

А.М. Стрижевская, Э.Р. Сенжапова, А.З. Дзампаев, В.Н. Байкова

## Потенциальный критерий фармакодинамического эффекта высоких доз метотрексата — гомоцистеин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва, Каширское ш., 23

Высокие дозы метотрексата (ВД Мtx) блокируют метаболический путь превращения гомоцистеина (hcy) в метионин. Вследствие этого гомоцистеин накапливается в крови. Целью данной работы было выявление взаимосвязи между изменениями концентрации hcy, метотрексата на ключевых часах терапевтического лекарственного мониторинга mtx, а также выявление возможности применения hcy в качестве маркера токсичности и эффективности ВД mtx. В работу включены данные о детях, находившихся на лечении в НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» за период с 2007 по 2013 гг. Исследование показало, что концентрация гомоцистеина тесно коррелирует с концентрацией метотрексата в течение курса терапии высокими дозами метотрексата. Однако выброс гомоцистеина в кровь в ответ на введение метотрексата снижается с каждым последующим курсом терапии, что делает его потенциальным фармакодинамическим критерием эффективности терапии высокими дозами метотрексата.

**Ключевые слова:** метотрексат, гомоцистеин, токсичности, остеосаркома, дети

A.M. Strizhevskaya, E.R. Senzhapova, A.Z. Dzampaev, V.N. Baykova

## Potential marker of the pharmacodynamic effect of high doses of methotrexate — homocysteine

FGBI Russian Cancer Research Center of N.N. Blokhin RAMS

High-dose methotrexate blocks the metabolic pathways of conversion of homocysteine to methionine. As a result, homocysteine (hcy) accumulates in the blood. The aim of this study was to determine the relationship between changes in concentrations of hcy, mtx, and other criteria of toxicity in the key hours of therapeutic drug monitoring of mtx, as well as identifying the possibility of using hcy as a marker of toxicity and effectiveness of high-dose mtx therapy. The study includes data on 246 children with osteosarcoma of different localisation.

**Key words:** Methotrexate, homocysteine, toxicity, osteosarcoma, child

Высокие дозы метотрексата (ВД Мtx) в детской онкологии применяются для лечения остеосаркомы (ОС), острого лимфобластного лейкоза, неходжжкинской лимфомы, и других типов опухолей. У пациентов с ОС это позволило достичь безрецидивной выживаемости до 80% [1, 2]. Однако проблема высокой экстра- и интраиндивидуальной изменчивости в фармакокинетике Мtx остается нерешенной [3]. В 10% случаев возникает угрожающее жизни замедленное выведение Мtx, индуцированная Мtx острая почечная недостаточность, вызываемая преципитацией Мtx на эпителии почечных канальцев [4, 5]. Характерно, также, проявление гепатотоксичности. Лечение должно проводиться под строгим контролем лабораторных исследований, в первую очередь лекарственного мониторинга концентрации самого препарата. Харак-

тер и время проявления побочных реакций, а также скорость их устранения зависят не только от дозы Мtx, его концентрации и длительности пребывания в организме, но и от состояния ферментных систем организма, функциональной полноценности выделительных органов [6].

Используемые в настоящее время лабораторные показатели (АЛТ, АСТ, ЛДГ, креатинин) не являются специфическими для ВД Мtx, реагируют и на другие виды химиотерапии, не всегда и не полно отвечают на введение Мtx. Оценка воздействия ВД Мtx на организм ребенка требует серьезного теоретического анализа и исследования с помощью новых биохимических маркеров, которые могли бы показать и предсказать токсичность Мtx ранее других биохимических показателей.

Для возможности оценки как степени эффективности подавления образования фолатов (рис. 1), так и степени токсичности Мtx предложен фармакодинамический критерий — уровень содержания аминокислоты гомоцистеина (Hcy) [7]. Это серосодержащая ами-

Для корреспонденции: Стрижевская Александра Михайловна, науч. сотр., экспресс-лаборатория централизованного клиничко-лабораторного отдела, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Каширское шоссе, 23, e-mail: Strizhevsky@yandex.ru

нокислота уже применяется в медицине как маркер ишемической болезни сердца, шизофрении, патологий плода и пр. [7—9]. Нсу не поступает в организм с пищей, являясь продуктом трансамелирования — в каскаде реакций он образуется из аминокислоты метионина (Met), а затем при участии тетрагидрофолата (ТГФ) превращается вновь в метионин. В свою очередь, Мtx ингибирует образование ТГФ, ингибируя фермент дигидрофолатредуктазу (ДФФР, ЕС 1.5.1.3). Дигидрофолат (ДФФ) не восстанавливается в ТГФ, который необходим для превращения гомоцистеина в метионин (рис. 1). Накопление гомоцистеина при ВД Мtx — биохимическая основа отражения степени подавления синтеза фолатов [10—12].

## Методика

### Характеристика пациентов

В работу включены данные о 246 детях, которые находились на лечении в НИИ ДОГ ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН за период 2006 по 2013 гг. Пациенты получали лечение согласно протоколу комплексной химиотерапии остеосаркомы «ОС-2006», разработанному и утвержденному в НИИ ДОГ. Средний возраст детей составил 12,2 года (от 5 до 16 лет); соотношение пациентов по полу — 1,03:1 (125 мальчиков, 121 девочка). Всего проведено 1137 курсов ВД Мtx. Больным было проведено  $6 \pm 4$  курсов ВД Мtx (средняя доза Мtx составила  $18,96 \pm 5,2$  г). Мtx вводился путем 4-часовой инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно, через каждые 6 ч, начиная с 24-го часа от начала инфузии Мtx.

### Методика

Кровь из вены забиралась до введения препарата (0 ч); через 4; 24; 42; 48; 72 часа и далее до полного выведения Мtx, в вакуумные пробирки марки Sartstedt (тип «monovette®» объем 7,5 мл). Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах на центрифуге Elmi CM 6M. Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) Мtx проводили методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа (ФПИА) на анализаторе TdxFlx («Abbott», США) в те же сроки. ФПИА — гомогенный конкурентный метод иммунного анализа, основанный на двух принципах: конкурентного связывания белков и флуоресцентной поляризации. Определение Нсу также проводили в те же сроки наблюдения на анализаторе VITROS 5.1 FS («Orthoclinical Diagnostics», США). В основе метода лежит реакция восстановления молекул Нсу, связанных дисульфидной связью трис-(2-карбокситил)-фосфин гидрохлоридом с образованием восстановленной формы Нсу, которая,

в свою очередь, реагирует с серином в присутствии цистодионин β-синтазы с образованием L-цистодионина. L-цистодионин реагирует с цистодионин-β-лиазой с образованием гомоцистеина, пирувата и аммиака. Пируват восстанавливается с участием АДГ и НАДН в качестве кофермента. Концентрация Нсу прямо пропорциональна количеству НАДН, окисленного в НАД+, и измеряется спектрофотометрическим методом при 340 нм.

### Статистическая обработка

Для статистической обработки результатов исследования были использованы процедуры математической статистики, реализованные в программе SPSS 11.0 for Windows, MedCalc 12, Origin 6.1, MS Excel 2007.

## Результаты и обсуждение

В качестве стандартных в протоколе приняты следующие концентрации Мtx на ключевых часах лекарственного мониторинга: на срок 4 ч должно быть менее 1800 мкмоль/л; на 24 ч — менее 10 мкмоль/л; на 42 ч — менее 1,0 мкмоль/л; на 48 ч — менее 0,1 мкмоль/л; на 72 ч — менее 0,05 мкмоль/л; на 96 ч — менее 0,02 мкмоль/л. На сроке 24 ч вводился антидот Мtx — лейковорин, и далее введение последнего повторялось каждые 6 ч. При такой скорости выведения Мtx и применяемой схеме лечения вероятность развития побочных эффектов считается минимальной.

Мtx вводили капельно в течение 4 ч. Показатели концентрации Мtx и гомоцистеина в исследуемые сроки представлены в таблице. Как видно из таблицы, к 4-му часу достигалась максимальная концент-

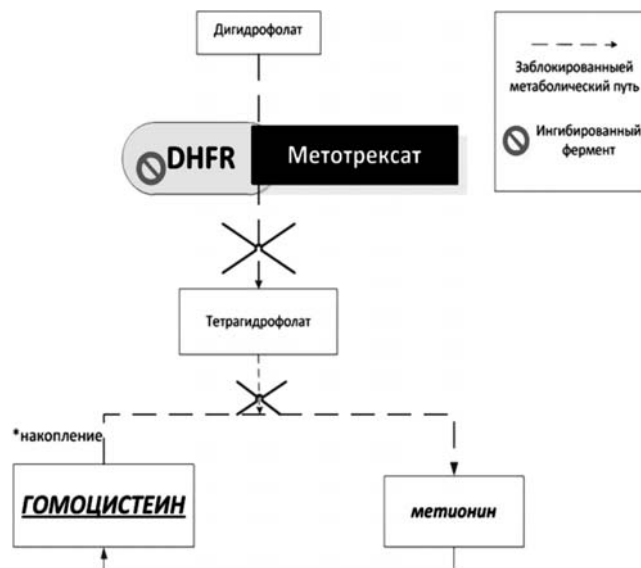


Рис. 1. Метаболизм гомоцистеина в условиях терапии высокими дозами Мtx

Концентрация гомоцистеина и метотрексата с 0 по 96 час ВД Мtx

Концентрация Мtx, мкмоль/л	Час от начала введения метотрексата						
	0	4	24	42	48	72	96
Нсу (нормальное выведение Мtx), ммоль/л	5,4 ± 1,5	9,5 ± 3,2	15,6 ± 5,5	11,6 ± 3,4	8,8 ± 3,2	5,9 ± 1,3	4,7 ± 1,3

рация Мtx, затем она прогрессивно снижалась и к 24-му часу от начала введения Мtx составляла  $4,67 \pm 0,95$  мкмоль/л. На сроке 24 ч начиналось введение антидота Мtx — лейковорина, который обеспечивает защиту клеток от токсического воздействия Мtx. Полное выведение Мtx в неосложненных случаях занимает  $96 \pm 24$  ч.

Концентрация сывороточного Нсу также быстро возрастала за первые 4 ч терапии. После окончания инфузии Мtx концентрация Нсу продолжала возрастать до начала введения антидота. В последующие сроки наблюдения концентрация Нсу прогрессивно снижалась и к 96 ч была ниже концентрации до начала терапии в среднем на 1,5 мкмоль/л (рис. 2). Коэффициент корреляции между концентрацией Мtx и Нсу составил  $0,87$ ,  $\rho = 0,0031$ .

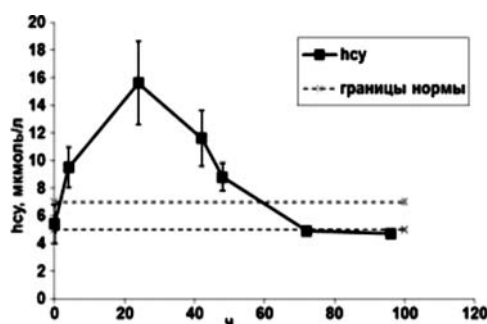


Рис. 2. Динамика изменения концентрации Нсу в крови пациентов при ВД Мtx.

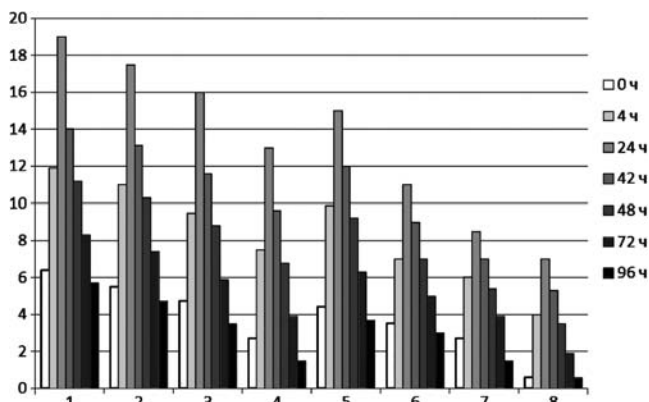


Рис. 3. Динамика изменения концентрации Нсу в крови пациентов при ВД Мtx с 1 по 8 курс ВД Мtx.

При изучении изменения концентрации в процессе лечения Нсу с 1-го по 8-й курс введения ВД Мtx был выявлен ряд особенностей. Наиболее выраженный ответ наблюдался во время 1-го курса ВД Мtx у первичных пациентов — концентрация Нсу к 24-му ч достигала в среднем  $20,3 \pm 5,1$  мкмоль/л. При последовательном измерении Нсу на разных курсах ВД Мtx было выявлено, что с каждым последующим курсом наблюдаемые изменения концентрации становились все менее выраженными — концентрация Нсу на каждый срок ТЛМ Мtx была ниже, чем на предыдущем (рис. 3); т.е. каждый последующий курс ВД Мtx начинался с более низких значений Нсу. Причиной этого могло быть снижение активности трансформации фолатов, остаточное действие лейковорина, а также активация альтернативных путей метаболизма (цистетионового пути, который преимущественно представлен в почках).

Статистически значимая разница выявлена между показателями 1-го и 4-го; 6-го; 7-го; 8-го курсов, а также между 5-м и 7-м; 8-м курсами. Было обнаружено, что в течение первых 4 курсов терапии ВД Мtx концентрация Нсу снижалась, но 5-й курс характеризовался большей амплитудой колебания концентрации Нсу, т.е. концентрация повышалась на всех сроках мониторинга (в среднем на  $2,3$  мкмоль/л), но не достигала значений 1 курса.

При выявлении причин этой особенности было обнаружено, что, согласно историям болезни, перед курсом ВД Мtx, который характеризовался большей амплитудой ответа Нсу на введение Мtx, имели место перерывы в терапии ВД Мtx. Перерывы в курсах ВД Мtx обусловлены проведением хирургического этапа лечения. Также в эту группу отнесены пациенты с рецидивами (развитие метастазов в легких), поступившие для проведения повторного цикла лечения. После перерыва уровень Нсу восстанавливался, но не полностью, что может указывать на остаточное влияние лейковорина (рис. 4).

Для анализа данные были разделены на 2 подгруппы — до и после перерыва в терапии ВД Мtx. В подгруппе 1 — «до перерыва в терапии ВД Мtx» выявлена статистически значимая разница между показателями 1-го и 4-го курсов ( $\rho = 0,008$ ). В подгруппе «после перерыва в терапии ВД Мtx» стати-

стически значимые различия выявлены между 5-м и 8-м курсами ( $p = 0,007$ ). Вместе с тем, в каждой подгруппе концентрация Нсу снижалась с каждым последующим курсом.

Площадь под фармакокинетической кривой выведения Нсу ( $H_{cy}AUC$ ) также показала тенденцию к снижению от курса к курсу. Это отражает снижение накопления Нсу в ответ на последовательное проведение курсов ВД Мtx. После перерыва в терапии значение  $H_{cy}AUC$  возрастает, не достигая изначальных значений, а затем постепенно снижается. При этом  $MtxAUC$  от курса к курсу остается неизменной, свидетельствуя, что 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, и эта тенденция мгновенно прекращается введением лейковорина.

С другой стороны, при подсчете площади под фармакокинетической кривой ( $MtxAUC$ ) в процессе разных курсов ВД Мtx статистически значимых различий также не было отмечено между курсами ( $p=0,065$ ), что отражает стабильность общего воздействия препарата.

Эти данные также свидетельствуют, что общее накопление Нсу ( $H_{cy}AUC_{0.96}$ ) является фармакодинамическим показателем, который линейно возрастает в ответ на введение Мtx, и снимается введением лейковорина.

### Заключение

Метаболизм Нсу тесно взаимосвязан с механизмом действия Мtx. Попадая в организм, Мtx блокирует процесс утилизации Нсу по основному механизму. С каждым последующим курсом ВД Мtx выброс Нсу в сыворотку снижается [12, 18]. Это может быть следствием того, что Мtx менее эффективно связывает фолаты, или же реакция мгновенно купируется за счет остаточного действия лейковорина. Можно предположить, что Нсу начинает утилизироваться по другим метаболическим путям, и тем самым вносит свой вклад в токсичность Мtx. Применение Мtx также приводит к тому, что уровень Нсу стабильно держится ниже нормы [12—14]. После длительного перерыва в терапии уровень подъема концентрации Нсу восстанавливается, что подтверждает предположение об остаточном действии лейковорина и снижении уровня метаболизма фолатов [15]. Снижение амплитуды концентрации Нсу с каждым последующим курсом ВД Мtx при не изменяющейся концентрации препарата может свидетельствовать о снижении эффективности связывания фолатов, что делает Нсу потенциальным маркером эффективности их подавления [16—18].

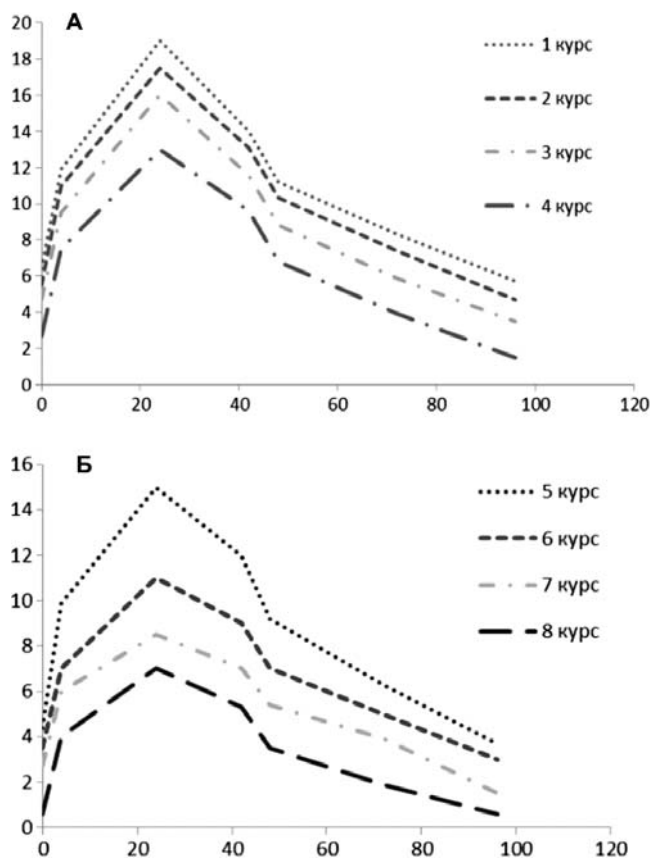


Рис. 4. А — изменение концентрации Нсу с 1-го по 4-й курс; Б — изменение концентрации Нсу с 5-го по 8-й курс ВД Мtx.

### Список литературы

1. 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). — P. 1724—1733.
2. 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 Oncologica*. — 2005. — Vol. 44. — P. 748—755.
3. Zelcer S., Kellick M., Wexler L.H. et al. Methotrexate levels and outcome in osteosarcoma // *Pediatr. Blood Cancer*. — 2005. — 44 (7). — P. 638—642.
4. Bacci G., Ferrari S., Longhi A. et al. Delayed methotrexate clearance in osteosarcoma patients treated with multi-agent regimens of neoadjuvant chemotherapy // *Oncol. Rep.* — 2003. — 10 (4). — P. 851—867.
5. 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. — Vol. 40, №6. — P. 348—354.
6. Jaffe N., Gorlick R. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease-Time for Final Acceptance // *J. of Clin. Onc.* — 2008. — Vol. 28, №27. — P. 4365—4366.
7. Broxson E., Stork L., Allen R. et al. Changes in Plasma Methionine and Total Homocysteine Levels in Patients Re-

ceiving Methotrexate Infusions // *Cancer Research*. — 1989. — Vol. 49. — P. 5879–5883.

8. **Bostom A.G., Kronenberg F., Schwenger V.** et al. Proteinuria and total plasma homocysteine levels in chronic renal disease patients with a normal range serum creatinine: Critical impact of true GFR // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2000. — Vol. 11. — P. 305–310.

9. **Bostom A.G., Culleton B.F.** Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 1999. — Vol. 10. — P. 891–900.

10. **Ruhs 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. — Vol. 7, №9. — P. 1–8.

11. **Refsum H.** et al. Plasma Homocysteine in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Changes during a Chemotherapeutic Regimen Including Methotrexate // *Cancer research*. — 1991. — Vol. 51. — P. 828–835.

12. **Refsum H., Ueland P., Kvinnsland S.** Acute and Long-Term Effects of High-Dose Methotrexate Treatment on Homocysteine in Plasma and Urine // *Cancer research*. — 1986. — Vol. 46. — P. 5385–5391.

13. **Refsum H.** et al. Homocysteine Determinations: An Expert Opinion // *Clinical Chemistry*. — 2004. — 50 (1). — P. 3–32.

14. **Watanabe K., Heike T., Kubota M.** et al. Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric pati-

ents with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity // *Leuk. Lymphoma*. — 2013. — Vol. 3, №1. — P. 1–5.

15. **Ueland M., Lonning E., Refsum H.** Kinetics of Plasma Total Homocysteine in Patients Receiving High-Dose Methotrexate Therapy // *Clinical Chemistry*. — 1998. — 44 (9). — P. 50–54.

16. **Sterba J.** et al. 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 // *Clinical Chemistry*. — 2006. — Vol. 52:4. — P. 692–700.

17. **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. — Vol. 69, №3. — P. 269–272.

18. **Valik D., Radina M., Sterba J., Vojtesek B.** Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy // *Pharmacogenomics*. — 2004. — 5 (8). — P. 1151–1162.

Поступила 24.03.14

#### Сведения об авторах:

*Байкова Валентина Николаевна*, д.б.н., проф., зав. экспресс-лабораторией централизованного клинико-лабораторного отдела, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

*Сенжапова Эльмира Рифатовна*, врач, отделение хирургии опухолей опорно-двигательного аппарата НИИ ДОГ, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

*Дзампаев Алан Зелимханович*, к.м.н., зав. отделением хирургии опухолей опорно-двигательного аппарата НИИ ДОГ, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН