

Погодина Е.А., Стрижевская А.М., Шварова А.В., Иванова Н.М., Байкова В.Н.

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ ВЫСОКИМИ ДОЗАМИ МЕТОТРЕКСАТА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОСАРКОМОЙ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контактная информация:

Погодина Екатерина Александровна, м.н.с., экспресс-лаборатория централизованного клиничко-лабораторного отдела

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 23; тел.: +7(916)316-8643

E-mail: lisha_hoia@mail.ru

Статья поступила: 17.05.2012 г., принята к печати: 05.09.2012 г.

Резюме

Высокая токсичность терапии высокими дозами метотрексата приводит к развитию большого количества побочных эффектов. Побочные эффекты могут приводить к прерыванию лечения, что значительно снижает выживаемость пациентов, больных ОС. Поэтому при терапии ВД Мtx адаптационные и компенсаторные системы, способствующие мобилизации защитных механизмов организма, имеют главенствующую роль. Важным звеном в их проявлении является состояние антиоксидантной системы (АОС), обеспечивающей резистентность организма при экстремальных воздействиях, особенно при окислительном стрессе. В данной работе проанализированы изменения показателей состояния АОС при терапии ВД Мtx на примере детей, страдающих остесаркомой.

Ключевые слова: высокодозная терапия метотрексатом, антиоксидантный статус, СОД, глутатионредуктаза, дети, остесаркома.

Pogodina EA, Strizhevskaya AM, Shvarova AV, Ivanova NM, Baikova VN

INFLUENCE OF HIGH-DOSE METHOTREXATE THERAPY ON THE ANTIOXIDANT STATUS OF CHILDREN WITH OSTEOSARCOMA

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, Moscow

Summary

High toxicity high-dose methotrexate therapy leads to development of a large number of side effects. They lead to interruption of treatment that considerably reduces survival rate of the patients sick with osteosarcoma. Therefore at high-dose Mtx therapy the adaptable systems, promoting mobilization of protective mechanisms of an organism, have a predominating role. The condition of the antioxidant system, providing resistance of an organism at an oxidizing stress, is an important link in their manifestation. The changes of indicators of a condition of antioxidant system at high-dose Mtx therapy in children with osteosarcoma are analysed in this work.

Key words: high-dose Mtx therapy, antioxidant status, SOD, glutathionreductase, child, osteosarcoma

Введение

В настоящее время для лечения остесаркомы (ОС) у детей применяют высокие дозы метотрексата – до 12,0 г/м². Это позволило снизить детскую смертность при ОС и достичь 4-летней ОВ в 76–80 % случаев, 5-летней БРВ – в 37-50 %.

Хорошо известно, что введение любого ксенобиотика, к которым относятся в том числе и противоопухолевые препараты, приводит к срыву антиоксидантной защиты (АОЗ) организма, и ведет к развитию большого числа побочных эффектов [1–3; 17].

Терапия ВД Мtx очень токсична – самыми распространенными являются гепатотоксичность, нейротоксичность, мукозиты и панкреопатии [4; 16; 17]. Их развитие может приводить к прерыванию или даже прекращению лечения, и поэтому при терапии ВД Мtx адаптационные и компенсаторные системы, способствующие мобилизации защитных механизмов организма, имеют главенствующую роль.

Важным звеном в их проявлении является состояние АОС, обеспечивающей резистентность организма при экстремальных воздействиях, особенно при окислительном стрессе [1–3; 15].

Целью нашей работы стало изучение изменения состояния ферментных показателей АОС (СОД, ГР, γ -ГТ, ОАОС) у детей, получающих ВД Мtx по поводу остеосаркомы, для оценки их взаимосвязи с токсичностью проводимой терапии.

Материалы и методы

В ходе работы в динамике (2008-2012 гг.) обследованы 95 детей, получавших лечение ВД Мtx (8 или 12 г/м²) по протоколу комплексной химиотерапии «ОС-2006 НИИ ДОГ», разработанному и утвержденному в НИИ ДОГ ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Возраст обследуемых детей от 10 до 15 лет, средний возраст больных составил 12,2±1,8 лет. Все пациенты получали лейковорин и адеметионин для снятия токсических эффектов после получения ВД Мtx. Исследование включало одновременное определение биохимических показателей гепатотоксичности (концентрации ферментов цитолиза – АЛТ и АСТ, мембраносвязанного фермента γ -ГТ, цитоплазматического фермента ЛДГ, показателей пигментного обмена – общего и прямого билирубина) и АОС – ферментов супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР) и общего антиоксидантного статуса (оАОС) на протяжении всего лечения (до начала лечения и в течение каждого из восьми курсов ВД Мtx, а также после окончания лечения).

В контрольную группу детей (30 человек) вошли практически здоровые пациенты, обследованные в порядке планового наблюдения. Распределение их по полу и возрасту в контрольной группе соответствовало таковому в обследуемой группе больных в возрасте от 9 до 15 лет (12±1).

При ВД Мtx лейковорин начинали вводить больным ОС с 24 ч от начала введения Мtx. Дозу лейковорина рассчитывали после определения методом ФПИА содержания Мtx в сыворотке крови на 4; 24; 42; 48 ч от начала введения, затем каждые 6 ч, пока концентрация мtx не снижалась до 0,02 ммоль/л.

Если концентрация Мtx на 48 ч от начала введения превышала 1 ммоль/л, то дозу лейковорина рассчитывали с учетом массы тела больного по полученной эмпирически формуле:

$$m(\text{CaFol}) = C(\text{Mtx}) \times m \times k \times l, \text{ где}$$

$m(\text{CaFol})$ – необходимая доза лейковорина (мг),
 $C(\text{Mtx})$ – концентрация Мtx в крови больного (мкмоль/л),
 m – масса больного (кг),
 k (мг/ммоль) – коэффициенты,
 l (л/кг) – подобраны эмпирически.

Оценку биохимических показателей, значений ОАОС, активностей СОД, ГР, γ -ГТ определяли на биохимическом анализаторе «Alcyon 300» фирмы «Abbott» (USA) или на биохимическом анализаторе «Pentra 400», фирмы «ABX Horiba» (France). Использовали реактивы фирмы Randox (GB) и наборы реагентов ABX Pentra.

Статистическую обработку результатов исследования и корреляционный анализ проводили с помощью программы SPSS 40, программ пакета Microsoft Office XP–Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Нами было изучено состояние АОС при получении ВД Мtx (8–12 г/м²) детьми с ОС. Данные об изменениях ОАОС и активности ферментов ГР, СОД и γ -ГТ представлены в таблице.

Таблица
Изменения активности антиоксидантных ферментов в течение курса ВД Мtx

Час от начала введения Мtx	СОД(ед/л)	ГР(ед/л)	γ -ГТ(ед/л)	оАОС(ммоль/л)
0	337±46	99,1±23	10±3	0,72±0,2
4	376±51	68±14	30±9	0,95±0,3
24	355±53	112±35	90±12	0,97±0,2
42	253±54	89±28	81±18	0,88±0,4
48	320±51	90,5±19	78±15	0,91±0,3
72	380±45	78,7±17	66±12	0,78±0,2
Норма	963,5± 45,8	57,4±12,6	11,8±1,3	1,5±0,12

При изучении показателей оАОС (табл., рис. 1) было показано значительное снижение его значений до начала введения (0 час), различия по сравнению с группой контроля статистически достоверны ($p < 0,001$) – 0,72±0,2 ммоль/л по сравнению с 1,5±0,12 ммоль/л. На 4 и 24 час от начала введения Мtx показатели ОАОС немного возрастают до 0,95 и 0,97 ммоль/л, соответственно. На 42 и 48 час они имеют тенденцию к снижению,

достигнув к 72 часу значений фактически 0 часа – 0,78±0,2 ммоль/л. Таким образом, можно заключить, что при ВД Мtx у больных ОС значительно снижен антиоксидантный потенциал.

Существует несколько уровней АОС защиты, однако ключевая роль в защите клетки от оксидативного стресса должна, по-видимому, отдаваться системе глутатиона, что подтверждается полученными результатами.

На всех курсах проведения ВД Мtx содержание ГР в сыворотке крови снижалось к 4 часу введения Мtx (табл., рис. 2.) с $99,1 \pm 23$ до 68 ± 14 ед/л, но не достигало границ нормы, которая составляет $57,4 \pm 12,6$ ед/л (табл.). Различия по сравнению с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,001$).

На 4 час терапии наблюдается максимальная концентрация Мtx в крови пациента. Резкое увеличение активности ГР с 4-ого по 24 час ВД Мtx объясняется активацией компенсаторных систем организма, вызванных сильным оксидативным стрессом вследствие введения ВД Мtx, т. к. ГР участвует в восстановлении глутатиона.

На 24 час ВД Мtx начинают вводить антидот Мtx – лейковорин. Он обеспечивает защиту клеток организма от токсического воздействия Мtx и сам также обладает антиоксидантным действием. После введения лейковорина, при постепенном выведении из организма Мtx происходит коррелирующее с ним снижение концентрации ГР, и к 72 часу ее значения практически достигают нормы.

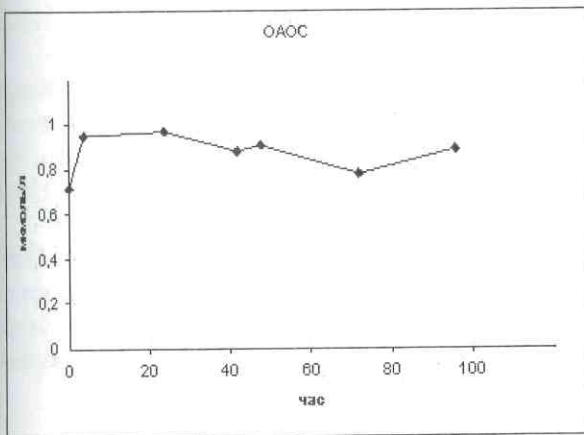


Рис. 1. Изменение ОАОС в течение курса ВД Мtx.

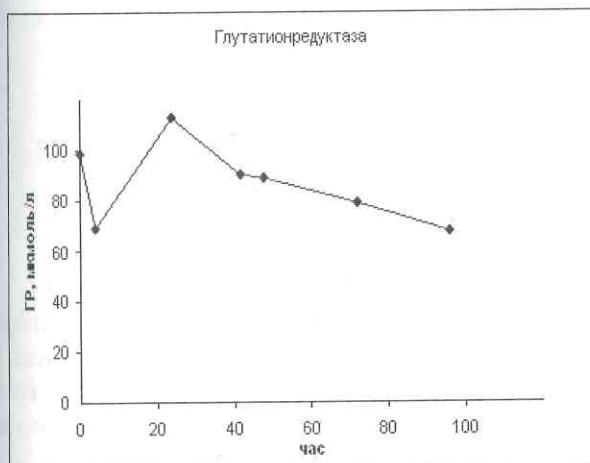


Рис. 2. Изменения концентрации ГР в течение курса ВД Мtx.

Между ГР и другими мониторируемыми показателями выявлены значимые корреляции для средних значений по нескольким курсам ВД Мtx. Максимальные корреляции были выявлены между ГР и ЩФ ($r=0,98$), и ГР и ГГТ ($r=0,94$). Также сильные корреляции наблюдаются между ГР и hcy ($r=0,63$), АСТ ($r=0,59$), ЛДГ ($r=0,58$). Наименее коррелируют ГР и АЛТ ($r=0,18$).

Активность СОД (табл., рис. 3) на всех курсах проведения ВД Мtx сохранялась ниже нормальных показателей. Если в контрольной группе активность СОД составляла $963,5 \pm 45,8$ ед/л, то на 0 час она была 337 ± 46 ед/л. Различия статистически достоверны ($p < 0,001$). На всех курсах проведения ВД Мtx активность СОД возрастала к 4-ому часу введения Мtx, затем постепенно снижалась до 42 часа, после чего, когда концентрация Мtx уменьшалась, то активность фермента снова повышалась, но не приближалась к нормальным показателям. Различия статистически достоверны ($p < 0,001$). В среднем наблюдалось снижение активности СОД под токсическим влиянием Мtx.

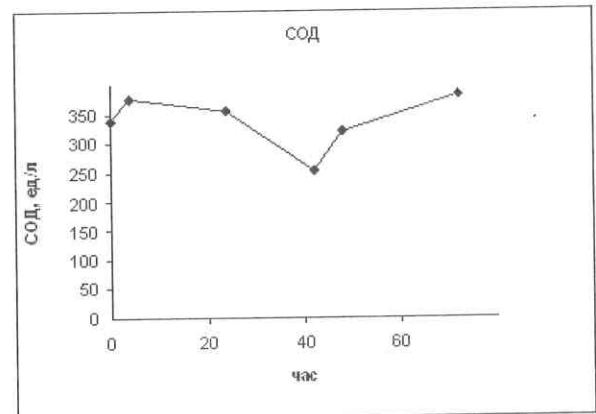


Рис. 3. Изменение концентрации СОД в течение курса ВД Мtx.

γ -ГТ катализирует перенос γ -глутамилового остатка с γ -глутамилового пептида на аминокислоту или другой пептид, или на иную субстратную молекулу. Активность γ -ГТ имеет нормальные значения до начала введения Мtx – 10 ± 3 ед/л и $11,8 \pm 1,3$ ед/л в контрольной группе (табл. 1, рис. 4). Далее она резко активизируется к началу 4-го часа введения Мtx. Затем ее активность падает, постепенно достигая пороговых значений нормы.

Максимальное значение корреляции было получено у γ -ГТ с ЩФ ($r=0,98$), также хорошо коррелируют γ -ГТ и СОД ($r=0,8$). γ -ГТ вносит свой вклад в механизмы антиоксидантной защиты, обеспечивая транспорт глутатиона, однако увеличение ее активности может быть связано с гибелью гепатоцитов и она может служить показателем гепатотоксичности.

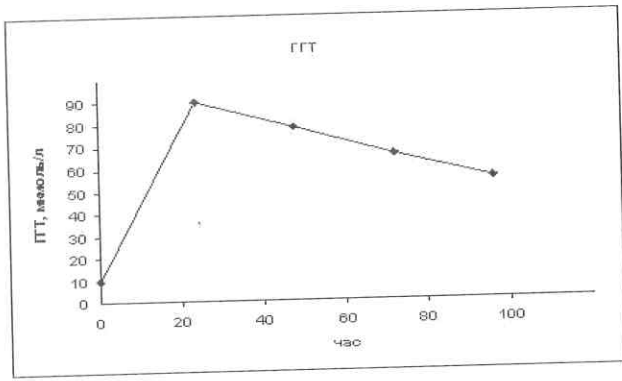


Рис. 4. Изменение концентрации γ -ГТ в течение курса ВД Мtx.

Обсуждение

Полученные зависимости важны именно для ферментной составляющей АОС (СОД, ГР, ГГТ) и ОАОС, поскольку в механизмах действия Мtx задействованы биоантиоксидантные системы.

Два фермента – СОД и γ -ГТ – резко активируются к 4 ч после введения Мtx. Затем их активность падает, постепенно достигая значений нормы для γ -ГТ. Таким образом, антибатный характер активации и ингибирования этой пары ферментов по отношению к ОАОС и ГР обеспечивает в среднем стабильность АОС организма. Срыв антиоксидантной защиты характеризуется развитием свободнорадикальных повреждений разных компонентов клетки и тканей, составляющих синдром пероксидации и включающий следующие изменения:

- повреждение мембран;
- инактивацию или трансформацию ферментов;
- подавление деления клеток;
- накопление в клетке инертных продуктов полимеризации, что определяет токсичность вводимого в организм ксенобиотика, которым в нашем случае является Мtx [1–3; 17].

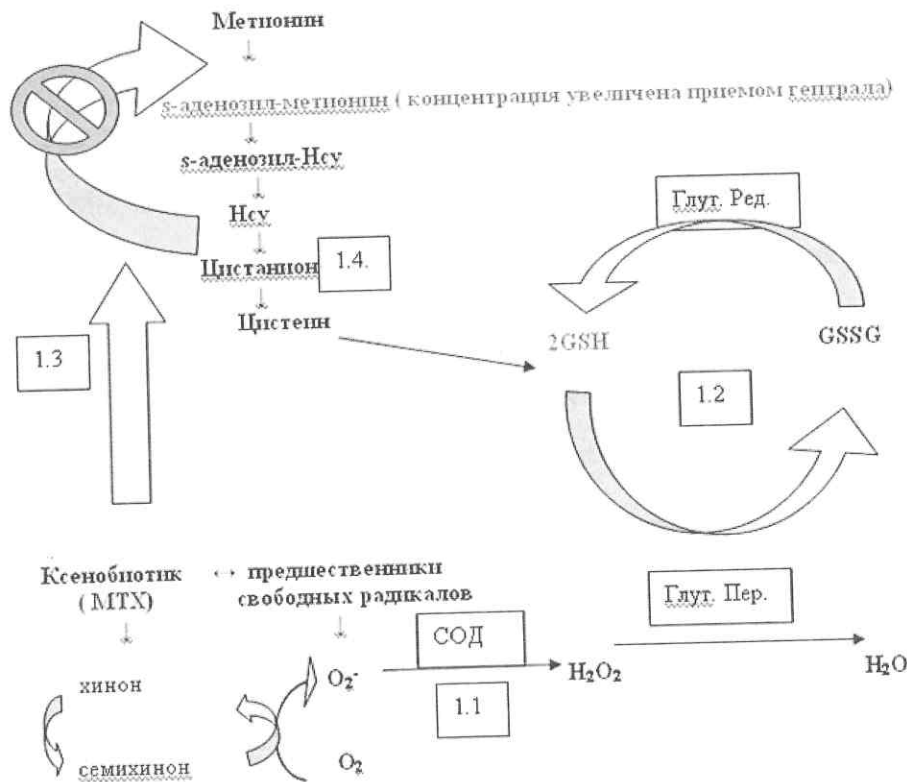


Рис. 5. Механизм токсического воздействия mtx на антиоксидантную систему.

Мtx – антагонист фолиевой кислоты, противоопухолевый препарат – является высокотоксичным, его поступление в организм приводит к образованию свободных радикалов кислорода [3; 12; 16]. В свою очередь, образование гидроксильных радикалов предотвращается с помощью участия СОД в реакции преобразования свободного радикала O_2^- в перекись H_2O_2 . (см. рис .5)

Следующий этап – это реакции утилизации перекиси с помощью глутатионпероксидазы и каталазы. При этом расходуется глутатион, который затем восстанавливается с помощью глутатионредуктазы [10; 11] (см. рис. 5)

Глутатион – это трипептид гамма-глутамилцистеинилглицин. Фактически глутатион не только защищает клетку от таких токсичных аген-

тов, как свободные радикалы, но и в целом определяет редокс-статус внутриклеточной среды [9]. Фермент ГР является важным звеном АОС. После того, как глутатион окислился, она восстанавливает дисульфидную связь окисленного глутатиона GSSG. Восстановление глутатиона происходит за счёт энергии НАДФ-Н, а в результате образуется его сульфгидрильная форма GSH [8;15].

Независимо от окислительной активности Mtx оказывает свой противоопухолевый эффект, заключающийся в ингибировании дигидрофолат-редуктазы (ДГФР) и, соответственно, подавления превращений дигидрофолата (ДГФ) в тетрагидрофолат (ТГФ). В связи с этим нарушается образование однокарбонных остатков, следовательно - образование ДНК, что приводит к гибели опухолевых клеток (см. рис. 5) [12].

Заключение

Полученные результаты соответствуют предложенному механизму влияния Mtx на АОС организма. Можно сделать вывод, что в первые часы после введения ВД Mtx основной вклад в защиту организма вкладывает СОД.

После четвертого часа ГР активируется под воздействием оксидативного стресса, и, восстанавливая глутатион, становится основным ферментом АОС защиты, и сохраняет эту роль до конца всего терапевтического курса.

Таким образом, основная роль в защите организма от токсического воздействия Mtx отводится системе глутатиона, и для успешного ее проведения необходимо применять терапию, направленную на ее коррекцию.

Биохимическое обоснование необходимости применения препаратов адеметионина

Увеличение концентрации адеметионина в крови приводит к увеличению синтеза глутатиона.

Литература

1. Байкова В.Н. «Нарушение метаболизма тирозина и процессов свободно-радикального перекисного окисления липидов при злокачественных опухолях у детей»// дисс. д-ра. биол. наук. – НИИ КОРОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.- 1999г.- стр.20-25, 80-120
2. Байкова В.Н., Байков К.Э., Иванов А.В. и др.//Антиоксидантные препараты их место и роль в детской онкологии// «Практикующий врач сегодня» - М., 2005 г. - № 1. – С. 29 – 32.
3. Кошечкин К.А. «Биофармацевтический анализ антидотных свойств кальция фолината при высокодозной химиотерапии метотрексатом остеосаркомы у детей»// дисс.канд. фарм.наук. – ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова.- 2008. – стр. 45-60.
4. Bacci G., Briccoli A., Rocca M. et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide // Ann. Oncol. – 2003. – Vol. 14. – P. 1126–1134.

Адеметионин превращается в гомоцистеин, а тот, в свою очередь, с помощью фермента цистатион-бета-синтетазы – в цистатион, цистеин и в результате – в глутатион. S-аденозил-метионин является активатором цистатион-бета-синтетазы, и при этом – ингибитором метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР).

МТГФР необратимо превращает 5,10-метилентетрагидрофолат в 5-метилтетрагидрофолат. Увеличение содержания S-аденозил-метионина аллостерически снижает активность МТГФР, следовательно – снижает образование 5-метилтетрагидрофолата, и таким образом препятствует образованию метионина из гомоцистеина. Активация же цистатион-бета-синтетазы приводит к увеличению содержания глутатиона [12].

Увеличение концентрации глутатиона обеспечивает антиоксидантную защиту клетки. В случае применения метотрексата, также направленного на снижение образования ТГФ (любого из трех видов), увеличение концентрации S-аденозил-метионина приводит к снижению образования одной из форм ТГФ, и при этом не конкурирует с самим Mtx. В среднем наблюдалось повышенное содержание СОД и ГР в крови во время проведения курса химиотерапии, что свидетельствует о повышении активности ферментной составляющей АОС под токсическим воздействием химиотерапии. В процессе введения Mtx общая токсичность корректируется введением его антидота – лейковорина, а гепатотоксичность введением адеметионина, который путем участия в синтезе глутатиона, улучшает также состояние АОС организма. Таким образом, при проведении соответствующей сопроводительной терапии появляется возможность проведения нескольких последовательных курсов химиотерапии ВД Mtx. Фолиевая кислота способствует регенерации метионина из гомоцистеина, образуящегося в результате метаболизма S-аденозилметионина в организме и усиливает таким образом действие адеметионина.

5. *Barnette P.* High-throughput detection of glutathione s-transferase polymorphic alleles in a pediatric cancer population // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* -2004.-Vol.13., N2. – pp.304-133.
6. *Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.* Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox mediated signaling pathways // *Cell Death and Differentiation.* -2005. - Vol 12. –P.120-124
7. *Guillon M.A., Mary P., Brugière L. et al.* Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases // *BMC Cancer.* -2011.- Vol. 24, N 11. –P. 407.
8. *Huang G., Mills L, Worth LL.* Expression of human glutathione S-transferase P1 mediates the chemoresistance of osteosarcoma cells// *Mol Cancer Ther.* -2007.- Vol 6, N 5.-pp. 1610-1619.
9. *Kidd P.M.* Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review.* -1997. – Vol. 2. –P.155-176.
10. *Li C, Zhou H.* The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense // *Enzyme Res.* 2011.- Vol.38. –p.176.
11. *Mudd H. S., Levy H.L., Kraus J.P.* Disorders of transsulfuration. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* – 2001. - Vol. 2. N 8.-P.2007-2056.
12. *Nevozhaj D. V., Budzynskaya R., Kan'skaya U. et al.* Modern ideas about the mechanism of antineoplastic action of methotrexate and resistance to it// *Pacific Medical Journal.* – 2006. - N. 4. - P. 12-16.
13. *Nicholls D.G., Budd S.L.* Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* – 2000. – N 80. –P. 315-340.
14. *Pasello M., Manara M.C., Michelacci F. et al.* Targeting glutathione-S transferase enzymes in musculoskeletal sarcomas: a promising therapeutic strategy // *Anal Cell Pathol.* – 2011. – Vol. 34, N. 3- P. 13-18.
15. *Salinas-Souza C, Petrilli A.S.* Glutathione S-transferase polymorphisms in osteosarcoma patients // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2010.-Vol. 20, N 8. – P. 507-515.
16. *Sterba J., Dusek L., Demlova R., 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, N 4. – P. 692–700
17. *Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J.* Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium// *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 1797, N (6-7), - P. 890-896.
18. *Zelcer S., Kellick M., Wexler L.H.* Methotrexate levels and outcome in osteosarcoma // *Pediatr Blood Cancer.* 2005 – Vol. 44 – N. 7. – P. 638-642.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Е.Д. Теплякова
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ГОБУ ВПО
ГБУ РО

Контакты
Теплякова
Адрес: 344000
E-mail: elena@ramn.ru
Статья по

Ре

Одобрение
лической
развернутой
козмой и
диастолы

На том числе
рапевтического
из конца
время явля
активация
являются
трофией
цитокинов
ЛЖ. При
лечения, к
вестно, что
термина
личных
щих мех
настоящих
неоптер

К.

Е.Д. Теплякова
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ГОБУ ВПО
ГБУ РО

Р.

О.

consider
lymphot
disruptive
At
their cor