

## БИОМАРКЕРИ ЗА РАННА ДИАГНОЗА НА КАРДИОТОКСИЧНОСТ ПРИ ХИМИОТЕРАПИЯ

Б. КРЪСТЕВ<sup>1</sup>, Е. КИНОВА<sup>1</sup>, Б. ПЕНЧЕВА<sup>2</sup>, Р. МИХАЙЛОВ<sup>2</sup>, С. КЮРКЧИЕВ<sup>3</sup>,  
И. КЕХАЙОВ<sup>3</sup>, Е. ИВАНОВА<sup>3</sup>, Н. ЗЛАТАРЕВА<sup>1</sup> и А. ГУДЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Клиника по кардиология, УМБАЛ "Царица Йоанна" – ИСУЛ

<sup>2</sup>Клинична лаборатория, УМБАЛ "Царица Йоанна" – ИСУЛ

<sup>3</sup>Институт по биология и имунология на размножаването – БАН

## THE ROLE OF BIOMARKERS IN EARLY DIAGNOSIS OF CHEMOTHERAPY-INDUCED CARDIOTOXICITY

B. KRASTEV<sup>1</sup>, E. KINOVA<sup>1</sup>, B. PENCHEVA<sup>2</sup>, R. MIHAILOV<sup>2</sup>, S. KYURKCHIEV<sup>3</sup>,  
I. KEHAYOV<sup>3</sup>, E. IVANOVA<sup>3</sup>, N. ZLATAREVA<sup>1</sup> AND A. GOUDEV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, University Hospital "Tsaritsa Yoanna" – ISUL – Sofia

<sup>2</sup>Clinical Laboratory, University Hospital "Tsaritsa Yoanna" – ISUL – Sofia

<sup>3</sup>Institute of Biology and Immunology of Reproduction – BAS

**Резюме.** Кардиотоксичността е сериозен страничен ефект на химиотерапията. Разгадаването на молекулните механизми на цитостатик-индуцираната кардиотоксичност би довело до установяване на подходящите биомаркери за мониториране на сърдечно-съдовата токсичност. Целта на проучването е да се оцени кардиотоксичността в хода на провеждана химиотерапия с изследване на биомаркерите мозъчен натриуретичен пептид (BNP), тропонин, антимиелопероксидаза и анти-heat shock protein 70. Проследени са 44 пациенти с различни онкологични заболявания, лекувани с антрациклинови антибиотици, трастузумаб, цисплатина. Всички биомаркери са изследвани преди започване на лечението и на шестия месец от него. В сравнение с изходните стойности на шестия месец от лечението се установи статистически сигнификантно повишение на мозъчния натриуретичен пептид от  $45.56 \pm 62.9$  до  $94.77 \pm 117.5$  pg/ml ( $p = 0,04$ ) и на антимиелопероксидазата (anti-MPO) от  $1.73 \pm 0.52$  до  $1.93 \pm 0.48$  U/ml ( $p = 0,02$ ). При четирима пациенти бяха регистрирани стойности на BNP над горната нормална граница. Не бяха наблюдавани сигнификантни промени в стойностите на тропонина и anti-heat shock protein 70 по време на проучването. Пациентите бяха асимптомни през цялото време на проследяване. В заключение може да се каже, че биомаркерите BNP и anti-MPO могат да се използват като предиктори на кардиотоксичност по време на химиотерапия. Необходими са допълнителни проучвания за стандартизиране на въвеждането на BNP и anti-MPO като маркери за скрининг на пациенти с риск за кардиотоксичност.

**Ключови думи:** кардиотоксичност, биомаркери, химиотерапия

**Summary.** Cardiotoxicity is a serious side effect of chemotherapy. Deciphering the molecular mechanisms of cytostatic-induced cardiotoxicity could lead to identification of appropriate biomarkers for monitoring of cardiovascular toxicity. The aim of the study was to assess cardiotoxicity during chemotherapy by measurement of the biomarkers brain natriuretic peptide,

*troponin, anti-myeloperoxidase and anti-heat shock protein 70. 44 patients with different cancer types were evaluated during chemotherapy with anthracyclines, trastuzumab and cisplatin. All biomarkers were measured at baseline and 6 months later. Comparing to initial values, a statistically significant increase of BNP values from  $45.56 \pm 62.9$  pg/ml to  $94.77 \pm 117.5$  pg/ml ( $p = 0.04$ ) and anti-myeloperoxidase (anti-MPO) from  $1.73 \pm 0.52$  U/ml to  $1.93 \pm 0.48$  U/ml ( $p = 0.02$ ) at the sixth month was registered. In four patients, BNP values exceeded upper normal limits. No significant changes in troponin values and anti-heat shock protein 70 during the study were observed. Concluded is that biomarkers BNP and anti-MPO can be used as predictors of cardiotoxicity during chemotherapy. Further investigations are necessary for standardization of the use of BNP and anti-MPO as screening markers for patients with cardiotoxicity risk.*

**Key words:** cardiotoxicity, biomarkers, chemotherapy

Клиничната ефективност на химиотерапията често е лимитирана от свързаната с нея кардиотоксичност, водеща до кардиомиопатия и развиваща се във времето сърдечна недостатъчност, която влошава прогнозата на пациента [5].

Диагностицирането на сърдечно-съдова увреда в ранен етап е от изключително важно значение за далечната прогноза на пациентите с онкологични заболявания. Това налага въвеждането в ежедневната практика на маркери, с които да се диференцират и проследяват високорисковите пациенти, с цел ранна диагноза и своевременно лечение на сърдечните увреждания, както и промяна в антитуморната терапия.

През последните години нарастват клиничното значение и интересът към т.нар. биомаркери – ензими, хормони, маркери за сърдечен стрес, увреждане и дисфункция [2]. Изследването им с цел мониториране на сърдечно-съдовата токсичност представлява атрактивна стратегия от гледна точка на минималния инвазивен характер, бързината и по-ниската честота на вариациите в измерванията в сравнение с ехокардиографията.

В литературата съществуват противоречиви данни по отношение на ролята и механизма на мозъчния натриуретичен пептид (BNP) и тропонина в ранната диагноза на кардиотоксичността [4]. Необходимо е да бъдат валидирани диагностичната и прогностичната стойност на други маркери, използвани в кардиологията за мониториране на сърдечно-съдовата токсичност след химиотерапия.

Неотдавна проведени проучвания установяват повишени плазмени нива на миелопероксидаза при пациенти със систолна дисфункция, като стойностите на ензима корелират с тежестта на сърдечната недостатъчност [12]. Установена е и ролята му в стратификацията на риска при пациенти с гръдна болка [8].

Heat shock proteins (HSP) са голяма група протеини, чиято експресия е увеличена в условията на клетъчен стрес. Значението на протеините за диагнозата на кардиотоксичността по време на химиотерапия е установено за HSP 27, 70, 90 [6, 13, 15]. Недостатъкът на тези изследвания е, че са провеждани върху животни и клетъчни култури.

**Целта** на нашето изследване е да се установи ролята на мозъчния натриуретичен пептид, тропонина, миелопероксидазата и heat shock protein 70 като предиктори на кардиотоксичност при онкологично болни на химиотерапевтично лечение.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

За периода от ноември 2008 г. до май 2009 г. са изследвани 44 пациенти (13 мъже и 31 жени) с различни неопластични заболявания, лекувани с цитостатици с установена кардиотоксична активност (антрациклинови антибиотици, платинови медикаменти, таксани, моноклонални антитела, 5-флуороурацил). Средната възраст на изследваната група е  $55.3 \pm 12.2$  год.

Пациентите са подбрани на базата на включващи и изключващи критерии, представени на табл. 1.

**Таблица 1.** Включващи и изключващи критерии на пациентите

	Включващи критерии	Изключващи критерии
1.	Възраст 18-70 г.	Преживян миокарден инфаркт
2.	Започващи за първи път ХТ	Нестабилна ангина през последните 3 мес.
3.	Синусов ритъм	Симптоми на сърдечна недостатъчност
4.	ECOGPS < 3	Фракция на изтласкване под 50%
5.	Медикаменти с изявена кардиотоксичност *	Вродени и придобити клапни пороци
6.	Липсващи тежки съпътстващи заболявания	Креатининов клирънс под 30 mL/min/1.73 <sup>2</sup>
7.	Информирано съгласие	ASAT, ALAT над 2 пъти от нормата
8.	Очаквана продължителност на живота повече от 6 мес.	Hgb под 10 g/dl
9.		Възпалителни заболявания

ХТ – химиотерапия

ECOGPS – Eastern cooperative oncology group performance status

\* Антрациклинови антибиотици, платинови медикаменти, таксани, моноклонални антитела, 5-флуороурацил

ASAT – аспаратаминотрансфераза

АЛАТ – аланинаминотрансфераза

Hgb – хемоглобин

При всички пациенти са изследвани мозъчен натриуретичен пептид, тропонин, антитела към миелопероксидаза (anti-MPO) и антитела към heat shock protein 70 (anti-HSP 70) от венозна кръв преди химиотерапията и на 6-ия месец след това. Взетата венозна кръв преди стартиране на химиотерапията и впоследствие е съхранявана при температура  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента на изследването, което е проведено в ИБИР – БАН, от специализиран екип за anti-MPO и anti-Hsp 70 и в клиничната лаборатория на УМБАЛ "Царица Йоанна" – ИСУЛ, за мозъчен натриуретичен пептид и тропонин.

За целите на проучването са използвани следните реактиви:

- Anti-myeloperoxidase – Immunometric Enzyme Immunoassay (Orgentec Diagnostika GmbH), горногранична стойност 5 U/ml;

- Anti-Heat shock protein 70 – Immunometric Enzyme Immunoassay, Stressgen (Stressgen);

- Troponin I – Microparticle Enzyme Immunoassay (AxSYM, Abbott), горногранична стойност 0.4 ng/ml;

- BNP – Microparticle enzyme immunoassay (AxSYM, Abbott), горногранична стойност 100 pg/ml.

Статистическата обработка на данните е извършена със статистическия пакет SPSS version 13 for Windows. За анализа на количествени показатели е използван t-тест или Mann-Whitney U-test.

## РЕЗУЛТАТИ

При изследването на шестия месец от провежданата ХТ се регистрира статистически сигнификантно увеличение на стойностите на два от биомаркерите – BNP и anti-MPO (табл. 2).

**Таблица 2.** Стойности на биомаркерите в изследваната група пациенти

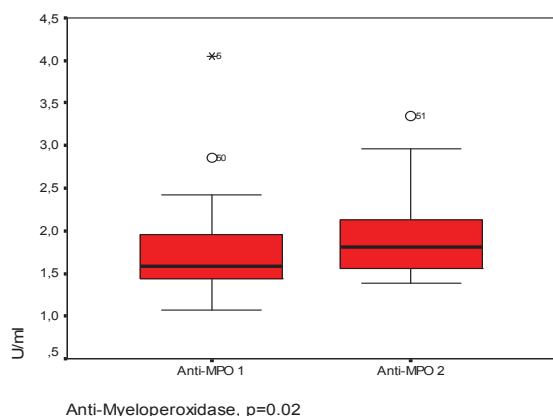
Биомаркери	Преди ХТ	След ХТ	P
Тропонин, ng/ml	0.019 ± 0.49	0.012 ± 0.29	0.41
BNP, pg/ml	45.56 ± 62.9	94.77 ± 117.5	0.04
Anti-MPO, U/ml	1.73 ± 0.52	1.93 ± 0.48	0.02
Anti-HSP70, ng/ml	263.73 ± 126	293.99 ± 180.6	0.24

ХТ – химиотерапия

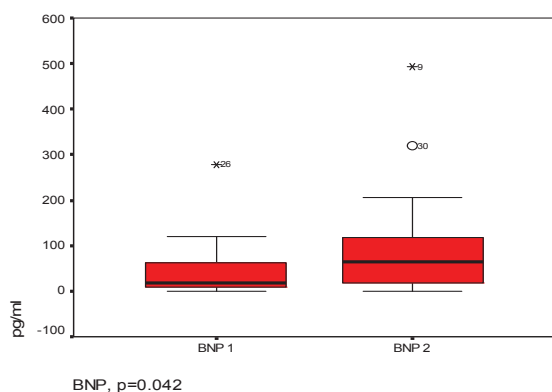
BNP – мозъчен натриуретичен пептид

Стойностите на миелопероксидазата се увеличиха от  $1.73 \pm 0.52$  U/ml преди химиотерапията до  $1.93 \pm 0.48$  U/ml на 6-ия месец от лечението,  $p = 0,02$  (фиг. 1). Въпреки че увеличението е статистически значимо, стойностите на anti-MPO останаха в референтни граници при всички пациенти.

Мозъчният натриуретичен пептид също увеличи стойността си приблизително двойно (фиг. 2), като при четирима от онкологично болните се покачи над 100 pg/ml (горногранична стойност).



**Фиг. 1.** Стойности на антимиелопероксидазата преди и на 6-ия месец от химиотерапията



**Фиг. 2.** Стойности на мозъчния натриуретичен пептид (BNP) преди и на 6-ия месец от химиотерапията

Покачването на anti-HSP 70 от  $263.73 \pm 126$  ng/ml до  $293.99 \pm 180.6$  ng/ml се оказа статистически незначимо.

## ОБСЪЖДАНЕ

Биомаркерите с практическо значение трябва да отговарят на 3 критерия: първо – достъпност, бързина на изследването и ниска цена, второ – да дават допълнителна информация, и трето – да подпомагат вземането на терапевтично решение.

Идентифицирането на маркери в комбинация с ехокардиографията би могло да подобри прогностичната и ранната им диагностична стойност за развитие на СН, в сравнение с използването на един маркер.

Ние изследвахме четири маркера, а именно: за миокардионекроза – тропонин, за сърдечна недостатъчност – мозъчен натриуретичен пептид, за оксидативен стрес – миелопероксидазата, и неспецифичен маркер за клетъчна увреда – heat shock protein 70.

При изследването на тропонина преди и по време на химиотерапията в нашата група не бяха регистрирани сигнификантни разлики, като нямаше и пациенти, чиито стойности да бъдат над горнограничните за сърдечно-съдова увреда. Cardinale и сътр. [3] установяват, че изследването на тропонина непосредствено след химиотерапия може да идентифицира високорисковите пациенти за развитие на кардиотоксичност, т.е. те използват тропонина като маркер за остра токсичност, докато ние се фокусираме върху субакутна токсичност.

При изследването на anti-heat shock protein 70 също не открихме промени в стойността преди и на 6-ия месец от лечението, които да бъдат статистически значими. Интересът ни към този маркер беше породен от факта, че повишени антитела към HSP-70 са доказани при хора с дилатативна кардиомиопатия, а самият протеин играе важна роля в процесите на клетъчна репарация [11, 12]. В резултат на увреждането на кардиомиоцита по различни механизми стресовите сигнални системи се свързват с прекурсори на heat shock протеини, което от своя страна води до тяхното синтезиране. Въпреки че прецизният механизъм, по който тези протеини играят

ролята на клетъчни протектори, не е установен, се смята, че те изпълняват различни функции, като потискат оксидативния стрес, участват във възстановяването на цитоскелета, осъществяват супресия на проинфламаторни фактори, предотвратяват апоптоза, възстановяват функцията на йонните канали [1].

В световен мащаб повечето изследвания, изясняващи ролята на HSP-70 след химиотерапия, са провеждани на животни или клетъчни култури. Ние предположихме, че HSP-70 играе важна роля в репаративните и кардиопротективните механизми след химиотерапия и че повишените нива на пептида в отговор на нарушенията в диастолната функция на лявата камера биха могли да бъдат маркер за предикция на кардиотоксичността.

Установихме статистически сигнификантна разлика между измерените в началото и на 6-ия месец от лечението стойности на миелопероксидазата и мозъчния натриуретичен пептид.

Миелопероксидазата е маркер, който би могъл да бъде индиректен показател за оксидативния стрес, предполагаем патогенетичен механизъм на сърдечна увреда от антрациклинови антибиотици. През последните години се натрупаха убедителни доказателства, че неговите стойности корелират с тежестта на сърдечната недостатъчност [14]. В нашата група установихме значимо повишаване на стойността на ензима в хода на химиотерапевтичното лечение, въпреки че стойностите остават в референтните граници.

При изследването на мозъчния натриуретичен пептид регистрирахме покачване на серумните нива в отговор на химиотерапевтичното лечение, като при четирима болни стойностите бяха над горнограничните за този маркер (100 pg/ml). Синтезът на мозъчния натриуретичен пептид от тъканта на камерите корелира с тежестта на сърдечната недостатъчност, като повишена

секреция на пептида е установена и при пациенти с диастолна дисфункция като израз на повишените налягания на пълнене [7]. Тъй като негативната предиктивна стойност на маркера е висока и наличието на ниски стойности прави подлежаща сърдечна дисфункция малко вероятна, той може да бъде скринингов показател на кардиотоксичност след химиотерапия. Въпреки това досега няма убедителни данни, доказващи неговата роля в детекцията на сърдечно-съдовата токсичност, а повечето проучвания в тази насока са провеждани върху малък брой пациенти.

В изследване, проведено при 28 болни, лекувани с доксорубицин, Nousiainen установява повишени стойности на мозъчния натриуретичен пептид, които корелират с нарушена диастолна функция [9]. Okumura и сътрудници също потвърждават диагностичната стойност на пептида при 13 пациенти, третирани с антрациклинови антибиотици, като ранен маркер на кардиотоксичност [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биомаркерите BNP и anti-MPO могат да бъдат използвани като предиктори на кардиотоксичност по време на химиотерапия. Необходими са допълнителни проучвания за стандартизиране на въвеждането на BNP и anti-MPO като маркери за скрининг на пациенти с риск за кардиотоксичност.

## Библиография

1. Benjamin, I. J. et D. R. McMillan. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. – *Circ. Res.*, **83**, 1998, 117-132.
2. Braunwald, E. Biomarkers in heart failure. – *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2008, 2148-2159.
3. Cardinale, D. et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. – *Circulation*, **109**, 2004, 2749-2754.
4. Daugard, G. et al. Natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline induced reduction in left ventricular ejection fraction. – *Eur. J. Heart Failure*, **7**, 2005, № 1, 87-93.
5. Ewer, M. et S. Lippman. Type II chemotherapy-related

- cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. – J. Clin. Oncol., **23**, 2005, 2900-2902.
6. Gabrielson, K. et al. Heat shock protein 90 and ErbB2 in the cardiac response to doxorubicin injury. – Cancer Res., **67**, 2007, № 4, 1436-1441.
  7. Lang, C. C. et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with isolated diastolic dysfunction. – Am. Heart J., **127**, 1994, 1635-1636.
  8. Brennan, M. L. et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. – N. Engl. J. Med., **349**, 2003, 1595-1604.
  9. Nousiainen, T. et al. Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. – J. Intern. Med., **251**, 2002, № 3, 228-234.
  10. Okumura, H. et al. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. – Acta Haematol., **104**, 2000, 158-163.
  11. Pockley, G. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. – Circulation, **105**, 2002, 1012-1017.
  12. Portig, I., S. Pankuweit et B. Maisch. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy. – J. Mol. Cell. Cardiol., **29**, 1997, 2245-2251.
  13. Simoncikova, P., T. Ravingerova et M. Barancik. The effect of chronic doxorubicin treatment on mitogen-activated protein kinases and heat shock proteins in rat hearts. – Physiol. Res., **57**, 2008, 98-102.
  14. Tang, W. et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. – JACC, **49**, 2007, 2364-2370.
  15. Turakhia, S. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: direct correlation of cardiac fibroblast and H9c2 cell survival and aconitase activity with heat shock protein 27. – Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **293**, 2007, № 5, 3111-3121.

Постъпила – 15.02.2010 г.

✉ Адрес за кореспонденция:

д-р Б. Кръстев  
Клиника по кардиология  
УМБАЛ „Царица Йоанна” – ИСУЛ  
ул. „Бяло море” № 8  
1527 София  
☎ 02/9432-297  
e-mail: krustev80@abv.bg

✉ Address for correspondence:

B. Krastev, M. D.  
Department of Cardiology  
University Hospital “Tsaritsa Yoanna” – ISUL  
8, Byalomora Str.  
Bulgaria – 1527 Sofia  
☎ +359 2 9432-297  
e-mail: krustev80@abv.bg