (ИМТ ≥30 кг/м ²), n	35	35%
Артериальная гипертензия		
— диагностировано наличие, n	33	33%
— диагностировано отсутствие, n	77	77%
Перенесенные сердечно-сосудистые заболевания, n	0	—
Сахарный диабет 1 и 2 типа, n	0	—
Хроническая болезнь почек, n	0	—
Исходный уровень ФВ ЛЖ <50%, n	0	—
Пограничный уровень ФВ ЛЖ =50-54%, n	1	1%
Предыдущее лечение злокачественных новообразований с применением кардиотоксичных препаратов и/или неoadъювантная лучевая терапия опухолей левой молочной железы, средостения, n	0	—
Суммарная доза доксорубина (количество курсов химиотерапии)		
— 240 мг/м ² (4 курса), n	82	82%
— 360 мг/м ² (6 курсов), n	18	18%

Сокращения: ИМТ — индекс массы тела, ФВ ЛЖ — фракция выброса левого желудочка.

митохондрий, а также после разрушения клеточной мембраны взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса, затрудняя регенерацию миокарда [9]. Прогрессирование токсического эффекта радикальных форм доксорубина напрямую зависит и от активности антиоксидантных систем. В частности, показано, что генотип AA rs2232228 гена *HAS3* статистически значимо повышает риск развития КТ у пациентов, получающих доксорубин. Белок гиалуронан-синтаза в норме обеспечивает синтез гетерополисахарида гиалуронана, который является компонентом внеклеточного матрикса и высвобождается в межклеточное пространство. Наряду с этим гиалуронан обладает антиоксидантными свойствами и принимает непосредственное участие в прерывании свободно-радикальных процессов, связанных с активацией доксорубина [10, 11].

Особое внимание в последние годы уделяется изучению взаимосвязи полиморфизма генов семейства матриксных металлопротеиназ (*MMP*) с риском развития КТ, поскольку эти белки тесно связаны с эффективностью регенерации и ремоделирования миокарда в ответ на токсическое действие антрациклинов. Среди представителей семейства *MMP* в этой области принято выделять гены *MMP-2*, *MMP-9* и *MMP-3*. При этом особого внимания заслуживает полиморфизм гена *MMP-3* (rs35068180), расположенный в его промоторной области и представляющий вариацию числа последовательно расположенных дезоксирибонуклеотидов "А". Исследователей привлек

факт того, что аллельный вариант 5А (AAAAA) связан с более высокой активностью промотора, чем 6А. Это сказывается на уровне матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) и белка *MMP-3* в клетках. Собственно, белок *MMP-3* отвечает за активацию иных белков семейства: *MMP-1*, *MMP-2* и *MMP-9*, что играет важную роль в регуляции процессов перестройки внеклеточного матрикса и обеспечении функционирования органов и тканей [12].

Установлено, что наличие аллельного варианта 5А связано с коронарными событиями, внутрисерпной аневризмой и аневризмой брюшного отдела аорты, окклюзионными заболеваниями периферических артерий. Во всех указанных случаях скорость деградации внеклеточного матрикса повышена. Наряду с этим аллельный вариант 6А статистически значимо более часто встречается при утолщении интима-медиа сонных артерий, прогрессировании ишемической болезни сердца, рестенозе после баллонной ангиопластики, развитии атеросклероза и пр. В этом случае отмечают накопление соединительной ткани и рассматривают процесс как профибротический [13].

На основании имеющихся научных данных в рамках настоящего исследования мы предположили, что: наличие аллельного варианта 6А (rs35068180 гена *MMP-3*) и опосредованное этим накопление белков внеклеточного матрикса может быть сопряжено с кардиотоксическим эффектом на фоне повреждения миокарда доксорубином; данный

Таблица 2

**Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, для генотипирования
rs35068180 (5A/6A) гена *MMP-3*, rs2232228 гена *HAS3*, rs8187710 гена *ABCC2***

Код	Последовательность	Мод.5'	Мод.3'
Rs8180_F	ACTAGTATTCTATGGTTCTCCATTCCTTTGA	—	—
Rs8180_R	TCAATGTGGCCAAATATTTTCCCTGTA	—	—
Rs8180_5A	A[LNA+C][LNA+A][LNA+T][LNA+G][LNA+G]TTTTTCCCC	FAM	BHQ1
Rs8180_6A	A[LNA+C][LNA+A][LNA+T][LNA+G][LNA+G]TTTTTCCCC	HEX	BHQ1
Rs2228_F	TCGGTGGCACTGTGCAT	—	—
Rs2228_R	TGAGGTCAGGAAGGAGATG	—	—
Rs2228_a	TGCCGCaTACCAGGAGGACC	FAM	BHQ1
Rs2228_g	TGCCGCgTACCAGGAGGAC	HEX	BHQ1
Rs7710_F	TTCCTTGTTCAGGGTAATGG	—	—
Rs7710_R	AGGGTCCAGGGATTTGTAGC	—	—
Rs7710_g	GAAGATTATAGAGTgCGGCAGCC	FAM	BHQ1
Rs7710_a	gGAAGATTATAGAGTaCGGCAGCC	HEX	BHQ1

Сокращения: Rs — уникальный номер полиморфного варианта генома человека, FAM — карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель (500/520 нм), HEX — гексахлорофлуоресцеин, флуоресцентный краситель (540/560 нм), Мод.5' — модификация у атома углерода C5 углеводной части нуклеотида, Мод.3' — модификация у атома углерода C3 углеводной части нуклеотида, BHQ1 — Black Hole Quencher 1, коммерческое название гасителя флуоресценции 2-[N-(2-гидроксипропил)-4-[[2-метокси-5-метил-4-[(4-метил-2-нитрофенил)дiazенил]фенил]дiazенил]анилино]этанол, LNA — замкнутая нуклеиновая кислота.

полиморфизм обладает высоким потенциалом в качестве молекулярно-генетического предиктора развития КТ. Наряду с этим интерес может представлять оценка полиморфного статуса rs2232228 гена *HAS3* и rs8187710 гена *ABCC2*, поскольку установлена их роль в процессах развития КТ, но исследования посвящены преимущественно осложнениям КТ спустя ≥ 12 мес. после окончания адъювантной химиотерапии (ХТ).

Цель: оценить взаимосвязь полиморфных вариантов rs2232228 гена *HAS3*, rs8187710 гена *ABCC2*, rs35068180 гена *MMP-3* с развитием кардиотоксического эффекта после окончания ХТ у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы.

Материал и методы

В исследование включено 100 пациентов, проходивших лечение на базе учреждения здравоохранения "Гродненская университетская клиника" (Гродно, Беларусь). Исследование одобрено комитетом по этике Учреждения здравоохранения "Гродненская университетская клиника", протокол № 26 от 09.10.2020г. Данные о пациентах представлены в таблице 1.

Критерии включения разработаны в соответствии с клиническими протоколами диагностики и лечения заболеваний системы кровообращения, утвержденных приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь (МЗ РБ) № 59 от 06.06.2017; клинического протокола "Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований" (приказ № 60 от 06.07.2018, МЗ РБ). В исследование включены пациенты с впервые диагностированным раком

молочной железы (РМЖ) старше 18 лет, которые получали ХТ антрациклинами и дали информированное согласие. Критерии исключения: неспособность дать информированное согласие; терапия препаратами не антрациклинового ряда; структурные изменения миокарда; острые реакции на ХТ. Критерии включения: первичный верифицированный резектабельный РМЖ I-III стадии (T0-4N0-3M0); подтипы люминальный А, люминальный В, HER2-отрицательный; тройной негативный рак. В соответствии со стандартами лечения пациентов с РМЖ антрациклины назначают только в виде комбинированной терапии, и только эта комбинация с циклофосфамидом (схема АС) была выбрана для ограничения действия других кардиотоксических химиотерапевтических агентов. Поэтому в настоящем исследовании оценивали КТ у пациентов, получавших антрациклин и циклофосфамид по схеме 4 и 6 курсов (АСx4 и АСx6): антрациклин в дозе 60 мг/м² и циклофосфамид в дозе 600 мг/м². Часть пациентов после окончания ХТ по схеме АСx4, получали вторую часть адъювантной программы ХТ, включая таксаны.

Ультразвуковое исследование проводили на аппарате GE Vivid E95 с измерением фракции выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) по методу Симпсона и оценку динамики глобальной продольной деформации миокарда (global longitudinal strain, GLS) ЛЖ методом speckle tracking эхокардиографии (ЭхоКГ). КТ оценивали в течение 7-21 дня после окончания всех курсов ХТ. Диапазон обусловлен логистическими ограничениями в силу проведения лечения амбулаторно. Наличие кардиотоксического эффекта оценивали на основании рекомендаций Европейского общества кардиологов 2021г по диагностике и ле-

Таблица 3

Динамика показателей GLS и ФВ ЛЖ у пациентов в общей группе, подгруппах КТ+ и КТ-

Показатель	До ХТ, медиана	После ХТ, медиана	р	КТ+		р	КТ-		р
	До ХТ, медиана	После ХТ, медиана		До ХТ, медиана	После ХТ, медиана		До ХТ, медиана	После ХТ, медиана	
GLS, %	20,4 (18,6;21,7)	19,3 (17,7;21,5)	<0,001	20,2 (18,1;20,9)	15,8 (15;17,6)	<0,001	20,35 (18,8;22,0)	20,3 (18,8;21,8)	0,060
ФВ ЛЖ, %	68 (65;71)	65 (62;70)	0,005	68 (62,5;72)	66 (61,7;69)	0,306	68 (65;71)	65 (62;70)	0,004

Сокращения: КТ+ — подгруппа с кардиотоксичностью, КТ- — подгруппа без кардиотоксичности, ФВ ЛЖ — фракция выброса левого желудочка, ХТ — адьювантная химиотерапия, GLS — глобальная продольная деформация миокарда левого желудочка (global longitudinal strain), р — уровень значимости (р<0,05).

чению хронической сердечной недостаточности; опубликованного консолидированного экспертного мнения специалистов Американского общества по эхокардиографии и Европейской ассоциации по кардиоваскулярной визуализации, посвященного диагностике антрациклиновой КТ 2022г, в которых определены критерии кардиотоксического действия, принятые как снижение ФВ ЛЖ более 10% от исходного значения и менее нижней границы нормы (<50%), снижение GLS >15% относительно исходных значений. Также на основании рекомендаций Европейского общества онкологов (снижение ФВ ЛЖ >10% от исходного значения и менее нижней границы нормы (<50%), снижение GLS >12% относительно исходных значений). В соответствии с этим пациенты разделены на подгруппы с КТ (КТ+) и без КТ (КТ-).

Взятие образцов крови пациентов осуществлялось в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (этилендиаминтетрауксусная кислота). Выделение общей фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) проводили согласно инструкции производителя набора реагентов "ДНК-Экстрани-1" (Закрытое акционерное общество "Синтол", Российская Федерация). Каждый образец ДНК генотипировали методом аллельной дискриминации однонуклеотидных замен с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Дизайн олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, а также все манипуляции с нуклеотидными последовательностями проводили с использованием Ugene v.47.0 (Unipro, Российская Федерация) и встроенного алгоритма Primer3. Последовательности олигонуклеотидов представлены в таблице 2.

Генотипирование проводили с использованием реагентов производства Общества с дополнительной ответственностью "Праймтех", Беларусь, с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке), включающей все компоненты для проведения ПЦР-РВ, а также ДНК-матрицу — 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 ммоль/л; концентрация дНТФ (дезонуклеотидтрифосфат) в реакционной смеси 0,2 ммоль/л каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество

термостабильной Таq ДНК-полимеразы 1,25 единицы активности (ед.); количество ДНК-матрицы 50-500 нг/реакцию; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ 10 пмоль/реакцию (концентрация 400 нмоль/л). Режим термоциклирования: первичная денатурация +95° С — 2 мин; циклирование (50 циклов): денатурация +95° С — 5 сек, отжиг 58° С 10 сек, элонгация +72° С — 20 сек. Детекция по каналам FAM (карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель (500/520 нм)) и HEX (гексахлорофлуоресцеин, флуоресцентный краситель (540/560 нм)) в конце каждого цикла.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы SPSS Statistics 27 (IBM, США). Полученные данные интерпретировали как достоверные, различия между показателями считались значимыми при величине безошибочного прогноза, равной или больше 95% (р<0,05) [14]. Различия между исследуемыми показателями оценивали с помощью критерия углового преобразования Фишера. Факторный анализ проводили с использованием метода главных компонент. Метод вращения — Варимакс. Критерий Кайзера-Мейера-Олкина (КМО) — >0,500.

Исследование выполнено в рамках задания программы — 3.57 Государственной программы научных исследований "Трансляционная медицина", подпрограммы 4.3 "Инновационные технологии клинической медицины" 2023-2025гг (взятие образцов биологического материала, выделение общей фракции ДНК, молекулярно-генетический анализ статуса полиморфного варианта гена *MMP-3*).

Результаты

В таблице 3 приведены данные о динамике показателей ФВ ЛЖ и GLS в исследуемой выборке (n=100). В подгруппе КТ+ зарегистрировано статистически значимое снижение относительного изменения GLS в %.

Распределение частот встречаемости генотипов и аллельных вариантов генов-мишеней для подгрупп КТ+ и КТ- представлено в таблице 4.

Наличие или отсутствие статистически значимых различий соответствовало результатам факторного анализа, проведенного для молекулярно-

Таблица 4

Частоты встречаемости генотипов и аллельных вариантов rs35068180 (5A/6A) гена *MMP-3*, rs2232228 гена *HAS3*, rs8187710 гена *ABCC2* у пациентов

Показатель (генотип, аллель)	Подгруппа		Уровень значимости различий	ОШ (95% ДИ)
	КТ+	КТ-		
MMP-3 (rs35068180), n=100				
5A/5A	7/20 (35,0%)	41/80 (51,3%)	p>0,05	—
5A/6A	2/20 (10,0%)	13/80 (16,2%)	p>0,05	—
6A/6A	11/20 (55,0%)	26/80 (32,5%)	p<0,05	2,53 (0,93;6,88)
5A	16/40 (40,0%)	95/160 (53,4%)	p<0,05	0,45 (0,22;0,92)
6A	24/40 (60,0%)	65/160 (40,6%)	p<0,05	2,19 (1,08;4,44)
HAS3 (rs2232228), n=96				
AA	12/18 (66,7%)	29/78 (37,2%)	p<0,05	3,37 (1,15;9,97)
AG	2/18 (11,1%)	27/78 (34,6%)	p<0,05	0,24 (0,05;1,10)
GG	4/18 (22,2%)	22/78 (28,2%)	p>0,05	—
A	26/36 (72,2%)	85/156 (54,5%)	p<0,05	2,17 (0,98;4,80)
G	10/36 (27,8%)	71/156 (45,5%)	p<0,05	0,46 (0,21;1,02)
ABCC2 (rs8187710), n=98				
GG	18/18 (100,0%)	69/78 (84,6%)	p>0,05	—
GA	0/18 (0,0%)	7/78 (9,0%)	p>0,05	—
AA	0/18 (0,0%)	2/78 (2,6%)	p>0,05	—
G	36/36 (100,0%)	145/156 (92,9%)	p>0,05	—
A	0/36 (0,0%)	11/156 (7,1%)	p>0,05	—

Сокращения: ДИ — доверительный интервал, КТ+ — подгруппа с кардиотоксичностью, КТ- — подгруппа без кардиотоксичности, ОШ — отношение шансов.

генетических, лабораторных (биохимические) и ЭхоКГ показателей. Генотип 6A/6A rs35068180 гена *MMP-3* был сгруппирован — КМО =0,502 (p<0,001) в один фактор с показателем КТ (здесь и далее относительное снижение GLS в % согласно рекомендациям, 12% и 15%). Та же тенденция выявлена и для аллельного варианта 6A при значениях критерия КМО =0,492. Для генотипа AA rs2232228 гена *HAS3* — КМО =0,503 (p<0,001) при этом аллельный вариант A не был сгруппирован с показателем КТ. Как генотип AA, так и аллельный вариант A rs8187710 гена *ABCC2* были сгруппированы в один фактор с показателем КТ, однако значение КМО =0,493 было ниже порогового.

Обсуждение

Известно, что механизм действия доксорубина реализуется в нескольких направлениях. Одним из наиболее важных является инициация свободнорадикальных процессов, затрагивающих как клеточные мембраны, так и мембранные органоиды, такие как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, ядро. Поскольку уровень активности антиоксидантных систем в миокарде не является высоким, миокард страдает от чрезмерно эффективного воздействия доксорубина. С этим связан стремительный рост числа кардиомиоцитов, переходящих в состояние апоптоза и некроза. На фоне этого изменяется фенотип тка-

невых макрофагов и реализуется эскалация воспаления. В ряде случаев эти процессы стимулируют выработку белка *MMP-3*, который, в свою очередь, активирует транскрипцию *MMP-2*, *MMP-9* и других металлопротеиназ [15].

Снижение активности систем выведения доксорубина из клетки (*ABCC1*, *ABCC2*) и производства антиоксидантов (*HAS3* и др.) может в значительной степени усугубить кардиотоксический эффект, а также способствовать развитию таких его осложнений, как дилатационная кардиомиопатия и позднее сердечная недостаточность — одна из главных причин смерти онкологических пациентов не от основного заболевания [16]. Важно отметить, что в рамках нашего исследования действительно патогенный аллель A и генотип AA rs2232228 гена *HAS3* статистически значимо чаще встречались в подгруппе КТ+, что можно объяснить более низким уровнем соответствующего фермента — гиалуронан-синтазы и как следствие снижение уровня вырабатываемого ей гиалуронана в цитоплазме и внеклеточном пространстве. Это, в свою очередь, снижает защитный потенциал антиоксидантных систем. В то же время ни у одного пациента в подгруппе КТ+ не удалось выявить наличие патогенного аллельного варианта A и генотипа AA белка rs8187710 гена *ABCC2*. С одной стороны, для Европейской популяции характерна низкая встречаемость этого аллельного варианта

(5-10%, чаще 6%). Однако в ряде исследований показана его роль как предиктора развития КТ при использовании сравнительно высоких суммарных доз антрациклинов [17]. В нашем случае суммарная доза в 240 или 360 мг/м² считается низкой, что может обуславливать отсутствие взаимосвязи низкой активности АВСС2 с развитием КТ.

Взаимосвязь между уровнем мРНК гена *MMP-3* и статусом полиморфного варианта rs35068180 последовательности его промоторной области обоснована и подтверждена в ряде исследований. Наличие аллельного варианта 5А снижает сродство ингибиторов транскрипции к промотору, что позволяет более эффективно нарабатывать мРНК. При этом важную роль играет провоспалительный профиль микроокружения, выступающий в качестве индуктора экспрессии *MMP-3* в клетках. Аналогично этому происходит индукция транскрипции гена *MMP-3* и в случае наличия аллельного варианта 6А, за исключением того, что сродство ингибиторов к промоторной области в несколько раз сильнее. Это затрудняет организацию транскрипционного комплекса и уменьшает конечное количество синтезируемых копий мРНК [18].

В ходе токсического повреждения печени, легких и сердечной мышцы, создаются условия, опосредующие индукцию *MMP-3* с целью запуска ряда компенсаторных механизмов. Установлено, что генотип 5А/5А при этом статистически значимо чаще встречается в случае систолической и диастолической дисфункции ЛЖ, заболеваниях коронарных артерий, инфаркте миокарда. Повышение уровня мРНК *MMP-3* у носителей аллельного варианта 5А приводит к увеличению скорости распада белков внеклеточного матрикса не только за счет активности соответствующего белка (*MMP-3*), но и за счет высокой интенсивности активации транскрипции других металлопротеиназ. Это выражается в нарушении соотношения белков внеклеточного матрикса, общем снижении их количества, изменении структуры и функции миокарда. Исследования показывают, что генотип 6А/6А наоборот может способствовать снижению скорости активации белков семейства металлопротеиназ, зависящих от *MMP-3*, и как следствие накоплению белков внеклеточного матрикса, что также нарушает структуру и функцию миокарда, стимулируя развития фиброза [19].

В 2007г группа исследователей из Китая — Tang L-J, et al. показала, что генотип 5А/6А rs35068180 гена *MMP-3* статистически значимо встречается в группе пациентов с установленным диагнозом идиопатическая дилатационная кардиомиопатия. Они определили такой генотип как фактор увеличивающий риск развития дилатационной кардиомиопатии в течение жизни — показатель отношения рисков составил 2,718 (95% доверительный интервал: 1,454-5,081) [20].

Позже группа российских авторов — Копьева К. В. и др. (2023) установили, что генотип 5А/5А изучаемого полиморфизма гена *MMP-3* статистически значимо более часто встречается у онкологических пациентов с установленным диагнозом РМЖ на фоне развития признаков КТ опосредованной терапией препаратами антрациклинового ряда по сравнению с пациентами без КТ. Данный полиморфизм рассматривался авторами как предиктор развития КТ спустя 12 мес. после окончания ХТ антрациклинами [21]. В работе Черняк С. В. и др. (2023) много внимания уделяется вопросам профилактики ранней КТ при лечении РМЖ препаратами антрациклинового ряда [22]. В связи с этим важным аспектом профилактики развития кардиотоксического эффекта препаратов является поиск молекулярно-генетических предикторов, способствующих выявлению пациентов, попадающих в зону повышенного риска.

Ограничения исследования: а) не учитывается факт того, что пациенты, получившие суммарную дозу доксорубицина 240 мг/м², прошли ЭхоКГ после окончания адъювантной терапии доксорубицином раньше, чем пациенты, получившие суммарную дозу 360 мг/м², различается временной интервал между ЭхоКГ до и после терапии; б) сравнительно небольшой объем выборки, количество пациентов в подгруппе КТ+ <20; в) отсутствие данных о статусе метилирования промоторной области гена *MMP-3*.

Перспективы дальнейших исследований: а) расширение перечня полиморфных вариантов генов, вовлекаемых в процессы ремоделирования миокарда и формирования ниши для дифференцировки фибробластов; б) увеличение сроков наблюдения до 12, 24, 36 мес. после окончания ХТ; в) увеличение объема выборки; г) наряду с установлением полиморфного статуса генов-мишеней, получение данных о статусе метилирования их промоторной области.

Заключение

В рамках нашего исследования установлено, что генотип 6А/6А, аллельный вариант 6А rs35068180 гена *MMP-3*, генотип АА и аллельный вариант А rs2232228 гена *HAS3* могут рассматриваться как предикторы развития ранней КТ на этапе после окончания ХТ у пациентов с диагнозом РМЖ, получающих лечение доксорубицином.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках задания программы — 3.57 Государственной программы научных исследований "Трансляционная медицина", подпрограммы 4.3 "Инновационные технологии клинической медицины" 2023-2025гг (взятие образцов биологического материала, выделение общей фракции ДНК, молекулярно-генетический анализ статуса полиморфного варианта гена *MMP-3*).

Литература/References

1. Tantawy M, Pamittan FG, Singh S, et al. Epigenetic Changes Associated With Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clin Transl Sci*. 2021;14(1):36-46. doi:10.1111/cts.12857.
2. Abrahams C, Woudberg NJ, Lecour S. Anthracycline-induced cardiotoxicity: targeting high-density lipoproteins to limit the damage? *Lipids Health Dis*. 2022;21(1):85. doi:10.1186/s12944-022-01694-y.
3. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother*. 2021;139:111708. doi:10.1016/j.biopha.2021.111708.
4. Siemens A, Rassekh SR, Ross CJD, et al. Development of a Dose-Adjusted Polygenic Risk Model for Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Ther Drug Monit*. 2023;45(3):337-44. doi:10.1097/FTD.0000000000001077.
5. Kuang Z, Wu J, Tan Y, et al. MicroRNA in the Diagnosis and Treatment of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Biomolecules*. 2023;13(3):568. doi:10.3390/biom13030568.
6. Magdy T, Burmeister BT, Burridge PW. Validating the pharmacogenomics of chemotherapy-induced cardiotoxicity: What is missing? *Pharmacol Ther*. 2016;168:113-25. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.09.009.
7. Kuzheleva EA, Garganeva AA, Tukish OV, et al. A review of potential predictors of anthracycline-induced cardiotoxicity from the perspective of the pathogenesis of the disease. *Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2022;37(3):19-28. (In Russ.) Кужелева Е.А., Гарганеева А.А., Тукиш О.В. и др. Обзор потенциальных предикторов антрациклин-индуцированной кардиотоксичности с позиции патогенеза заболевания. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2022;37(3):19-28. doi:10.29001/2073-8552-2022-37-3-19-28.
8. Yang X, Li G, Guan M, et al. Potential Gene Association Studies of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;4:8:651269. doi:10.3389/fcvm.2021.651269.
9. Shi S, Chen Y, Luo Z, et al. Role of oxidative stress and inflammation-related signaling pathways in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cell Commun Signal*. 2023;14:21(1):61. doi:10.1186/s12964-023-01077-5.
10. Wang X, Liu W, Sun CL, et al. Hyaluronan synthase 3 variant and anthracycline-related cardiomyopathy: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2014;32:647-53. doi:10.1200/JCO.2013.50.3557.
11. Al-Otaibi TK, Weitzman B, Tahir UA, et al. Genetics of Anthracycline-Associated Cardiotoxicity. *Front Cardiovasc Med*. 2022;21:9:867873. doi:10.3389/fcvm.2022.867873.
12. Guizani I, Zidi W, Zayani Y, et al. Matrix metalloproteinase 3 and 9 as genetic biomarkers for the occurrence of cardiovascular complications in coronary artery disease: a prospective cohort study. *Mol Biol Rep*. 2022;49(10):9171-9. doi:10.1007/s11033-022-07742-1.
13. Munhoz FBA, Godoy-Santos AL, Santos MCLG. MMP-3 polymorphism: Genetic marker in pathological processes (Review). *Mol Med Rep*. 2010;3(5):735-40. doi:10.3892/mmr.2010.340.
14. Petrova EB, Popel ON, Shishko ON, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis of the precerebral arteries in asymptomatic individuals with subclinical hypothyroidism. *Cardiology in Belarus*. 2023;15(3):333-43. (In Russ.) Петрова Е.Б., Попель О.Н., Шишко О.Н. и др. Дислипидемия и атеросклероз прецеребральных артерий у бессимптомных лиц с субклиническим гипотиреозом. *Кардиология в Беларуси*. 2023;15(3):333-43. doi:10.34883/Pl.2023.15.3.004.
15. Dempke WCM, Zielinski R, Winkler C, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity — are we about to clear this hurdle? *Eur J Cancer*. 2023;185:94-104. doi:10.1016/j.ejca.2023.02.019.
16. Wang Z, Fan Z, Yang L, et al. Higher risk of cardiovascular mortality than cancer mortality among long-term cancer survivors. *Front Cardiovasc Med*. 2023;25;10:1014400. doi:10.3389/fcvm.2023.1014400.
17. Leong SL, Chaiyakunapruk N, Lee SW. Candidate Gene Association Studies of Anthracycline-induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):39. doi:10.1038/s41598-017-00075-1.
18. Huang XY, Han LY, Huang XD, et al. Association of Matrix Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinase-3 Gene Variants with Ischemic Stroke and Its Subtype. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(2):368-75. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.034.
19. Djuric T, Kuveljic J, Djordjevic A, et al. Association of MMP1 and MMP3 haplotypes with myocardial infarction and echocardiographic parameters of the left ventricle. *Mol Genet Genomic Med*. 2022;10(9):e2022. doi:10.1002/mgg3.2022.
20. Tang LJ, Chen XF, Zhu M, et al. Matrix metalloproteinase-1, -3, and -9 gene polymorphisms and the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Clin Biochem*. 2007;40(18):1427-30. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.09.013.
21. Kopteva KV, Grakov EV, Shilov SN, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: the role of genetic predictors. *Kardiologija*. 2023;63(4):22-8. (In Russ.) Копьева К.В., Граков Е.В., Шилов С.Н. и др. Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность: роль генетических предикторов. *Кардиология*. 2023;63(4):22-8. doi:10.18087/cardio.2023.4.n1946.
22. Chernyak SV, Kovsh EV, Sevruck TV, et al. Prevention of early cardiotoxicity in the systemic treatment of resectable breast cancer. *Cardiology in Belarus*. 2023;15(2):193-203. (In Russ.) Черняк С.В., Ковш Е.В., Севрук Т.В. и др. Профилактика ранней кардиотоксичности при системном лечении резектабельного рака молочной железы. *Кардиология в Беларуси*. 2023;15(2):193-203. doi:10.34883/Pl.2023.15.2.003.