

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2020-35-2-66-74>
УДК 616.12-008.46:577.112

Роль провоспалительных цитокинов в развитии антрациклин-индуцированной сердечной недостаточности

А.Т. Тепляков¹, С.Н. Шилов², А.А. Попова², Е.Н. Березикова², Е.В. Гракова¹,
М.Н. Неупокоева², К.В. Копьева¹, Е.Т. Ратушняк³, Е.И. Степачев²

¹ Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

² Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации,
630091, Российская Федерация, Новосибирск, Красный пр., 52

³ Государственный Новосибирский областной врачебно-физкультурный диспансер,
630091, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Гоголя, 3а

Аннотация

Цель: изучить патогенетическую и прогностическую роль цитокинов (фактора некроза опухоли- α – ФНО- α и интерлейкина-1 β – ИЛ-1 β) при развитии антрациклин-индуцированной хронической сердечной недостаточности (ХСН).

Материал и методы. Обследованы 176 женщин с раком молочной железы (РМЖ), получавших антрациклиновые антибиотики в составе схем полихимиотерапии (ПХТ). По итогам обследования через 12 мес. после окончания ПХТ пациентки, находящиеся в состоянии ремиссии основного заболевания, были разделены на 2 группы: больные с развитием кардиотоксического ремоделирования (группа 1 – 52 человека) и женщины с сохраненной функцией сердца (группа 2 – 124 человека). Всем больным до начала курса химиотерапии, в динамике лечения антрациклинами и после терапии проводили эхокардиографическое (ЭхоКГ) исследование. Биохимическое исследование крови для определения уровней ФНО- α и ИЛ-1 β осуществляли до начала курса ПХТ, после завершения ПХТ и через 12 мес. после завершения ПХТ. Определение полиморфизмов генов ФНО- α (–308G/A, rs1800629) и ИЛ-1 β (+3953, rs1143634) проводили методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. В группе 1 более высокий уровень ФНО- α и ИЛ-1 β ассоциировался с развитием ХСН через 12 мес. после окончания ПХТ. Уровень ФНО- α более 7,5 пг/мл (чувствительность – 44,2%, специфичность – 75,8%, AUC = 0,600; 95% CI = 0,524–0,673; p = 0,035) после завершения курса ПХТ позволил с наибольшей вероятностью прогнозировать развитие сердечно-сосудистых осложнений у женщин, получавших терапию антрациклинами. Исследование не выявило значимых различий в распределении частот встречаемости генотипов полиморфизма 308G/A (rs1800629) гена ФНО- α и полиморфизма +3953 (rs1143634) гена ИЛ-1 β в исследованных группах.

Заключение. У больных с РМЖ и развившейся антрациклин-индуцированной ХСН через 12 мес. после окончания ПХТ выявляется повышенный уровень ФНО- α и ИЛ-1 β , что свидетельствует о патогенетической роли провоспалительных цитокинов в развитии поражения сердца при терапии антрациклинами.

Ключевые слова:	кардиотоксичность, антрациклины, сердечная недостаточность, цитокины, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1 β .
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Соответствие принципам этики:	информированное согласие получено от каждого пациента. Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (протокол № 143 от 16.03.2016 г.).

Для цитирования:

Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Березикова Е.Н., Гракова Е.В., Неупокоева М.Н., Копьева К.В., Ратушняк Е.Т., Степачев Е.И. Роль провоспалительных цитокинов в развитии антрациклин-индуцированной сердечной недостаточности. *Сибирский медицинский журнал*. 2020;35(2):66–74. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2020-35-2-66-74>.

The role of proinflammatory cytokines in the development of anthracycline-induced heart failure

Alexander T. Teplyakov¹, Sergey N. Shilov², Anna A. Popova²,
Ekaterina N. Berezikova², Elena V. Grakova¹, Maria N. Neupokoeva²,
Kristina V. Kopeva¹, Elena T. Ratushnyak³, Egor I. Stepachev²

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University, 52, Krasnyi pr., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

³ State Novosibirsk Regional Medical and Physical Education Dispensary, 3a, Gogol str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Abstract

Objective. To study the pathogenetic and prognostic role of cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β)) in the development of anthracycline-induced chronic heart failure (CHF).

Material and Methods. A total of 176 women with breast cancer who received anthracycline antibiotics as a part of polychemotherapy regimens were examined. Upon examination, the patients in remission were divided into two groups within 12 months after the completion of chemotherapy: patients with the development of cardiotoxic remodeling (group 1, $n = 52$) and women with preserved cardiac function (group 2, $n = 124$). All patients received echocardiography study before, during, and after chemotherapy. Biochemical blood tests were done to determine the levels of TNF- α and IL-1 β before chemotherapy, immediately after it, and 12 months after chemotherapy completion. Determination of polymorphisms of the TNF- α (–308G/A, rs1800629) and IL-1 β genes (+3953, rs1143634) was carried out by polymerization chain reaction.

Results. A higher level of TNF- α and IL-1 β in group 1 was associated with the development of heart failure 12 months after the end of chemotherapy. The level of TNF- α over 7.5 pg/mL after the completion of chemotherapy allowed to predict the development of cardiovascular complications in women receiving anthracycline therapy with sensitivity of 44.2% and specificity of 75.8% (AUS = 0.600; 95% CI = 0.524–0.673; $p = 0.035$). The study did not reveal any significant differences in the frequency distribution for genotypes of 308G/A polymorphism (rs1800629) of the TNF- α gene and +3953 (rs1143634) polymorphism of the IL-1 β gene in the studied groups.

Conclusion. Patients with breast cancer who developed anthracycline-induced heart failure 12 months after the end of chemotherapy had the increased levels of TNF- α and IL-1 β suggesting the pathogenetic role of proinflammatory cytokines in the development of cardiac injury during anthracycline therapy.

Keywords:	cardiotoxicity, anthracyclines, heart failure, cytokines, tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β .
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.
Adherence to ethical standards:	informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of Cardiology Research Institute of Tomsk NRMС (protocol No. 143 from 16.03.2016).
For citation:	Teplyakov A.T., Shilov S.N., Popova A.A., Berezikova E.N., Grakova E.V., Neupokoeva M.N., Kopeva K.V., Ratushnyak E.T., Stepachev E.I. The role of proinflammatory cytokines in the development of anthracycline-induced heart failure. <i>The Siberian Medical Journal</i> . 2020;35(2):66–74. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2020-35-2-66-74 .

Введение

Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются ведущей причиной заболеваемости и смертности в промышленно развитых странах. Тем не менее есть основания для оптимизма. Современные стратегии лечения привели к значительному улучшению прогноза у больных с данными заболеваниями. Так, 5-летняя выживаемость при раке молочной железы (РМЖ) ранней стадии увеличилась с 79% в 1990 г. до 88% в 2012 г.; аналогичные показатели достигнуты и при других солидных и гематологических злокачественных опухолях, в том числе при неходжкинской лимфоме и раке яичка [1]. При долгосрочном прогнозе по выживаемости больных с онкологическими заболеваниями ожидаемое увеличение в течение 10 лет, начиная с 2012 г., составит примерно 30%, достигнув 18 млн к 2022 г. в США [2]. Многие современные методы противоопухолевого лечения ассоциируются с различной степенью выраженности осложнений, в том числе со стороны сердечно-сосудистой системы (кардиотоксичность, ишемия, артериальная гипертензия, аритмии). Встречаемость кардиологических осложнений варьирует в широких пределах в зависимости от используемой схемы терапии рака, продолжительности лечения, а также от основных сопутствующих заболеваний пациента [3–6].

В обзоре, касающемся РМЖ, у выживших в США женщин был отмечен высокий риск смерти от сердечно-сосудистых осложнений, вызванных полихимиотерапией (ПХТ), превышающий риск смерти от самого опухолевого заболевания или от его рецидива [7]. В исследовании, проведенном в США, показано, что 33% больных из 1807 выживших после успешного лечения онкологического процесса в течение 7 лет умерли от болезней сердца [8].

В настоящее время проводятся многочисленные исследования по раннему выявлению кардиотоксичных повреждений химиотерапией, разработке 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 РМЖ, 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.

Цель исследования: изучить патогенетическую и прогностическую роль цитокинов (фактора некроза опухоли- α – ФНО- α и интерлейкина-1 β – ИЛ-1 β) при развитии антрациклин-индуцированной хронической сердечной недостаточности (ХСН).

Материал и методы

Обследованы 176 женщин с РМЖ в возрасте от 35 до 55 лет, получавших антрациклиновые антибиотики в составе схем полихимиотерапевтического лечения. По итогам обследования через 12 мес. после окончания ПХТ пациентки, находившиеся в состоянии ремиссии основного заболевания, были разделены на 2 группы: больные с развитием кардиотоксического ремоделирования миокарда и развитием ХСН (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), таблица 1. Для лечения РМЖ применялась схема, включающая комбинацию доксорубицина и циклофосфамида (АС), к данным препаратам добавляли доцетаксел (схема ТАС). Кумулятивная доза доксорубицина составляла 300–360 мг/м².

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика обследованных женщин до начала проведения полихимиотерапии
Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics of patients

Показатели Characteristics	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	p-value
Возраст, лет Age, years	45 [42; 47]	45 [42; 50]	0,557
Кумулятивная доза доксорубицина, мг/м ² Cumulative dose of doxorubicin, mg/m ²	360 [360; 360]	360 [360; 360]	0,818
Схема ПХТ АС, n (%) Chemotherapy regimen AC, n (%)	29 (55,8)	74 (59,7)	0,631
Схема ПХТ ТАС, n (%) Chemotherapy regimen TAC, n (%)	23 (44,2)	50 (40,3)	0,631
1-й ФК ХСН, n (%) CHF FC 1, n (%)	39 (75,0)	–	–
2-й ФК ХСН, n (%) CHF FC 2, n (%)	13 (25,0)	–	–
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²	24,7 [21,8; 25,8]	23 [21,15; 25,55]	0,255
Частота сердечных сокращений, уд./мин Heart rate, b.p.m.	75 [68; 82]	75 [69; 81]	0,825
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mmHg	125 [120; 130]	125 [120; 130]	0,744
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mmHg	80 [75; 80]	80 [80; 80]	0,012

Окончание табл. 1
End of table 1

Показатели Characteristics	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	p-value
Тест 6-минутной ходьбы, м 6-min walk test distance, m	565 [551; 574]	578 [561; 598]	0,004
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/L	5,2 [4,85; 5,7]	5,25 [4,8; 5,7]	0,882
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1,6 [1,2; 2,05]	1,6 [1,1; 2,0]	0,538
ЛПНП, ммоль/л LDL-cholesterol, mmol/L	2,4 [2,2; 2,8]	2,4 [2,1; 2,8]	0,475
ЛПВП, ммоль/л HDL-cholesterol, mmol/L	2,3 [2,0; 2,4]	2,2 [2,0; 2,4]	0,323
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	4,8 [4,3; 5,25]	4,7 [4,3; 5,3]	0,541
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μ mol/L	75 [68; 86]	77 [71; 86,5]	0,619

Примечание: ПХТ – полихимиотерапия, АС – схема ПХТ, включающая доксорубин и циклофосфамид, ТАС – схема ПХТ, включающая доксорубин, циклофосфамид и доксорубин, ФК ХСН – функциональный класс хронической сердечной недостаточности, ИМТ – индекс массы тела, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности.

Note: AC-regimen – combination of doxorubicin and cyclophosphamide, TAC-regimen – combination of doxorubicin, cyclophosphamide, and docetaxel, BMI – body mass index (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared), CHF FC – functional class of chronic heart failure, BMI – body mass index, LDL-cholesterol – low density lipoprotein cholesterol, HDL-cholesterol – high density lipoprotein cholesterol.

Как видно из таблицы 1, по возрасту, схемам ПХТ и кумулятивной дозе доксорубина исследованные группы были сопоставимы. По суммарной очаговой дозе при лучевой терапии и пораженной молочной железе (правая или левая) группы также были сопоставимы. По клинико-лабораторным показателям в исследованных группах до начала наблюдения выявлены различия по уровню диастолического давления и величине пройденной дистанции по результатам теста 6-минутной ходьбы, но оба показателя были в пределах нормальных значений.

Пациентки, участвующие в данном исследовании, не имели доказанной патологии со стороны сердечно-сосудистой системы, выраженной сопутствующей патологии, сахарного диабета до начала противоопухолевого лечения. Наличие любого из нижеперечисленных заболеваний служило критерием исключения из исследования: ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, пороки сердца и кардиомиопатии любой этиологии, предшествующие онкологическому заболеванию. Отсутствие кардиологической патологии было подтверждено данными анамнеза, ЭКГ, ЭхоКГ. В исследование не включали женщин с прогрессированием основного заболевания на фоне проводимого противоопухолевого лечения.

Всем больным до начала курса химиотерапии, в динамике лечения антрациклинами и через 12 мес. терапии выполняли исследование ЭхоКГ показателей; для оценки функционального класса (ФК) ХСН проводили тест 6-минутной ходьбы и определяли состояние пациенток по Шкале оценки клинического состояния (ШОКС). Критериями развития кардиотоксичности являлись снижение фракции выброса левого желудочка через 12 мес. после окончания ПХТ, превышающее 10% от исходных величин, появление клинических признаков ХСН, ФК, которой оценивали по результатам теста 6-минутной ходьбы и ШОКС.

У пациенток с РМЖ проводили биохимическое исследование крови для определения уровней ФНО- α и ИЛ-

1 β до начала курса ПХТ, после завершения ПХТ и через 12 мес. после завершения ПХТ.

У всех пациенток забирали генетический материал с последующим типированием аллелей генов ФНО- α (полиморфизмы –308G/A, rs1800629) и ИЛ-1 β (+3953, rs1143634). ДНК выделяли из Buccalного эпителия. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами, которые были подобраны с использованием базы данных однонуклеотидных полиморфизмов dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ STATISTICA (StatSoft, Inc.) и MedCalc 11.5.0.0. Количественные переменные определяли в виде медианы (Me), а также 25- и 75-го квартилей (25Q и 75Q). Для проверки статистических гипотез при сравнении двух независимых количественных переменных использовали критерий Манна – Уитни. Качественные данные представляли в виде процентов и абсолютных значений. Для анализа качественных признаков использовали таблицы сопряженности с расчетом критерия χ^2 Пирсона. Критический уровень значимости p-value для всех процедур анализа принимали равным 0,05.

Для оценки прогностического влияния уровней цитокинов на развитие антрациклин-индуцированной кардиотоксичности выполнили анализ соответствующих ROC (receiver operating characteristic) кривых. На ROC-кривой определяли точку, соответствующую оптимальному соотношению чувствительности и специфичности.

Силу ассоциаций генотипических характеристик изученных генов с риском развития неблагоприятного исхода оценивали по значениям показателя отношения шансов (odds ratio, OR) и его 95% доверительного интервала (95% CI). Величина OR = 1 указывала на отсутствие ассоциаций, при OR > 1 имела место положительная ассоциация аллеля или генотипа с заболеванием («фактор

риска»), при $OR < 1$ – отрицательная ассоциация аллеля или генотипа с заболеванием («протективный фактор»).

Для контроля результатов генотипирования использовали тест на равновесие Харди – Вайнберга. Соответствие равновесию Харди – Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера (рехаст). Точный тест Фишера на соблюдение распределения генотипов равновесию Харди – Вайнберга проводили с помощью онлайн программы на сайте Института генетики человека (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Результаты

Концентрация ФНО- α после окончания противоопухолевой ПХТ у больных группы 1 существенно не отличалась от исходных показателей, но была значимо выше таковых по сравнению с группой 2 (8,1 [6,5; 9,5] пг/мл против 7,3 [5,8; 8,4] пг/мл, $p = 0,036$), таблицы 2, 3. Также у женщин группы 2 концентрация данного цитокина существенно снижалась по сравнению с исходным уровнем (7,3 [5,8; 8,4] против 8,7 [6,95; 9,8] пг/мл, $p = 0,001$).

Через 12 мес. происходило существенное снижение концентрации ФНО- α в исследованных группах по отно-

шению к уровням до начала и после завершения ПХТ. Однако в группе 1 у женщин с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью уровень изученного цитокина существенно превышал таковой в группе 2 с сохраненной функцией сердца (5,1 [4,65; 5,4] против 2,57 [2,1; 2,9] пг/мл, $p = 0,001$).

Таблица 2. Концентрация ФНО- α и ИЛ-1 β в исследованных группах до начала полихимиотерапии (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Table 2. Concentration of TNF- α and IL-1 β in the studied groups before starting chemotherapy (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Показатели Characteristic	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	p-value
ФНО- α , пг/мл TNF- α , pg/mL	8,1 [7,05; 10,05]	8,7 [6,95; 9,8]	0,933
ИЛ-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	26,7 [21,35; 34,0]	25,95 [18,15; 34,6]	0,551

Примечание: ФНО- α – фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β .

Note: TNF- α – tumor necrosis factor- α , IL-1 β – interleukin-1 β .

Таблица 3. Динамика уровней ФНО- α и ИЛ-1 β в исследованных группах (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Table 3. Changes in the levels of TNF- α and IL-1 β in the studied groups (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Показатели	После окончания полихимиотерапии At the end of chemotherapy			Через 12 мес. после окончания полихимиотерапии At 12 months after chemotherapy		
	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	p-value	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	p-value
ФНО- α , пг/мл TNF- α , pg/mL	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-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	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

Примечание: ФНО- α – фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β .

Note: TNF- α – tumor necrosis factor- α , IL-1 β – interleukin-1 β .

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 мес. произошло дальнейшее существенное снижение концентрации ИЛ-1 β в исследованных группах по отношению к уровню после завершения ПХТ. Однако в группе 1 у женщин с развившейся антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью уровень ИЛ-1 β существенно превышал таковой в группе 2 с сохраненной функцией сердца (14,55 [12,15; 16,85] против 8,0 [6,95; 8,7] пг/мл, $p = 0,001$).

По данным ROC-анализа, показатель концентрации ФНО- α до начала лечения опухолевого процесса антрациклинами не обеспечивал достаточную прогностическую значимость для стратификации риска развития антрациклин-индуцированной ХСН в связи с низкой чувствительностью теста – 51,6% и специфичностью – 59,6% (AUC = 0,496; 95% CI = 0,420–0,572; $p = 0,933$).

Пациентки, получавшие антрациклины, у которых уровень ФНО- α был значительно повышен после окончания ПХТ, имели высокий риск развития сердечной патологии в течение 12 мес. наблюдения после введения антрациклинов (рис. 1).

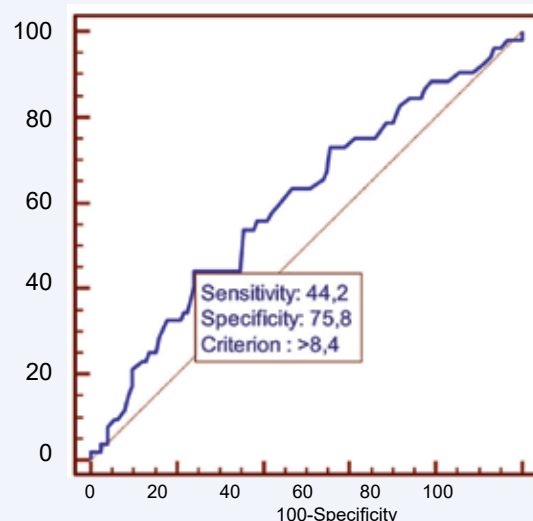


Рис. 1. ROC-анализ определения чувствительности и специфичности значений в крови ФНО- α после завершения полихимиотерапии в прогнозе риска развития антрациклин-индуцированной сердечной недостаточности

Fig. 1. ROC analysis for the determination of sensitivity and specificity of blood TNF- α levels after completion of polychemotherapy in predicting the risk of developing anthracycline-induced heart failure

Уровень ФНО- α более 7,5 пг/мл после завершения курса ПХТ позволил с наибольшей вероятностью (чувствительность – 44,2%, специфичность – 75,8%, AUC = 0,600; 95% CI = 0,524–0,673; p = 0,035) прогнозировать развитие сердечно-сосудистых осложнений у женщин, получавших терапию антрациклинами.

По данным ROC-анализа чувствительности и специфичности, показатель концентрации ИЛ-1 β не обладал прогностической значимостью в отношении риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности до начала лечения опухолевого процесса антрациклинами (чувствительность – 76,9%, специфичность – 37,1%,

AUC = 0,529; 95% CI = 0,452–0,604; p = 0,547), и слабой прогностической значимостью после окончания ПХТ (чувствительность – 76,9%, специфичность – 42,7%, AUC = 0,587; 95% CI = 0,51–10,661; p = 0,067) (рис. 2). Распределение частот встречаемости генотипов полиморфизма –308G/A (rs1800629) гена ФНО- α и полиморфизма +3953 (rs1143634) гена ИЛ-1 β в исследованных группах соответствовало ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга. Проведенное исследование не выявило значимых различий в распределении частот встречаемости генотипов полиморфизмов гена ФНО- α (rs1800629) и гена ИЛ-1 β (rs1143634) в исследованных группах (табл. 4, 5).

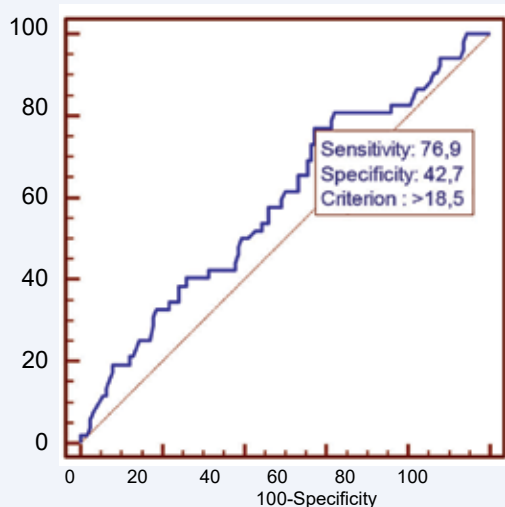


Рис. 2. ROC-анализ определения чувствительности и специфичности значений в крови ИЛ-1 β после завершения полихимиотерапии в прогнозе риска развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности

Fig. 2. ROC analysis for the determination of sensitivity and specificity of blood IL-1 β levels after completion of polychemotherapy in predicting the risk of developing anthracycline-induced heart failure

Таблица 4. Частоты встречаемости генотипов, n (%)

Table 4. The frequency of genotype occurrences, n (%)

Гены Gene	Генотипы Genotypes	Группа 1 Group 1 (n = 52)	Группа 2 Group 2 (n = 124)	χ^2	p -value
ФНО- α (rs1800629) TNF- 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) IL-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: ФНО- α – фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β .

Note: TNF- α tumor necrosis factor- α , IL-1 β Interleukin-1 β .

Таблица 5. Прогностическая значимость генотипов генов ФНО- α и ИЛ-1 β в оценке риска развития антрациклин-индуцированной сердечной недостаточности

Table 5. Prognostic significance of genotypes of TNF- α and IL-1 β genes in assessing the risk of anthracycline-induced heart failure

Гены Gene	Генотипы Genotypes	Отношение шансов Odds Ratio	95% CI	p -value
ФНО- α (rs1800629) TNF- 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) IL-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: ФНО- α – фактор некроза опухоли- α , ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β .

Note: TNF- α – tumor necrosis factor- α , IL-1 β – interleukin-1 β .

Обсуждение

В настоящее время в современной клинической кардиологии не вызывает сомнений участие системы провоспалительных цитокинов в патогенезе поражения миокарда при различных патологических процессах [9].

В основе одной из признанных концепций прогрессирования ХСН лежит представление об иммунной активации и системном воспалении как о важных патофизиологических механизмах высокого кардиоваскулярного риска и неблагоприятного течения патологии. Согласно этой концепции, неспецифическая активация макрофагов и моноцитов, реализующаяся при действии различных этиологических факторов на миокард, является индуктором синтеза провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , интерлейкин-6 и др.), определяющих прогрессирование дисфункции левого желудочка [10].

Негативное кардиотропное действие цитокинов приводит к развитию таких характерных гемодинамических признаков ХСН, как низкий сердечный выброс и высокое внутрисердечное давление, а в комбинации с нарушением сосудодвигательной функции эндотелия резистивных сосудов может явиться причиной гипотонии, свойственной поздним стадиям сердечной недостаточности, а также снижения физической толерантности.

В настоящее время до конца не ясно, является ли основным механизмом развития антрациклин-индуцированного поражения миокарда повышение концентрации в сыворотке провоспалительных цитокинов, и возможно ли однозначно судить о нарушении инотропной функции сердца и прогнозе у пациента, основываясь на концентрации данных биомаркеров.

Интерлейкин 1 (ИЛ-1) – один из основных регуляторных факторов, обладающий не менее 50 различными биологическими функциями, а его мишенями служат клетки практически всех органов и тканей [11]. Интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), входящий в состав семейства ИЛ-1, представляет собой секреторный цитокин, осуществляющий как локальное действие на ткани, так и функционирующий на системном уровне.

Одним из наиболее изученных полиморфизмов гена ИЛ-1 β является полиморфизм в позиции +3953 в 5 экзоне гена (rs1143634). Аллель С (+3953) представляет собой более распространенный вариант в большинстве популяций. Менее часто встречаемый аллель Т ассоциирован с повышенной секрецией ИЛ-1 β [12].

ФНО- α – еще один провоспалительный цитокин, который может играть важную патогенетическую роль в развитии сердечно-сосудистой патологии. Ген ФНО- α расположен в хромосоме 6p21.3. Наибольший интерес исследователей связан с полиморфизмом –308G/A (rs1800629), который локализован в промоторной части гена. Замена гуанидина на аденин в данном случае приводит к повышению экспрессии гена *in vitro*. Носительство аллеля 308А связано с более высоким уровнем ФНО- α по сравнению с гомозиготами по аллелю G [13].

Повышенная концентрация ФНО- α и ИЛ-1 β в нашем исследовании до начала ПХТ была обусловлена, вероятнее всего, высокой активностью опухолевого процесса, при котором активизировалась выработка провоспалительных цитокинов. В динамике наблюдения в группе 1 более высокий уровень ФНО- α и ИЛ-1 β ассоциировался с развитием ХСН через 12 мес. после окончания ПХТ. Антрациклины могут способствовать высвобождению провоспалительных цитокинов путем стимуляции макро-

фагов, которые играют определенную роль в развитии кардиотоксичности [14]. Эти цитокины в основном модулируют апоптоз через рецепторы ФНО, на функцию которых влияет доксорубин [15].

Апоптоз – важный механизм при повреждении миокарда. После внутривенной инъекции доксорубина в течение двух недель световое микроскопическое исследование миокарда крысы обнаружило ядерную фрагментацию и конденсацию хроматина, а также положительные апоптотические клетки. При этом регистрировался фиброз интерстициального пространства миокарда. Такая же картина изменений наблюдалась и в периваскулярной области [16]. Ранняя клеточная смерть и постепенное развитие фиброза миокарда являются основными гистологическими изменениями, которые, в конечном итоге, приводят к систолической и диастолической сердечной дисфункции.

Также показаны некоторые другие молекулярные механизмы кардиотоксичности, в активации которых может иметь значение повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов. Наиболее доказанным механизмом антрациклин-индуцированной кардиотоксичности является повышенная продукция активных форм кислорода (АФК), которые ассоциированы с развитием окислительного стресса [17]. Во время метаболизма антрациклинов неспаренные электроны могут переноситься на молекулы кислорода, вызывая накопление АФК [18]. Генерация супероксидных анионов при метаболизме антрациклинов может приводить к последующим клеточным повреждениям вследствие деградации саркомера, митохондриальной дисфункции и повреждения ДНК [19]. Дополнительным фактором, стимулирующим продукцию АФК, может явиться повышение уровней провоспалительных цитокинов, которые мы наблюдали в нашем исследовании у больных с развившейся антрациклин-индуцированной ХСН.

Накопление токсичных метаболитов ингибирует кальциевые и натриевые насосы в митохондриальной мембране, индуцируя нарушение образования энергии в кардиомиоцитах и, в конечном итоге, развитие систолической дисфункции [20]. Повреждение внутриклеточных молекул активными формами кислорода, токсическими метаболитами антрациклинов, модуляция провоспалительных цитокинов могут привести к смерти кардиомиоцитов [21].

Изменяющийся при дисфункции левого желудочка уровень ФНО- α может стать потенциальным индуктором программируемой гибели кардиомиоцитов. Увеличение концентрации ФНО- α в плазме у пациентов с дисфункцией левого желудочка ведет к повышению содержания его клеточного рецептора и готовности к запуску апоптотического стимула. При этом ФНО- α через повышение реактивных форм кислорода индуцирует ядерные факторы гибели клетки [22].

К ключевым механизмам реализации повреждающего действия цитокинов при терапии антрациклинами и последующему развитию ХСН можно отнести: 1) отрицательное инотропное действие; 2) патологическое ремоделирование сердца, проявляющееся необратимой дилатацией полостей и гипертрофией кардиомиоцитов; 3) развитие дисфункции эндотелия, характеризующееся нарушением эндотелий-зависимой дилатации артериол; 4) усиление процесса апоптоза кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток артериол [9–10].

Согласно результатам нашего исследования, определение высокой концентрации ФНО-α после окончания курса ПХТ является диагностическим предиктором развития кардиотоксического ремоделирования миокарда на фоне лечения антрациклинами. Таким образом, целесообразно включение ФНО-α в панель биомаркеров для прогнозирования развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности.

При этом складывается мнение, что полиморфизмы –308G/A (rs1800629) гена ФНО-α и +3953 (rs1143634) гена ИЛ-1β не взаимосвязаны с выраженностью нарушений внутрисердечной гемодинамики и структурными изменениями левого желудочка при развитии антрациклин-индуцированной ХСН. Вместе с тем для окончательного решения этого сложного вопроса, важного для клинической практики, необходимы более солидные, хорошо спланированные рандомизированные, клинически и молекулярно-генетически контролируемые длительные проспективные исследования.

Выявленные закономерности являются важными для клинической кардиологии, поскольку намечают но-

вые перспективные пути эффективной профилактики, используя в качестве мишеней лекарственных воздействий новые, сравнительно мало изученные факторы риска развития сердечно-сосудистых осложнений при лечении опухолевых заболеваний антрациклинами. Высокая активность ФНО-α и ИЛ-1β отражает патогенетическую роль провоспалительных цитокинов при развитии антрациклин-индуцированной кардиотоксичности. Уровень цитокиновой агрессии не только подтверждает воспалительный механизм развития токсической дисфункции миокарда, но и отражает активность воспалительной реакции по мере прогрессирования заболевания.

Заключение

У больных РМЖ и развившейся антрациклин-индуцированной ХСН через 12 мес. после окончания ПХТ выявляется повышенный уровень ФНО-α и ИЛ-1β, что свидетельствует о патогенетической роли провоспалительных цитокинов в развитии поражения сердца при терапии антрациклинами.

Литература / References

- DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 2014;64(4):252–271. DOI: 10.3322/caac.21235.
- Force T., Kolaja K.L. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2011;10(2):111–126. DOI: 10.1038/nrd3252.
- Васюк Ю.А., Школьник Е.Л., Несветов В.В., Школьник Л.Д., Варлан Г.В. Кардиоонкология: современные аспекты профилактики антрациклиновой кардиотоксичности. *Кардиология.* 2016;56(12):72–79.
- Vasyuk Yu.A., Shkolnik E.L., Nesterov V.V., Shkolnik L.D., Varlan G.V. Cardiooncology: Current aspects of prevention of anthracycline toxicity. *Kardiologiya.* 2016;56(12):72–79 (In Russ.). DOI: 10.18565/cardio.2016.12.72-79.
- Zamorano J.L., Lancellotti P., Munoz D. R., Aboyans V., Asteggiano R., Galderisi M. et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2016;37(36):2768–2801. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw211.
- Almuwaqqat Z., Meisel J.L., Barac A., Parashar S. Breast cancer and heart failure. *Heart Fail. Clin.* 2019;15(1):65–75. DOI: 10.1016/j.hfc.2018.08.007.
- Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н. и др. Состояние сердечно-сосудистой системы у больных с антрациклиновой кардиомиопатией. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017;16(3):127–136.
- Teplakov A.T., Shilov S.N., Popova A.A., Grakova E.V., Berzikova E.N., Neupokoeva M.N. et al. The cardiovascular system in patients with anthracycline cardiomyopathy. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017;16(3):127–136 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-127-136.
- Siegel R., DeSantis C., Virgo K., Stein K., Mariotto A., Smith T. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 2012;62(4):220–241. DOI: 10.3322/caac.21149.
- Ning Y., Shen Q., Herrick K., Mikkelsen R., Anscher M., Houlihan R. et al. Abstract LB-39: Cause of death in cancer survivors. *Cancer Research.* 2012;72(8):LB-339-LB-339. DOI:10.1158/1538-7445.AM2012-LB-339.
- Yndestad A., Damas J.K., Oie E., Ueland T., Gullestad L., Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr. Cardiol. Rep.* 2007;9(3):236–241. DOI: 10.1007/bf02938356.
- Von Haehling S., Jankowska E.A., Anker S.D. Tumor necrosis factor-α and the failing heart: Pathophysiology and therapeutic implications. *Basic Res. Cardiol.* 2004;99(1):18–28. DOI: 10.1007/s00395-003-0433-8.
- Mantovani A., Dinarello C.A., Molgora M., Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immun.* 2019;50(4):778–795. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.
- Latkovskis G., Licis N., Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Immunogenet.* 2004;31(5):207–213. DOI: 10.1111/j.1365-2370.2004.00476.x.
- Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., McDevitt H.O., Duff G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *PNAS.* 1997;94(7):3195–3199. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3195.
- Schubert C., Hong S., Natarajan L., Mills P.J., Dimsdale J.E. The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: A quantitative review. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2007;21(4):413–427. DOI: 10.1016/j.bbi.2006.11.004.
- Chiosi E., Spina A., Sorrentino A., Romano M., Sorvillo L., Senatore G. et al. Change in TNF-α receptor expression is a relevant event in doxorubicin-induced H9c2 cardiomyocyte cell death. *J. Interferon Cytokine Res.* 2007;27(7):589–597. DOI: 10.1089/jir.2006.0161.
- Chung W.B., Youn H.J. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Korean J. Intern. Med.* 2016;31(4):625–633. DOI: 10.3904/kjim.2016.017.
- Rochette L., Guenancia C., Gudjoncik A., Hachet O., Zeller M., Cottin Y. et al. Anthracyclines/trastuzumab: New aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015;36(6):326–348. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.005.
- Salazar-Mendiguchía J., González-Costello J., Roca J., Ariza-Sole A., Manito N., Cequier A. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: Basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch. Cardiol. Mex.* 2014;84(3):218–223. DOI: 10.1016/j.acmx.2013.08.006.
- L'Ecuyer T., Sanjeev S., Thomas R., Novak R., Das L., Campbell W. et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006;291(3):1273–1280. DOI: 10.1152/ajpheart.00738.2005.
- Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012;52(6):1213–1225. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006.
- Levkau B., Schäfers M., Wohlschlaeger J., von Wnuck Lipinski K., Keul P., Hermann S. et al. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation.* 2008;117(12):1583–1593. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734160.
- Adamopoulos S., Parissis J.T., Georgiadis M., Karatzas D., Paraskevaidis J., Kroupis C. Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 2002;144(2):359–364. DOI: 10.1067/mhj.2002.124052.

Информация о вкладе авторов

Тепляков А.Т. – разработка концепции и дизайна исследования, координация выполнения исследования, окончательное утверждение содержания рукописи для публикации.

Шилов С.Н. – разработка концепции и дизайна исследования, координация выполнения исследования, написание текста статьи, окончательное утверждение содержания рукописи для публикации.

Попова А.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение содержания рукописи для публикации.

Березикова Е.Н. – проверка критически важного интеллектуального содержания, координация выполнения исследования.

Гракова Е.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение содержания рукописи для публикации.

Неупокоева М.Н. – ведение пациентов, получение и интерпретация данных, составление базы данных, статистическая обработка, написание текста статьи.

Копьева К.В. – интерпретация данных, статистическая обработка.

Ратушняк Е.Т. – ведение пациентов, работа с образцами крови, составление базы данных.

Степачев Е.И. – ведение пациентов, работа с образцами крови, составление базы данных.

Сведения об авторах

Тепляков Александр Трофимович, д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-0721-0038.

E-mail: vgelen1970@gmail.ru.

Шилов Сергей Николаевич, д-р мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-7777-6419.

E-mail: newsib54@gmail.com.

Попова Анна Александровна, д-р мед. наук, заведующий кафедрой поликлинической терапии и общей врачебной практики, Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-2645-162X.

E-mail: ann24@ngs.ru.

Березикова Екатерина Николаевна, д-р мед. наук, доцент кафедры поликлинической терапии и общей врачебной практики, Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-9630-0213.

E-mail: berzikova@ngs.ru.

Гракова Елена Викторовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, отделение патологии миокарда, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-4019-3735.

E-mail: gev@cardio-tomsk.ru.

Неупокоева Мария Николаевна, ассистент, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3102-8156.

E-mail: maria.neupokoeva@mail.ru.

Копьева Кристина Васильевна, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, отделение патологии миокарда, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-2285-6438.

E-mail: kristin-kop@inbox.ru.

Ратушняк Елена Таировна, врач по спортивной медицине, Государственный Новосибирский областной врачебно-физкультурный диспансер. ORCID 0000-0002-4223-3457.

E-mail: lalala777elena@yandex.ru.

Степачев Егор Игоревич, студент лечебного факультета, Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-8387-195X.

E-mail: stepachev.egor@yandex.ru.

Шилов Сергей Николаевич, e-mail: newsib54@gmail.com.

Information on author contributions

Teplyakov A.T. – development of study concept and design, study coordination, and final approval of the manuscript for publication.

Shilov S.N. – development of study concept and design, study coordination, writing the text of the article, and final approval of the manuscript for publication.

Popova A.A. – revision of essential intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Berezikova E.N. – revision of essential intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Grakova E.V. – revision of essential intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Neupokoeva M.N. – management of patients, data collection and interpretation, database maintenance, statistical processing of data, and writing the text of the article.

Kopeva K.V. – interpretation and statistical processing of data.

Ratushnyak E.T. – management of patients, blood sample processing, and contribution to database maintenance.

Stepachev E.I. – management of patients, blood sample processing, and contribution to database maintenance.

Information about the authors

Alexander T. Teplyakov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Research Scientist, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-0721-0038.

E-mail: vgelen1970@gmail.ru.

Sergey N. Shilov, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Physiology and Clinical Pathophysiology, Novosibirsk State Medical University. ORCID 0000-0002-7777-6419.

E-mail: newsib54@gmail.com.

Anna A. Popova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Polyclinic Therapy and General Medical Practice, Novosibirsk State Medical University. ORCID 0000-0003-2645-162X.

E-mail: ann24@ngs.ru.

Ekaterina N. Berezikova, Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, Department of Polyclinic Therapy and General Medical Practice, Novosibirsk State Medical University. ORCID 0000-0002-9630-0213.

E-mail: berzikova@ngs.ru.

Elena V. Grakova, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-4019-3735.

E-mail: gev@cardio-tomsk.ru.

Maria N. Neupokoeva, Assistant Professor, Department of Polyclinic Therapy and General Medical Practice, Novosibirsk State Medical University. ORCID 0000-0003-3102-8156.

E-mail: maria.neupokoeva@mail.ru.

Kristina V. Kopeva, Cand. Sci. (Med.), Junior Research Scientist, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-2285-6438.

E-mail: kristin-kop@inbox.ru.

Elena T. Ratushnyak, Sports Medicine Doctor, State Novosibirsk Regional Medical and Physical Education Dispensary. ORCID 0000-0002-4223-3457.

E-mail: lalala777elena@yandex.ru.

Egor I. Stepachev, Student, Faculty of Medicine, Novosibirsk State Medical University. ORCID 0000-0001-8387-195X.

E-mail: stepachev.egor@yandex.ru.

Sergey N. Shilov, e-mail: newsib54@gmail.com.

Received April 16, 2020

Поступила 16.04.2020