

## Биохимические критерии токсичности терапии высокими дозами метотрексата у детей с остеосаркомой

А. М. Стрижевская<sup>1</sup>, Е. Г. Головня<sup>1</sup>, А. З. Дзямпаев<sup>2</sup>, В. Н. Байкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Централизованный клинико-лабораторный отдел НИИ клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;

<sup>2</sup>отделение опорно-двигательного аппарата НИИ детской онкологии и гематологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

**Контакты:** Александра Михайловна Стрижевская Strizhevsky@yandex.ru

Метотрексат (Mtx) – цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. Высокие дозы (ВД) Mtx в детской онкологии применяются для лечения остеосаркомы (ОС) и других типов опухолей и позволяют достичь 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 %. Однако высокая токсичность Mtx является серьезным ограничением в достижении максимального лечебного действия и в большинстве случаев обуславливает возникновение у больных серьезных побочных эффектов со стороны различных органов и систем. Лечение должно проводиться под строгим контролем лабораторных исследований, в первую очередь терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ), концентрации Mtx в сыворотке крови и других биохимических показателей.

Обследовано 246 детей (125 мальчиков и 121 девочка) в возрасте от 5 до 16 лет с ОС (средний возраст 12,2 года), которые находились на лечении в НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» с 2006 по 2013 г. Больным было проведено от 1 до 8 курсов ВД Mtx – 8 или 12 г/м<sup>2</sup> за 4 ч инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно через каждые 6 ч, начиная с 24 ч от начала инфузии Mtx. Проведено 1137 курсов ТЛМ Mtx методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа на анализаторе TDX/Fx (Abbott, США). Отработана методика мониторинга гомоцистеина (Hcy) в сыворотке крови на анализаторе Vitros 5/IFS (Johnson & Johnson, США) в течение всего курса ВД Mtx. В группах рассчитаны фармакокинетические показатели Mtx: площадь под фармакокинетической кривой (MtxAUC), клиренс Mtx (Cl<sub>Mtx</sub>), период полувыведения (T<sub>1/2</sub>) и общее время выведения (T<sub>total</sub>).

При 1050 курсах ВД Mtx выведение Mtx было нормальным и соответствовало следующим значениям: через 4 ч – 1109 ± 283 мкмоль/л; через 24 ч – 4,67 ± 0,95 мкмоль/л; через 42 ч – 0,38 ± 0,16 мкмоль/л; через 48 ч – менее 0,23 ± 0,04 мкмоль/л; через 72 ч – 0,07 ± 0,03 мкмоль/л; через 96 ч – 0,03 ± 0,01 мкмоль/л. Замедленное выведение Mtx выявлено при 87 курсах, что составляет 7,6 % от всех курсов. По всем измеряемым параметрам: концентрации выведения Mtx по часам, T<sub>total</sub><sup>MtxAUC</sup>, Cl<sub>Mtx</sub>, T<sub>1/2</sub> – получены статистически достоверные различия между нормальным и замедленным выведением Mtx. Для пациентов группы замедленного выведения было характерно развитие гепатотоксичности, также наблюдались 4 случая возникновения острой почечной недостаточности. Проведение мониторинга биохимических показателей (аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы) также позволило выявить различия между двумя группами – гепатотоксичность непосредственно зависела от MtxAUC, Cl<sub>Mtx</sub> и T<sub>total</sub>, причем амплитуда изменения активностей ферментов от курса к курсу уменьшалась.

Отработанная нами методика мониторинга Hcy в сыворотке крови в течение курса ВД Mtx позволила выявить, что Hcy метаболически взаимосвязан с Mtx – чем выше концентрация Mtx, тем большее количество Hcy выбрасывается в кровь. Hcy может служить маркером эффективности подавления трансформации фолатов. При замедленном выведении Mtx уровень Hcy значительно повышается в крови. Это также свидетельствует о том, что он может служить маркером фармакодинамического воздействия ВД Mtx.

**Ключевые слова:** дети, высокие дозы метотрексата, остеосаркомы, терапевтический лекарственный мониторинг, токсикокинетика, фармакокинетика, гомоцистеин

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.082–089

### Biochemical criteria of toxicity of therapy with high doses of methotrexate in children with osteosarcoma

A. M. Strizhevskaya<sup>1</sup>, E. G. Golovnya<sup>1</sup>, A. Z. Dzampaev<sup>2</sup>, V. N. Baykova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centralized Clinical and Laboratory Department, Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 23 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup>Department of Musculoskeletal System, Research Institute of Children Hematology and Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 23 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

Methotrexate (Mtx) is a cytotoxic drug from the group of antimetabolites, folic acid antagonists. High-dose (HD) Mtx in pediatric oncology are used for the treatment of osteosarcoma (OS), and other types of tumors. This therapy has allowed to achieve a five-year relapse-free survival rates up to 80 % in patients with OS. However, the high toxicity of Mtx is a serious constraint in achieving the maximum therapeutic effect, which in most cases poses the occurrence of side effects in patients on various organs and systems. Treatment should be under strict laboratory monitoring, primarily therapeutic drug monitoring the concentration of Mtx in serum.

246 children (boys – 125, girls – 121) aged 5 to 16 years with osteosarcoma (mean age 12.2 years) who were treated in N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center from 2006 to 2013. Patients were conducted from 1 to 8 courses HD Mtx at a dose of 8 or 12 g/m<sup>2</sup>, administered within 4 h of infusion on the background of alkaline prehydrate. Leucovorin was administered intravenously, every 6 hours, starting 24 h from the start of the Mtx infusion. 1137 courses of HD Mtx were conducted with FPIA method (analyzer TDx/Flx, Abbott, USA). The technique of monitoring of homocysteine (Hcy) in the blood serum by analyzer Vitros 5/IFS (Johnson & Johnson, USA) during the entire course of high-dose Mtx was tested. In groups calculated pharmacokinetic parameters Mtx were tested: area under the pharmacokinetic curve ( $MtxAUC$ ), clearance of methotrexate ( $Cl_{Mtx}$ ), the elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) and the total time of excretion ( $T_{total}$ ). Normal excretion of Mtx was revealed at 1050 courses Mtx, corresponding to the following values: 4 h –  $1109 \pm 283 \mu\text{mol/l}$ ; 24 h –  $4,67 \pm 0,95 \mu\text{mol/l}$ ; 42 h –  $0,38 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$ ; 48 h – less than  $0,23 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$ ; 72 h of  $0,07 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$ ; 96 h of  $0,03 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ . At 87 courses identified delayed Mtx excretion, accounting for 7.6 % of all courses. In all measured parameters: hourly concentration of Mtx,  $T_{total}^{MtxAUC}$ ,  $Cl_{Mtx}$ ,  $T_{1/2}$ , is obtained statistically significant differences between normal and delayed Mtx excretion. Patients in group of delayed excretion of methotrexate were characterized by the development of hepatotoxicity, there were also observed 4 cases of the occurrence of acute renal failure.

Monitoring of biochemical parameters (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase) also revealed differences between the two groups – hepatotoxicity directly depended on  $MtxAUC$ ,  $Cl_{Mtx}$  and  $T_{total}$  and the amplitude changes in activities of enzymes from course to course by increasing the number of course decreased.

Our developed methodology of monitoring of Hcy in serum during the course of HD Mtx revealed that Hcy metabolic interconnected with Mtx – the higher the concentration of Mtx, the greater the amount of Hcy released into the blood. Hcy has a close metabolic relationship with Mtx – it can serve as a marker of the efficiency of suppression of the transformation of folates. During slow excretion of Mtx Hcy significantly increased in the blood, which also suggests that it can serve as a marker of pharmacodynamic effects of HD Mtx.

**Key words:** children, high-dose methotrexate, cancer, therapeutic drug monitoring, toxicokinetics, toxicity, homocysteine

## Введение

Современный подход к лечению онкологических больных требует индивидуализации терапии. Каждый случай должен рассматриваться с точки зрения не только общего протокола, но и личных физиологических особенностей пациента. Только такой подход может привести к улучшению качества лечения, уменьшению побочных эффектов при химиотерапии и хирургических вмешательствах и в конечном итоге улучшить выживаемость пациентов.

Одним из самых современных направлений в области клинической биохимии и индивидуализации терапии онкобольных является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). Он основан на определении концентрации лекарственных препаратов, их метаболитов или других биологически активных веществ в плазме крови или других тканях организма в различные промежутки времени после введения в целях установления соответствия ее терапевтическому диапазону и выработки рекомендаций по коррекции режима дозирования [1]. Таким образом, иначе ТЛМ можно назвать фармакокинетическим мониторингом. Цели ТЛМ – определение правильного режима и дозировки лекарства; выявление наиболее эффективной его концентрации для достижения успешного лечения; предупреждение развития токсических эффектов; контроль происходящих изменений в каждый период лечения с возможностью менять дозировку препаратов в зависимости от состояния пациентов; изучение взаимозависимости различных факторов при назначенной терапии [2]. В связи с вышесказанным дети, страдающие злокачественными опухолями и получающие химиотерапевтическое лечение, особенно нуждаются в ТЛМ.

Также существует фармакодинамический ТЛМ, который используется в тех случаях, когда регистри-

ровать непосредственно эффект препарата, как токсический, так и терапевтический, невозможно [3]. При этом измеряют косвенные показатели – биомаркеры. Именно поэтому, в связи с возросшей потребностью в индивидуализации терапии, сейчас так необходим поиск новых биохимических маркеров токсичности и эффективности лечения [4].

Высокие дозы (ВД) метотрексата (Mtx) в детской онкологии применяются для лечения остеосаркомы (ОС), острого лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы и других типов опухолей. У пациентов с ОС это позволяет достичь 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 % [5]. Однако проблема высокой экстра- и интраиндивидуальной изменчивости в фармакокинетике Mtx остается нерешенной [6]. В 10 % случаев наблюдается угрожающее жизни замедленное выведение Mtx, которое индуцирует Mtx-гепатотоксичность, острую почечную недостаточность, вызываемую преципитацией Mtx на эпителии почечных канальцев [7, 8]. Лечение должно проводиться под строгим контролем лабораторных исследований, в первую очередь мониторинга концентрации самого препарата. Характер и время проявления побочных реакций, а также скорость их устранения зависят не только от дозы Mtx, его концентрации и длительности пребывания в организме, но и от состояния ферментных систем организма, функциональной полноценности выделительных органов [9].

Используемые в настоящее время лабораторные показатели – аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – не являются специфичными для ВД Mtx, реагируют и на другие виды химиотерапии, не всегда и не полностью отвечают на введение Mtx. Оценка воздействия ВД Mtx на организм ребенка требует серьезного теорети-

ческого анализа и исследования с помощью новых биохимических маркеров, которые могли бы предсказать токсичность Мtx ранее других биохимических показателей. Для возможности оценки как степени эффективности подавления Мtx образования фолатов (рис. 1), так и степени токсичности Мtx уже давно предложен фармакодинамический маркер – уровень содержания аминокислоты гомоцистеина (Нсу), который является интермедиальным метаболитом в обмене фолатов [10–12].

Нсу – природная серосодержащая аминокислота, не встречающаяся в белках. Нсу не поступает в организм с пищей, являясь продуктом трансметилирования – в каскаде реакций он образуется из метионина (Met), алифатической серосодержащей аминокислоты, а затем при участии тетрагидрофолата превращается обратно в Met. В плазме крови свободный (восстановленный) Нсу присутствует в небольших количествах (1–2 %). Примерно 20 % находится в окисленном состоянии, преимущественно в виде смешанного дисульфида цистеинил-Нсу и Нсу. Около 80 % Нсу связывается с белками плазмы крови, в основном с альбумином, образуя дисульфидную связь с цистеином [13, 14].

Несмотря на то, что Нсу впервые описали еще в 1932 г., основные публикации о связи его повышенного содержания с патологическими состояниями человека (сердечно-сосудистыми заболеваниями, патологиями беременности) появились только в последние десятилетия. Тогда же стали проводиться популя-

ционные исследования, связанные с гипергомоцистеинемией [15].

Мtx ингибирует образование тетрагидрофолата, ингибируя фермент дигидрофолатредуктазу [11, 12]. Дигидрофолат не восстанавливается в тетрагидрофолат, который необходим для превращения Нсу в Met (см. рис. 1). Поэтому накопление Нсу при введении ВД Мtx – биохимическая основа отражения степени подавления синтеза фолатов [16].

В международном опыте отмечено лишь несколько исследований, посвященных определению концентрации Нсу во время терапии ВД Мtx различных опухолей, однако в России они ранее не проводились [17].

### Материалы и методы

В настоящую исследовательскую работу были включены данные о 246 детях в возрасте от 5 до 16 лет (средний возраст 12,2 года) с ОС, которые находились на лечении в НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» с 2006 по 2013 г. Они получали лечение согласно протоколу комплексной химиотерапии ОС (ОС-2006), разработанному и утвержденному в НИИ ДОГ. Соотношение пациентов по полу составило 1,03:1 (мальчиков – 125, девочек – 121). Всего проведено 1137 курсов терапии ВД Мtx. Больным проводилось от 1 до 8 курсов терапии ВД Мtx – 8 или 12 г/м<sup>2</sup> за 4 ч инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно через каждые 6 ч, начиная с 24 ч от начала инфузии Мtx. При такой скорости выведения Мtx и применяемой схеме лечения вероятность развития побочных эффектов считается минимальной.

Кровь из вены забиралась в сроки 0; 4; 24; 42; 48; 72 ч и далее до полного выведения Мtx, в вакуумные пробирки марки Sarstedt, тип Monovette® объемом 7,5 мл. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах на центрифуге Elmi СМ-6М.

Определение Мtx проводили методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа (ФПИА) на анализаторе Tdx/Flx (Abbott, США). ФПИА – гомогенный конкурентный метод иммунного анализа, основанный на двух принципах: конкурентного связывания белков и флуоресцентной поляризации. Рассчитаны фармакокинетические показатели Мtx: площадь под фармакокинетической кривой ( $M_{tx}AUC$ ), клиренс ( $Cl_{Mtx}$ ), период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и общее время выведения ( $T_{total}$ ).

Определение Нсу проводили в те же сроки наблюдения на анализаторе VITROS 5.1FS (Ortho Clinical Diagnostics, США). Нормальное содержание Нсу в сыворотке здоровых детей составляло  $5,1 \pm 1,5$  мкмоль/л.

Определение биохимических показателей (АЛТ, АСТ, ЛДГ) проводили на автоматическом анализаторе Pentra 400 (Horiba ABX, Франция) с диапазоном длин волн от 190 до 1100 нм. В качестве биохимических критериев использовали пороговые значения АЛТ < 40 Ед/л, АСТ < 38 Ед/л, ЛДГ 226–451 Ед/л, установленные в группе практически здоровых детей.

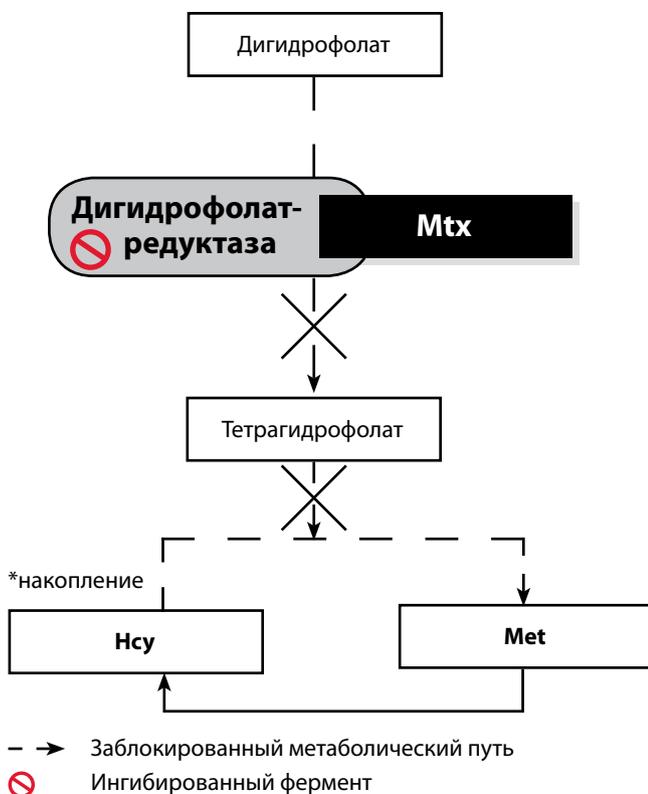


Рис. 1. Метаболизм Нсу в условиях терапии ВД Мtx

Для статистической обработки результатов исследования использовались процедуры математической статистики, реализованные в программе SPSS 11.0 for Windows, Origin 6.1, MS Excel 2007. Расчет фармакокинетических параметров ( $MtxAUC$ ,  $Cl_{Mtx}$ ) проводился с помощью программы MedCalc 11.6.10. Определение биокинетических параметров восстановления показателей гепатотоксичности осуществляли в программе Origin 40.

### Результаты и обсуждение

При обработке данных ТЛМ по определению концентрации Mtx при 1050 курсах ВД Mtx она соответствовала следующим значениям: на сроке 4 ч –  $1109 \pm 283$  мкмоль/л; 24 ч –  $4,67 \pm 0,95$  мкмоль/л; 42 ч –  $0,38 \pm 0,16$  мкмоль/л; 48 ч – менее  $0,23 \pm 0,04$  мкмоль/л; 72 ч –  $0,07 \pm 0,03$  мкмоль/л; 96 ч –  $0,03 \pm 0,01$  мкмоль/л. Эти пациенты были отнесены к группе с нормальным выведением Mtx (табл. 1).

К 4 ч достигалась максимальная концентрация Mtx, затем она прогрессивно снижалась и к 24 ч составила  $4,67 \pm 0,95$  мкмоль/л. Через 24 ч начиналось введение антидота Mtx – лейковорина, который обеспечивает защиту клеток от токсического воздействия Mtx. Полное выведение Mtx в неосложненных случаях занимает  $96 \pm 24$  ч (рис. 2).

Как следует из табл. 1, выявлено два типа фармакокинетики Mtx – **нормальное и замедленное выведение**, различия между группами статистически достоверны. Для нормального выведения  $T_{1/2}$  составляет  $7,7 \pm 0,7$  ч;  $MtxAUC$  –  $11791 \pm 500$  мкмоль/л $^{-1} \times$  ч $^{-1}$ .  $MtxAUC$  характеризует общее количество воздействовавшего на организм препарата и время контакта с ним.

Вторую группу представляли пациенты с замедленным выведением Mtx (рис. 2, см. табл. 1), у которых было отмечено статистически значимое повышение концентрации Mtx в среднем на каждом из временных

промежутков ТЛМ, увеличение  $T_{total}$  (до 360 ч),  $T_{1/2}$  и  $MtxAUC$ , а также снижение  $Cl_{Mtx}$ . Замедленное выведение выявлено при 87 курсах введения ВД Mtx, что составило 7,6 % от всех исследуемых курсов. По всем измеряемым параметрам: концентрации выведения Mtx по часам,  $T_{total}$ ,  $MtxAUC$ ,  $Cl_{Mtx}$ ,  $T_{1/2}$  – получены статистически достоверные различия между нормальным и замедленным выведением Mtx. Для пациентов с замедленным выведением Mtx было характерно развитие тяжелой гепатотоксичности, а в 4 случаях наблюдалась также острая почечная недостаточность.

Таблица 1. Фармакокинетические характеристики Mtx при применении его в ВД для лечения ОС

| Параметр                                     | Нормальное выведение | Замедленное выведение |                   |
|--|----------------------|-----------------------|-------------------|
| Доза, г/м <sup>2</sup>                       | 8; 12                | 8; 12                 |                   |
| Площадь поверхности тела, м <sup>2</sup>     | $1,58 \pm 0,21$      | $1,57 \pm 0,22$       |                   |
| Общая средняя доза, г                        | $18,96 \pm 5,2$      | $19,96 \pm 6,2$       |                   |
| Концентрация Mtx в крови, мкмоль/л           | 4 ч                  | $1109 \pm 283^*$      | $1830 \pm 450^*$  |
|  | 24 ч                 | $4,67 \pm 0,95^*$     | $61,2 \pm 53,6^*$ |
|  | 42 ч                 | $0,38 \pm 0,16^*$     | $15,3 \pm 14,3^*$ |
|  | 48 ч                 | $0,23 \pm 0,04^*$     | $7,2 \pm 5,7^*$   |
|  | 72 ч                 | $0,07 \pm 0,03^*$     | $4,3 \pm 4,1^*$   |
|  | 96 ч                 | $0,03 \pm 0,01^*$     | $4,3 \pm 4,2^*$   |
| $T_{total}$ , ч                              | $96 \pm 24^*$        | $208 \pm 120^*$       |                   |
| $MtxAUC$ , мкмоль/л $^{-1} \times$ ч $^{-1}$ | $11791 \pm 500$      | $16611 \pm 10231$     |                   |
| $Cl_{Mtx}$ , л $\times$ ч $^{-1}$            | $3,7 \pm 1,3$        | $2,5 \pm 1,5$         |                   |
| $T_{1/2}$ , ч                                | $7,7 \pm 0,7^*$      | $11,5 \pm 10,7^*$     |                   |

Примечание. \* – статистическая достоверность между группами ( $p < 0,05$ ).

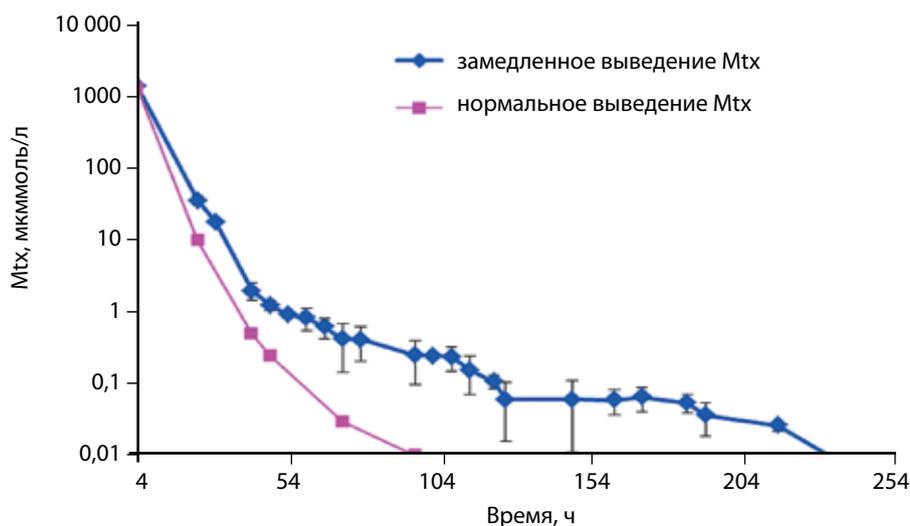


Рис. 2. Кривые выведения Mtx у пациентов с нормальным и замедленным его выведением

Проведение мониторинга биохимических показателей позволило выявить следующие особенности. При нормальном выведении Мtx к 24 ч от начала терапии наблюдалось увеличение активности АЛТ до 500 Ед/л. С этого момента активность АЛТ снижалась, к 96 ч значения достигали в среднем  $210,1 \pm 105,4$  Ед/л, т. е. восстанавливались, но не во всех случаях. Аналогично развивалось изменение активностей АСТ и ЛДГ. У пациентов с замедленным выведением Мtx к 24 ч уровень АЛТ достигал в среднем 1581 Ед/л, т. е. превышал норму в десятки раз. Даже к моменту полного выведения Мtx уровень ферментов оставался в 2,5–7,5 раза выше нормы и возвращался к ней в среднем к 12–13-м суткам. Аналогичная ситуация складывалась и для АСТ и ЛДГ. Гепатотоксичность в данном случае зависит от концентрации лекарственного препарата в плазме и времени его экспозиции. На рис. 3 представлены кривые изменения активности АЛТ при нормальном и замедленном выведении Мtx.

Нами проведен анализ средних уровней АЛТ, АСТ и ЛДГ в зависимости от порядкового номера курса терапии и времени относительно введения препарата (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют, что степень изменения активности ферментов после введения Мtx при увеличении номера курса уменьшается.

Для АЛТ на более поздних курсах активность фермента приближается к состоянию до введения на 4-й день, а на первых курсах на 4-й день превышает начальный уровень в несколько раз. Для ЛДГ объем выброса фермента в кровь максимальный на 1-м курсе лечения и в дальнейшем держится на уровне 3/4 от максимума 1-го курса. Содержание ЛДГ до вве-

дения токсического агента также остается на одном уровне.

Определены корреляции между активностью ферментов и концентрацией Мtx. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Корреляционная зависимость между концентрацией Мtx и показателями гепатотоксичности

| Группа                    | Коэффициент корреляции |         |         |
|---------------------------|------------------------|---------|---------|
|                           | Мtx:АЛТ                | Мtx:АСТ | Мtx:ЛДГ |
| Нормальное выведение Мtx  | 0,73                   | 0,94    | 0,96    |
| Замедленное выведение Мtx | 0,79                   | 0,88    | 0,86    |

Таким образом, активность АЛТ, АСТ и ЛДГ изменяется в связи с введением Мtx, однако с каждым последующим курсом достоверность этих показателей уменьшается. К тому же они не являются специфическими, отражая нарушение функционирования гепатоцитов в целом, которое, в свою очередь, может быть вызвано предыдущим лечением или другими факторами, не относящимися к терапии ВД Мtx.

Современный подход к лечению онкологических больных и индивидуализации терапии требует поиска более точных маркеров, позволяющих оценивать как токсичность терапии, так и ее эффективность. Этому и способствует определение Нсу при терапии ВД Мtx.

Как следует из табл. 3 и рис. 5, у всех включенных в исследование пациентов с нормальным выведением Мtx уровень Нсу на начало терапии соответствовал возрастной норме —  $5,4 \pm 1,45$  мкмоль/л. К окон-

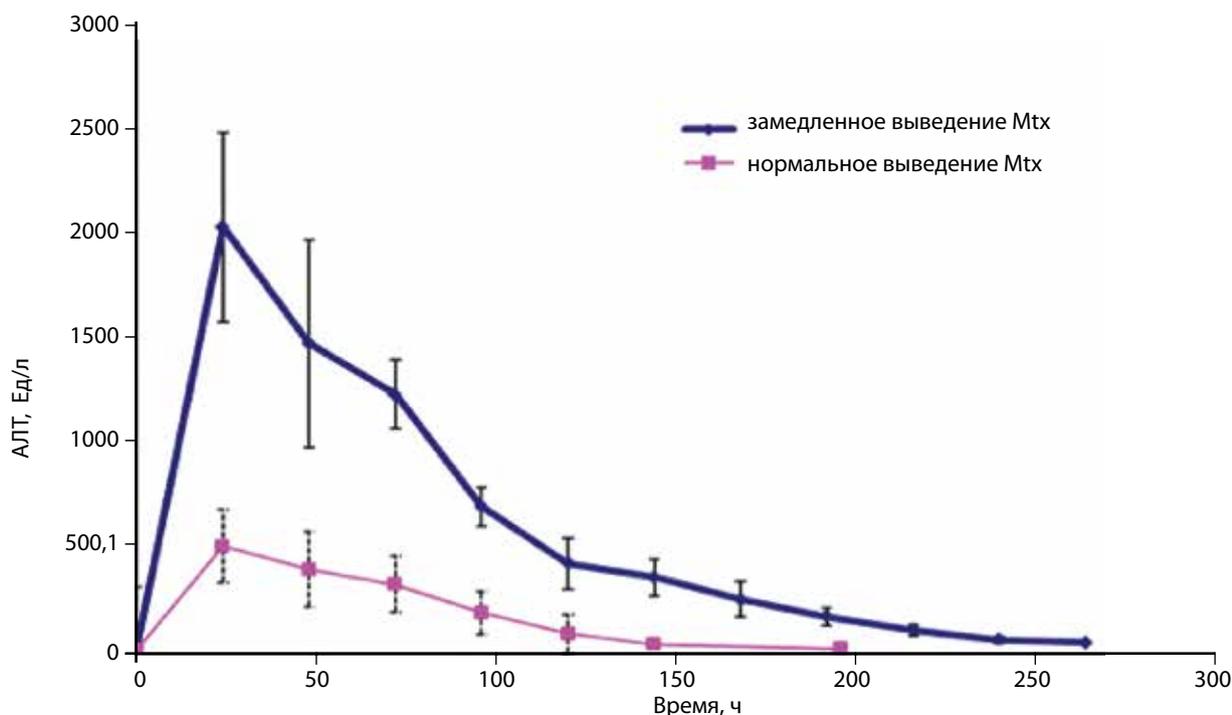


Рис. 3. Изменение активности АЛТ при нормальном и замедленном выведении Мtx

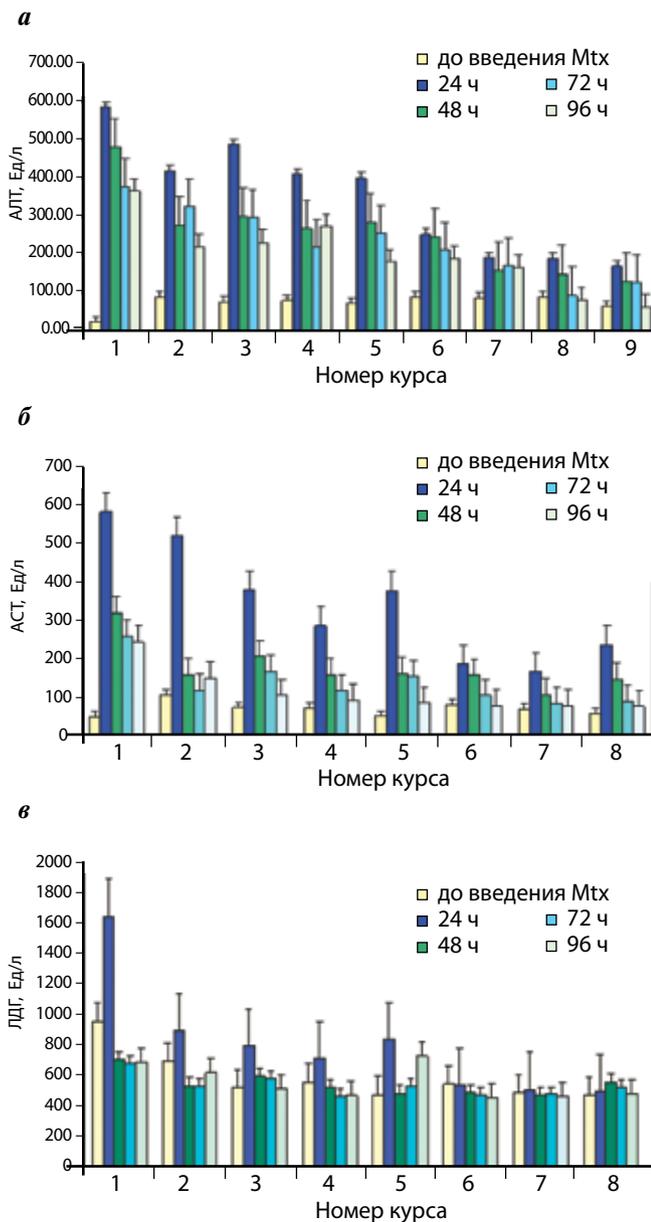


Рис. 4. Изменение активности АЛТ (а), АСТ (б) и ЛДГ (в) по средним значениям концентрации в зависимости от курса ВД Мtx

чанию 4-часовой инфузии Мtx концентрация сывороточного Нсу быстро возростала с  $5,4 \pm 1,5$  до  $9,5 \pm 3,2$  мкмоль/л.

После окончания инфузии Мtx концентрация Нсу продолжала возрастать, в среднем к началу 24-го часа

достигала значений  $15,6 \pm 5,5$  мкмоль/л. После начала введения лейковорина на сроке 24 ч концентрация Нсу начинала снижаться (см. рис. 5). К 42 ч она была равна в среднем  $11,6 \pm 3,4$  мкмоль/л, к 48 ч –  $8,8 \pm 3,2$  мкмоль/л. К 96 ч концентрация Нсу достигала значений  $4,7 \pm 1,2$  мкмоль/л, т.е. становилась ниже концентрации до начала терапии в среднем на  $1,5$  мкмоль/л.

На рис. 5 представлен график изменения концентрации Нсу у пациентов с замедленным выведением Мtx. У них были выявлены следующие особенности. Концентрация Нсу возрастала больше, чем у больных с нормальным выведением Мtx, за первые 24 ч достигая значения  $24,7 \pm 10$  мкмоль/л. После введения лейковорина на сроке 24 ч снижение концентрации Нсу не наступало, она продолжала расти и к 42 ч достигала в среднем значений  $20,5 \pm 5,1$  мкмоль/л. После 42 ч концентрация Нсу постепенно снижалась, однако для ее восстановления требовалось гораздо больше времени, чем при нормальном выведении Мtx. Различие в концентрации Нсу между нормальным и замедленным выведением статистически достоверно ( $p < 0,034$ ).

При анализе данных об изменении концентрации Нсу с 1-го по 8-й курс терапии ВД Мtx был выявлен ряд особенностей. Наиболее выраженный ответ, характеризующийся повышением концентрации Нсу, наблюдался в течение 1-го курса у первичных пациентов – концентрация Нсу к 24 ч достигала в среднем

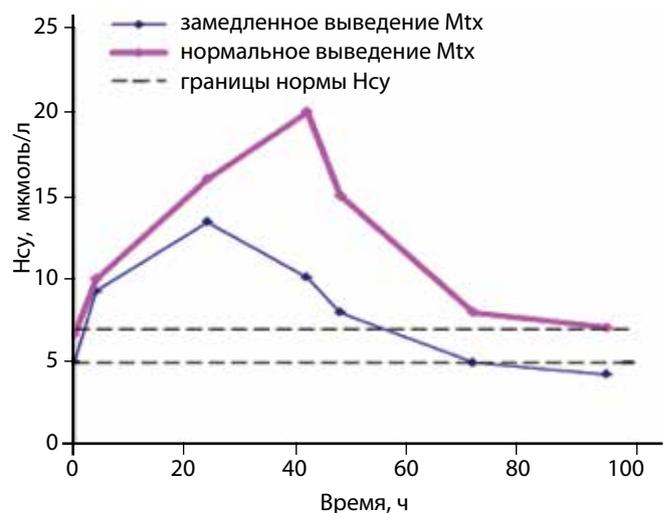


Рис. 5. Изменение концентрации Нсу в крови пациентов при терапии ВД Мtx в случае нормального и замедленного выведения Мtx

Таблица 3. Концентрации Нсу в крови пациентов от 0 до 96 ч после введения ВД Мtx

| Группа                    | Концентрация Нсу, мкмоль/л |                |                |                  |                  |                 |                 |
|---------------------------|----------------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|                           | 0 ч                        | 4 ч            | 24 ч           | 42 ч             | 48 ч             | 72 ч            | 96 ч            |
| Нормальное выведение Мtx  | $5,4 \pm 1,5$              | $9,5 \pm 3,2$  | $15,6 \pm 5,5$ | $11,6 \pm 3,4^*$ | $8,8 \pm 3,2^*$  | $5,9 \pm 1,3^*$ | $4,7 \pm 1,3^*$ |
| Замедленное выведение Мtx | $6,7 \pm 2,5$              | $10,2 \pm 4,4$ | $16,1 \pm 3,8$ | $20,5 \pm 4,1^*$ | $15,4 \pm 3,2^*$ | $8,3 \pm 2,1^*$ | $7,1 \pm 1,2^*$ |

Примечание. \* – статистическая достоверность между группами ( $p < 0,05$ ).

$20,3 \pm 5,1$  мкмоль/л. При последовательном измерении Нсу на разных курсах терапии ВД Мtx было выявлено, что с каждым последующим курсом наблюдаемые изменения концентрации становятся все менее выраженными – концентрация Нсу на каждом сроке ТЛМ Мtx ниже, чем в предыдущем курсе (рис. 6); каждый последующий курс начинался с более низкого значения Нсу, чем предыдущий. Причиной этого может быть остаточное действие лейковорина, а также активация альтернативных путей метаболизма Нсу (бетаинового, а также цистатионового пути, который преимущественно развит в почках).

Статистически достоверная разница в образовании Нсу была выявлена между 1-м и 4-м, 6-м, 7-м, 8-м курсами, а также между 5-м и 7-м, 8-м курсами ВД Мtx. Обнаружено, что в течение первых 4 курсов концентрация Нсу снижалась. Пятый курс имел особенности: характеризовался большими значениями (чем на 2–4-м курсах) концентрации Нсу на всех сроках ТЛМ – в среднем в 1,5 раза, но не достигающими значений концентрации Нсу 1-го курса. Шестой, 7-й и 8-й курсы также характеризовались последовательным снижением концентрации Нсу в ключевые часы мониторинга.

Площадь под фармакокинетической кривой изменения концентрации Нсу ( $H_{cy}AUC$ ) также показала тенденцию к снижению от курса к курсу. Это отражает снижение накопления Нсу в ответ на последовательное проведение курсов терапии ВД Мtx (табл. 4). После перерыва в терапии  $H_{cy}AUC$  увеличивалась, не достигая изначальных значений, а затем постепенно снижалась. При этом  $MtxAUC$  от курса к курсу оставалась неизменной, т. е. общее воздействие препарата на организм количественно не изменялось. Эти данные свидетельствуют о том, что общее накопление Нсу ( $H_{cy}AUC$ ) является фармакодинамическим показателем, который линейно увеличивается в ответ на введение Мtx. Коэффициент корреляции ( $r$ ) между концентрациями Мtx и Нсу составил 0,87.

Для АЛТ, АСТ, ЛДГ также были определены статистически значимые корреляции с концентрацией Нсу – 0,98; 0,86; 0,95 соответственно. Полученные нами данные по значимым корреляциям между концентрацией Нсу и гепатотоксичностью согласуются с данными литературы [18]. При этом необходимо отметить, что вышеназванное исследование было выполнено у больных с острым лимфобластным лейкозом

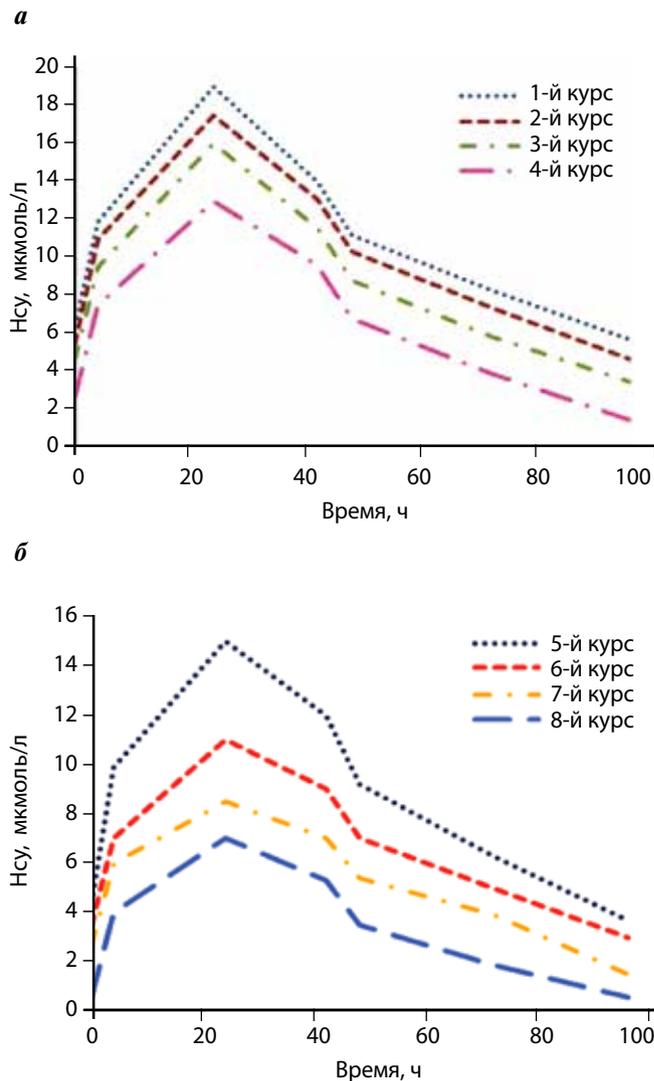


Рис. 6. Изменение концентрации Нсу с 1-го по 4-й курс (а) и с 5-го по 8-й курс (б) терапии ВД Мtx

и лимфомой Беркитта, которые получали значительно меньшие дозировки Мtx (1 и 3 г/м<sup>2</sup>), количество пациентов также было значительно меньше.

### Заключение

Таким образом, Нсу метаболически взаимосвязан с Мtx – чем выше концентрация Мtx, тем большее количество Нсу выбрасывается в кровь. Нсу может служить маркером эффективности подавления трансформации фолатов. При замедленном выведении Мtx

Таблица 4. АUC для Нсу и Мtx на разных курсах терапии ВД Мtx

| Показатель  | Номер курса  |              |              |              |              |              |              |              |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|             | 1            | 2            | 3            | 4            | 5            | 6            | 7            | 8            |
| $MtxAUC$    | 12891 ± 523  | 11692 ± 610  | 12781 ± 534  | 11989 ± 470  | 12678 ± 497  | 11639 ± 617  | 11595 ± 568  | 11789 ± 612  |
| $H_{cy}AUC$ | 812,2 ± 70,4 | 689,5 ± 67,6 | 518,3 ± 53,8 | 428,3 ± 47,2 | 718,9 ± 55,1 | 578,1 ± 45,1 | 318,7 ± 56,1 | 228,3 ± 47,2 |

уровень Нсу в крови значительно повышается, что также свидетельствует в пользу того, что он может служить маркером фармакодинамического воздействия ВД Мtx. С каждым последующим курсом ВД Мtx выброс Нсу в сыворотку снижается. Можно предположить, что Нсу начинает утилизироваться по другим метаболическим путям — бетаиновому, цистатионовому, и за счет этого вносит свой вклад в токсичность Мtx.

Из вышесказанного следует, что АЛТ, АСТ, ЛДГ являются неспецифическими маркерами токсичности Мtx и не отражают его токсичность с точки зрения механизма действия, а также его эффективность. Нсу является избирательным биохимическим маркером токсичности Мtx и может служить предиктором развития нарушений выведения Мtx, тем самым соответствуя всем критериям современного подхода к выбору биомаркеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг. Качественная клиническая практика 2002;(1):78–88. [Sokolov A. V. Therapeutic Drug Monitoring. Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice 2002;(1):78–88. (In Russ.)].
2. Ghiculescu R. A. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. Aust Prescr 2008;31:41–4.
3. Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. Br J Clin Pharmacol 1999;47(2):131–43.
4. Мирошниченко И. И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств: Практическое руководство. М.: Медицинское информационное агентство, 2011. 416 с. [Miroshnichenko I. I. Rational dosage and drug monitoring: Practical guide. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2011. 416 p. (In Russ.)].
5. Bacci G., Briccoli A., Longhi A. et al. Treatment and outcome of recurrent osteosarcoma: experience at Rizzoli in 235 patients initially treated with neoadjuvant chemotherapy. Acta Oncol 2005;44(7):748–55.
6. Копосов П. В., Ковалев В. И., Ковалев Д. В. Профилактика и лечение осложнений химиотерапии злокачественных опухолей у детей: современные подходы. Руководство для врачей. М.: Клевер Принт, 2002. С. 73–8. [Koposov P. V., Kovalev V. I., Kovalev D. V. Prevention and treatment of malignant tumours chemotherapy complications in children: modern approaches. Physician's Guide. Moscow: Klever Print, 2002. Pp. 73–8. (In Russ.)].
7. Crews K. R., Liu T., Rodriguez-Galindo C. et al. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. Cancer 2004;100(8):1724–33.
8. Bacci G., Ferrari S., Longhi A. et al. Delayed methotrexate clearance in osteosarcoma patients treated with multiagent regimens of neoadjuvant chemotherapy. Oncol Rep 2003;10(4):851–7.
9. Hempel L., Misselwitz J., Fleck C. et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. Med Pediatr Oncol 2003;40(6):348–54.
10. Broxson E., Stork L., Allen R. et al. Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions. Cancer Res 1989;49(21):5879–83.
11. Rühls H., Becker A., Drescher A. et al. Population PK/PD model of homocysteine concentrations after high-dose methotrexate treatment in patients with acute lymphoblastic leukemia. PLoS One 2012;7(9):1–8.
12. Sterba J., Dusek L., Demlova R., Valik D. Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-hodgkin lymphoma: “folate overrescue” concept revisited. Clin Chem 2006;52(4):692–700.
13. Refsum H., Wesenberg F., Ueland P. M. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. Cancer Res 1991;51(3):828–35.
14. Refsum H., Ueland P., Kvinnsland S. Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. Cancer Res 1986;46(10):5385–91.
15. Refsum H., Smith A. D., Ueland P. M. et al. Homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 2004;50(1):3–32.
16. Valik D., Sterba J., Bajciová V., Demlova R. Severe encephalopathy induced by the first but not the second course of high-dose methotrexate mirrored by plasma homocysteine elevations and preceded by extreme differences in pretreatment plasma folate. Oncology 2005;69(3):269–72.
17. Holmboe L., Andersen A. M., Mørkrid L. et al. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. Br J Clin Pharmacol 2011;73(1):106–14.
18. Watanabe K., Heike T., Kubota M. et al. Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity. Leuk Lymphoma 2013;3(1):1–5.