

# ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА У ДЕТЕЙ С ОСТЕОСАРКОМОЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ

Е.В. Неборак, А.В. Лебедева, Е.Г. Головня, Д.В. Нисиченко, А.З. Дзампаев, В.Н. Байкова, М.Д. Алиев

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

**Ключевые слова:** дети, высокодозная химиотерапия, метотрексат, оксидативный стресс, система антиоксидантной защиты, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза, гамма-глутамилтранспептидаза, общий антиоксидантный статус

Одним из факторов токсичности метотрексата (Mtx) при проведении высокодозной химиотерапии (ВДХТ) является его прооксидантное действие. Для компенсации возникающего в организме оксидативного стресса в клинике используют гепатопротекторные препараты.

**Цель работы.** Изучить динамику показателей системы антиоксидантной защиты (АОЗ) у детей при проведении ВДХТ Mtx. Объект исследования: 246 пациентов в возрасте 9–15 лет, получивших ВДХТ Mtx.

**Методы.** Определение активности гамма-глутамил-транспептидазы (ГГТ), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД), общего антиоксидантного статуса (ОАОС) в крови на ключевые часы от начала введения Mtx – 4; 24; 42; 48; определение их биокинетических параметров.

**Результаты.** Для первых 4 курсов выявлены закономерности: активности ГГТ и СОД имеют максимум повышения на 4 ч, а затем снижаются. Активность СОД несколько восстанавливается на 48 ч. Уровни ГР и ОАОС, напротив, минимальны на 4 ч, после чего возрастают до уровня выше референсного. Эти закономерности являются результатом *одновременного действия оксидативного стресса и антиоксидантного эффекта гепатопротектора.*

**Заключение.** Оксидативный стресс, вызванный действием Mtx, может компенсироваться введением адemetионина, который положительно влияет на все измеряемые показатели. После 4 курсов ВДХТ, несмотря на введение адemetионина, степень гепатотоксичности нарастает, что отражается в динамике СОД и ГГТ.

**Введение.** В настоящее время приоритетным направлением в детской онкологии является органосохраняющее лечение. Достигнутые за последние годы успехи в химиотерапии злокачественных опухолей костей, совершенствование хирургической техники, а также внедрение в онкоортопедию новейших технологий позволяют значительно расширить показания к органосохраняющим операциям [1]. Эффективность и токсичность противоопухолевых лекарственных препаратов чаще всего реализуются одними и теми же механизмами действия, и только избирательность их действия в отношении опухолевых клеток определяет широту терапевтического действия. Метотрексат (Mtx) – это классический ингибитор дигидрофолатредуктазы, применяемый для лечения многих онкологических заболеваний.

В частности, использование высокодозной химиотерапии (ВДХТ) Mtx является стандартом в лечении остеосаркомы (ОС) [2]. Короткое воздействие очень высоких концентраций Mtx способствует проникновению препарата в клетки и отсеки, недоступные для более низких доз Mtx. Нежелательным токсическим эффектам Mtx противостоят препараты восстановленной фолиевой кислоты (лейковорин), обеспечивая необходимую избирательность действия Mtx и защищая нормальные ткани. Это позволяет применять в клинике дозы Mtx, которые могли бы привести к летальному исходу, и делает терапию относительно свободной от токсичности [3]. Терапевтическая эффективность и токсичность одинаковых доз Mtx, однако, могут различаться у разных пациентов, что обычно проявляется во внезапной задержке выведения, резком усилении токсичности и опасности для жизни пациента. Именно поэтому Mtx подлежит терапевтическому лекарственному мониторингу (ТЛМ), который заключается в регу-

*Адрес для корреспонденции*

Д.В. Нисиченко  
E-mail: nisichenko@gmail.com

лярном определении концентрации лекарственного средства в сыворотке крови и применяется для выявления его замедленного выведения и оптимизации режима дозирования [4].

Mtx имеет также другие молекулярные мишени своего действия. Одним из механизмов его действия является способность индуцировать оксидативный стресс, ингибируя НАДФ-зависимые ферменты, необходимые для синтеза глутатиона [5, 6]. В обзоре Фролова и соавт. [7] подробно обсуждаются молекулярные механизмы гепатотоксичности, опосредованные индукцией оксидативного стресса, в том числе: ингибирование глутатионредуктазы (ГР) и  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтазы, участвующих в регенерации и продукции восстановленного глутатиона. Авторы делают вывод, что в совокупности эти механизмы приводят к внутриклеточному окислительному стрессу, снижению электрического потенциала митохондрий и гибели клеток. Таким образом, прооксидантное действие Mtx можно рассматривать как основной механизм токсичности в условиях лейковориновой защиты. Для компенсации возникающего в организме оксидативного стресса в клинике применяют гепатопротекторные препараты с регенерирующими и антиоксидантными свойствами типа адemetионина [8].

В связи с вышесказанным ТЛМ Mtx при одновременном определении показателей антиоксидантной защиты (АОЗ), таких как общий антиоксидантный статус (ОАОС), активность гамма-глутамил-транспептидазы (ГГТ), ГР и супероксиддисмутаза (СОД) (Cu/Zn-зависимой), представляется клинически важным. ГГТ – мембраносвязанный фермент – является маркером гепатотоксичности и участвует в поддержании гомеостаза глутатиона, главного антиоксиданта организма, разрушая его с образованием цистеина, который далее вновь превращается в глутатион [9]. Показатель ОАОС характеризует общую концентрацию антиоксидантов в плазме крови. ГР участвует в цикле глутатиона – восстанавливает его окисленную форму. СОД – защищает организм человека от высокотоксичных кислородных радикалов [9]. В нашей предыдущей работе мы подробно изучили и опубликовали данные об изменении показателей АОЗ на протяжении одного курса ВДХТ [10]. Целью настоящей работы стало выявление закономерностей динамики вышеуказанных показателей токсического действия Mtx на фоне проведения 8 курсов ВДХТ Mtx.

### Материалы и методы

В настоящее исследование были включены данные о 246 детях в возрасте от 9 до 15 лет с ОС (средний возраст 12,2 года), получавших лечение в НИИ ДОГ ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 2006 по 2014 г. согласно протоколу комплексной химиотерапии ОС «ОС-2006», разработанному и

утвержденному в НИИ ДОГ. Всего проведено 1050 курсов ВД Mtx. Больные получили от 1 до 8 курсов ВД Mtx в дозе 8 или 12 г/м<sup>2</sup>. Средняя доза Mtx составила  $18,96 \pm 5,2$  г, вводимых на протяжении 4 ч инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно, как описано ранее [10]. Для коррекции оксидативного стресса пациенты также получали адemetионин в дозах, соответствующих их возрасту. В контрольную группу детей (30 человек) вошли практически здоровые пациенты. Распределение их по полу и возрасту в контрольной группе соответствовало таковому в исследуемой группе больных.

Кровь из вены забиралась на 0; 4; 24; 42; 48 ч и обрабатывалась по стандартной методике [10]. Определение Mtx проводили методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа (ФПИА) на анализаторе TdxFlx («Abbott», США). Показатели системы АОЗ – ОАОС, ГГТ, СОД, ГР – определяли на протяжении всего лечения (до начала лечения и в течение каждого из восьми курсов ВДХТ Mtx). Оценку значений ОАОС, активностей СОД, ГР, ГГТ проводили на биохимическом анализаторе ALCYON фирмы «Abbott» (США), как описано ранее [10]. Для статистической обработки результатов исследования использовались процедуры математической статистики, реализованные в программах SPSS.21, MS Excel 2010. Распределение в исследуемых выборках было нормальным, поэтому использовались параметрические методы статистического анализа; критической величиной уровня значимости считали 0,05. Для математического описания процессов изменения показателей системы АОЗ были применены биокинетические расчеты, которые позволили получить количественные характеристики этих процессов. Определение биокинетических параметров (константа скорости реакции первого порядка, период полувыведения) системы АОЗ осуществляли в программе MS Excel 2010 по методу, описанному ранее [11]. Коэффициент достоверности аппроксимации ( $R^2$ ) позволил сделать вывод о том, насколько биокинетический процесс подчиняется экспоненциальной зависимости: модель считается приемлемой при  $R^2 > 0,5$  и достаточно хорошей при  $R^2 > 0,8$  [12]. В качестве референсных критериев использовали пороговые значения активности ГГТ, ОАОС, ГР и СОД, установленные в контрольной группе детей.

### Результаты

В табл. 1 представлены данные о биохимических показателях контрольной группы. Все средние значения в данной группе укладываются в границы нормы.

В группе детей, получавших ВДХТ Mtx, получены следующие данные. Исходная активность ГГТ, измеренная до начала введения Mtx, остается в границах

**Таблица 1. Значения биохимических показателей сыворотки крови у детей контрольной группы (n=30)**

Биохимические показатели	Средние значения	Пределы нормы (справочные данные)	Пороговые значения (контрольная группа)
ГГТ (ед/л)	11,8±1,3	5,0–35,0	15
СОД (ед/л)	963,5±45,8	820–1200	1200
ГР (ед/л)	57,4±12,6	33–73	73
ОАОС (ммоль/л)	1,5±0,12	1,30–1,77	1,77

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm s$ , где  $M$  – среднее,  $s$  – среднеквадратическое отклонение.

нормы на всех курсах, кроме 5-го и 6-го: на них она повышается – на 16 и 10% соответственно (рис. 1). На 8-м курсе исходная активность ГГТ оказывается почти вдвое ниже исходной активности, отмеченной на 1-м курсе. Все остальные точки находятся выше нормы на всех курсах, кроме последнего. Резкое повышение активности ГГТ на 4 ч после начала введения Мtx наблюдается на всех курсах. Поскольку Мtx вводится на протяжении 4 ч, то именно 4 ч является точкой его максимальной концентрации в крови, а значит, максимального терапевтического и токсического эффекта. Поэтому пик активности

ГГТ, связанный с цитолизом клеток печени, на 4 ч закономерен. При этом наблюдается постепенное понижение максимальной активности от курса к курсу – от 91,4 мкмоль/л на 1-м курсе до 30,6 мкмоль/л на 8-м курсе, что составляет 212 и 16,4% от исходного (до начала терапии) значения соответственно (см. рис. 1 а; табл. 2). На 7-м и 8-м курсах это повышение уже не выходит за границы нормы. Такая тенденция может объясняться истощением клеток печени к концу 8 курсов ВДХТ, так что даже при выбросе ГГТ в кровь общая активность ГГТ не превышает референсные значения.

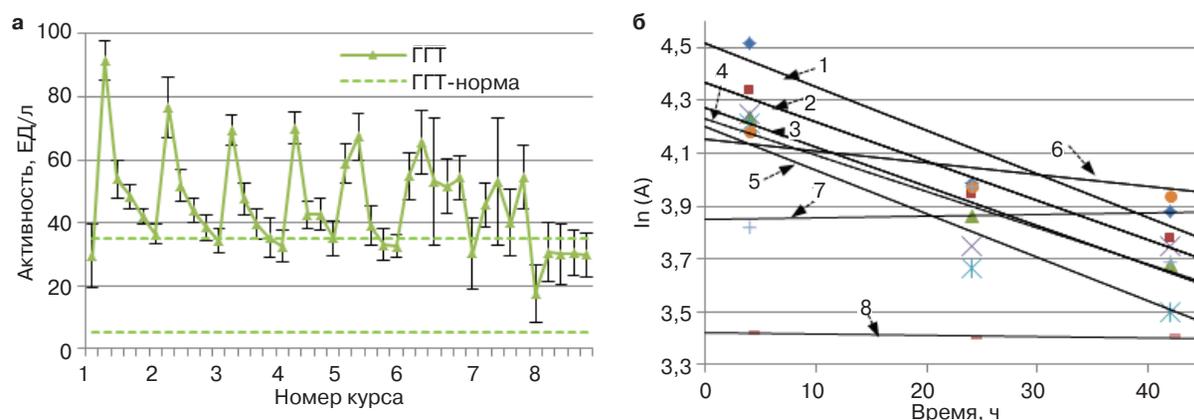


Рис. 1. Динамика активности ГГТ в зависимости от номера курса ВДХТ: а) в координатах «Активность – Номер курса»; б) в полулогарифмических координатах «ln (A) – Время», номера курсов отмечены цифрами на графике

**Таблица 2. Основные биокINETические параметры ГГТ при проведении 8 курсов ВДХТ Мtx**

№ курса	$C_{исх}$ , ЕД/л	$C_{макс час}$ , ЕД/л	$\Delta$ %, по сравнению с $C_{исх}$	Кратность $C_{макс}$ по отношению к норме	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , ч
1	29±10,08	91,4±6,25*	212,5	1,8 N	$-1,65 \cdot 10^2$	22,4
2	36±3,13	76,5±9,6*	111,0	1,5 N	$-1,49 \cdot 10^2$	23,3
3	34±3,75	69,4±5,0*	103,4	1,3 N	$-1,49 \cdot 10^2$	21,4
4	33±5,0	70±5,0*	115,4	1,4 N	$-1,38 \cdot 10^2$	19,8
5	58±6,25	67,4±7,5*	14,7	1,3 N	$-1,65 \cdot 10^2$	15,9
6	55±7,5	65,6±10,0*	19,8	1,3 N	–	–
7	30±11,4	53,1±20,1**	50,7	1 N	–	–
8	17,5±9,25	30,6±9,4*	75,0	1 N	–	–

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm s$ , где  $M$  – среднее,  $s$  – среднеквадратическое отклонение.

Биокинетический подход позволил дать математическое описание динамики ГГТ. Линеаризация в полулогарифмических координатах позволила выявить, что изменения активности ГГТ описываются уравнением первого порядка с 1-го по 5-й курс ( $R^2 > 0,8$ ). На 6-м курсе кинетика данного показателя начинает меньше соответствовать закону экспоненты ( $R^2 = 0,6738$ ), а кривая 7-го курса перестает подчиняться закону экспоненты ( $R^2 = 0,0086$ ). На 8-м курсе происходит относительное восстановление экспоненциальной зависимости ( $R^2 = 0,6196$ ), но угол наклона остается чрезвычайно маленьким, биокинетическая кривая идет почти параллельно оси абсцисс. Как видно из графика (см. рис. 1 а), начиная с 6-го курса, в кинетике фактически отсутствуют какие-либо закономерности, кроме общей тенденции к снижению активности ГГТ. Константы элиминации и периоды полувыведения были рассчитаны только для курсов, подчиняющихся экспоненциальной зависимости (см. табл. 2). Константа элиминации, характеризующая скорость элиминации, последовательно снижается с 1-го по 4-й курс. На 5-м курсе она возрастает до уровня 1-го курса. Период полувыведения увеличивается с 1-го по 4-й курс и понижается до уровня 1-го курса на 5-м. Это происходит на фоне общего снижения кратности величины повышенной ферментативной активности по отношению к норме.

При изучении показателя ОАОС при ВДХТ Мtx было обнаружено, что к 4 ч он резко снижается (рис. 2 а), что также совпадает с максимальной концентрацией Мtx. Начальная величина ОАОС соответствует норме на 1-, 2-, 4-, 6- и 8-м курсах. На 3-, 5- и 7-м курсах она ниже нормы. Диапазон понижения ОАОС на 4 ч составляет от 20 до 43%. Далее следует повышение этого показателя – сначала до первоначального уровня, а затем выше. Компенсаторное повышение составляет от 9% (1-й курс) до 122% (7-й курс) по отношению к исходным (нулевым) значениям.

Биокинетические кривые изменения ОАОС (рис. 2 б) подчиняются закону экспоненты на всех курсах. Период полувосстановления снижается с 1-го по 3-й курс – с почти 25 до 12,3 ч. С 4-го по 8-й курс закономерности в изменении этого показателя не наблюдается. Максимальный период полувосстановления был на 1-м и 6-м курсах – его величина составила более 24 и 20 ч соответственно. В целом диапазон периода полувосстановления колеблется от 10 до 24,7 ч. Действительно, из графика видно, что значения ОАОС достигают половины уровня первоначальных менее чем за сутки. Не выявлено четких закономерностей и для константы восстановления: она растет с 1-го по 3-й курс, затем снижается с 3-го по 5-й, опять растет с 5-го по 7-й, на 8-м вновь снижается. Можно говорить о том, что амплитуда колебаний ОАОС растет, при этом, как следует из графика на рис. 2 а, имеется общая тенденция к повышению ОАОС: общий рост компенсаторного значения с 1,78 мкмоль/л на 1-м курсе до 2,4 мкмоль/л на 7-м курсе составляет около 35%.

При изучении показателей АОЗ было обнаружено, что при ВДХТ Мtx к 4 ч резко снижается не только ОАОС, но и активность ГР (рис. 3 а). К 24 ч на всех курсах, кроме 1-, 6- и 8-го, показатели достигают исходных значений и далее, увеличиваясь, значительно превышают их. По-видимому, это связано с введением пациентам адеметионина, способствующего восстановлению АОЗ организма. Симбатный характер изменения ОАОС и ГР указывает на то, что ГР вносит существенный вклад в поддержание ОАОС. Выявленная статистически значимая прямая корреляция между активностью ГР и ОАОС ( $r = 0,79$ ) также подтверждает правильность этого вывода (табл. 3).

Кинетика изменения активности ГР (рис. 3 б) подчиняется экспоненциальной зависимости, то есть соответствует реакции первого порядка, на всех курсах ВДХТ. Исходная активность перед каждым новым курсом сохраняется в пределах нормы.

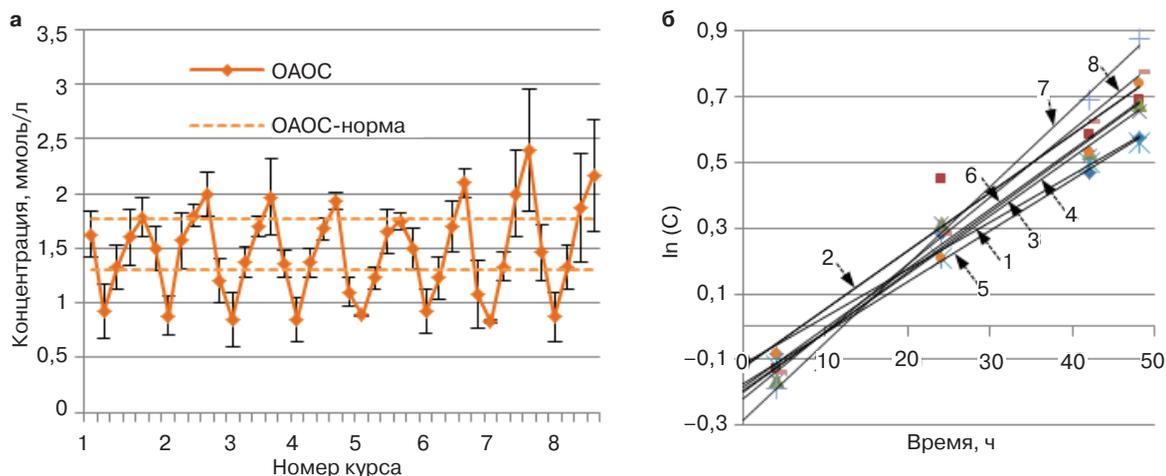
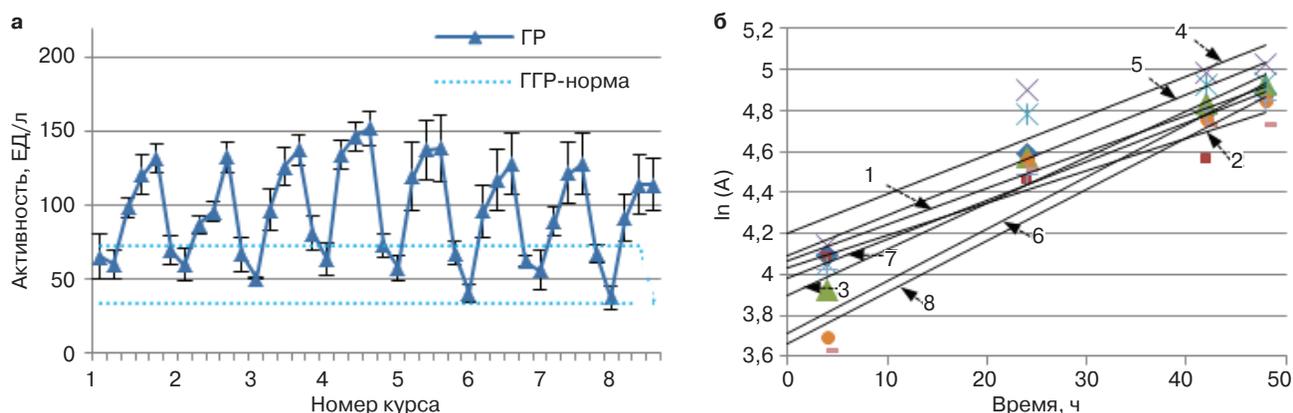


Рис. 2. Динамика ОАОС в зависимости от номера курса ВДХТ Мtx: а) в координатах «Концентрация – Номер курса»; б) в полулогарифмических координатах «ln (C) – Время», номера курсов отмечены цифрами на графике

**Таблица 3. Биокинетические параметры ОАОС при проведении 8 курсов ВДХТ Мtx**

№ курса	$C_{исх}$ , мкмоль/л	$C_{мин}$ , мкмоль/л	$\Delta_{сниж}$ , %, 4 ч	$\Delta_{комп}$ , %, 48 ч	$K_{в}$ , ч <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , ч
1	1,63±0,21	0,92±0,25	43,6	9,2	$1,45 \cdot 10^{-2}$	24,7
2	1,5±0,2	0,88±0,18	41,3	33,3	$1,78 \cdot 10^{-2}$	16,7
3	1,2±0,2	0,85±0,25	29,2	64,2	$1,83 \cdot 10^{-2}$	12,3
4	1,36±0,13	0,85±0,2	37,5	41,9	$1,79 \cdot 10^{-2}$	16,5
5	1,1±0,13	0,89±0,01	19,1	59,1	$1,56 \cdot 10^{-2}$	10,8
6	1,5±0,18	0,92±0,2	38,7	40,0	$1,81 \cdot 10^{-2}$	20,8
7	1,08±0,31	0,83±0,01	23,1	122,2	$2,38 \cdot 10^{-2}$	10,0
8	1,46±0,25	0,87±0,23	40,4	48,6	$2,05 \cdot 10^{-2}$	18,1

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm s$ , где  $M$  – среднее,  $s$  – среднеквадратичное отклонение.



**Рис. 3. Динамика ГР в зависимости от номера курса ВДХТ Мtx: а) в координатах «Активность – Номер курса»; б) в полулогарифмических координатах «ln (A) – Время», номера курсов отмечены цифрами на графике**

Минимум активности на 4 ч также не выходит за пределы нижней границы нормы. Компенсаторное повышение активности ГР к 48 ч составляет от 69 до 103% по отношению к исходной активности. Однако к 8-му курсу наблюдается максимальное из всех курсов понижение активности ГР на 4 ч как абсолютное, так и относительное – до 44%, составляя 37,3 ЕД/л, то есть происходит углубление действия оксидативного стресса от курса к курсу. Это свидетельствует об истощении компенсаторных механизмов организма, которые теперь работают на

пределе. В табл. 4 представлены основные биокинетические параметры ГР.

Период полувосстановления активности ГР составляет от 3,5 до 11,8 ч без выраженной зависимости от номера курса (см. табл. 4). Константа, а значит, скорость полувосстановления имеет тенденцию к увеличению – с  $1,76 \cdot 10^{-2}$  на первом курсе до  $2,49 \cdot 10^{-2}$  на последнем. Несмотря на то что вторая после максимальной константа приходится на последний курс, период полувосстановления в данном случае самый длинный. Этот факт объясня-

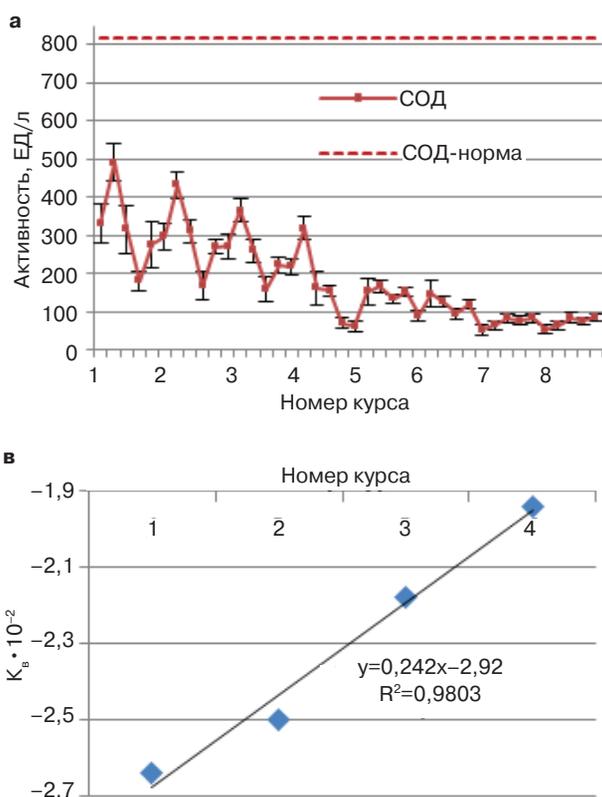
**Таблица 4. Биокинетические параметры ГР**

№ курса	$A_{исх}$ , ЕД/л	$A_{мин}$ , ЕД/л	$\Delta_{сниж}$ , %, 4 ч	$A_{макс 48}$ , ЕД/л	$\Delta_{комп}$ , %, 48 ч	$K_{п/в}$ , ч <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , ч
1	64,8±15,2	59,7±9,76	7,9	132±9,6	103,7	$1,76 \cdot 10^{-2}$	3,5
2	69,3±9,44	59,4±11,2	14,3	132,8±10,4	91,6	$1,59 \cdot 10^{-2}$	8,5
3	66,4±12	50,4±0,6	24,1	137,6±10,4	107,2	$2,24 \cdot 10^{-2}$	7,4
4	81,0±12	63,2±11,2	21,9	151,8±11,2	87,5	$1,92 \cdot 10^{-2}$	4,1
5	72,8±8	57,6±8,32	20,9	138,4±22,24	90,1	$1,96 \cdot 10^{-2}$	4,3
6	67,4±8	40,2±6,4	40,4	128,0±20,8	89,9	$2,55 \cdot 10^{-2}$	10,6
7	62,1±3,2	56,0±13,6	9,8	128,0±20,8	106,2	$1,90 \cdot 10^{-2}$	5,2
8	67,2±6,4	37,6±8	44,0	113,6±17,76	69,0	$2,49 \cdot 10^{-2}$	11,8

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm s$ , где  $M$  – среднее,  $s$  – среднеквадратичное отклонение.

ется наибольшим снижением исходной активности ГР – на 44% – после начала проведения ВДХТ на 8-м курсе. Компенсаторное повышение активности ГР по сравнению с исходными значениями к 48 составляет от 69 до 106%, (от 113,6 до 151,8 ЕД/л). Минимальное компенсаторное относительное повышение показано также для 8-го курса. Очевидно, степень компенсации зависит от функциональных ресурсов организма. Период полувосстановления также имеет тенденцию к увеличению, обратно пропорционально скорости восстановления.

Данные, полученные для СОД, представлены на рис. 4. Исходные показатели активности СОД понижены на всех курсах.

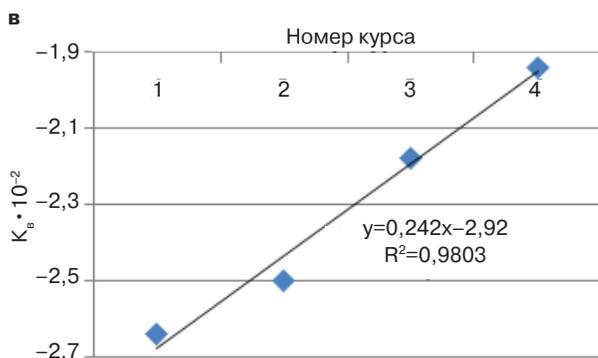
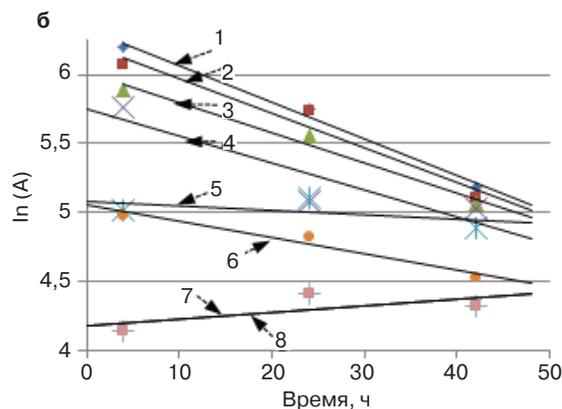


зависимости с 1-го по 4-й курс (рис. 4 в). Два последних курса терапии характеризуются минимальным повышением активности СОД.

Очевидно, что состояние антиоксидантной системы (АОС) и в первую очередь активность СОД являются показателями токсических осложнений при терапии Мtx ОС у детей.

### Обсуждение

В настоящей работе мы изучили изменения показателей системы АОЗ организма детей при проведении ВДХТ Мtx. Полученные результаты согласуются с данными, опубликованными ранее [10], и позволяют сделать вывод, что ВДХТ Мtx обладает



**Рис. 4.** Динамика СОД в зависимости от номера курса ВДХТ Мtx: а) в координатах «Активность (А) – Номер курса»; б) в полулогарифмических координатах «ln (С) – Время», номера курсов отмечены цифрами на графике; в) прямолинейная зависимость константы восстановления СОД с 4 по 42 ч на 1–4-м курсах ВДХТ Мtx

Кинетика изменения концентрации СОД подчиняется экспоненциальной зависимости только в интервале времени с 4 по 42 ч, исключение составляют 5-, 7- и 8-й курсы, на которых кинетика СОД не подчиняется экспоненциальной зависимости. Из графиков на рис. 4 а видно, что максимум повышения СОД приходится на 4 ч на 1–4-м курсах, на 5-м курсе он перемещается на 24 ч, но абсолютные значения снижены по сравнению с первым курсом более чем в 2 раза. Как и в случае с ГГТ, кинетика СОД перестает подчиняться четким закономерностям, начиная с 5-го курса, и графически приобретает вид затухающих колебаний. Из рис. 4 б видно, что угол наклона, то есть абсолютная величина константы скорости восстановления, уменьшается с 1-го по 4-й курс. Это уменьшение подчиняется прямолинейной

существенным прооксидантным действием на весь организм, которое усиливается от курса к курсу.

Известно, что ГГТ, будучи маркером гепатотоксичности, имеет также большое значение в системе АОЗ. В частности, этот фермент играет ключевую роль в гомеостазе глутатиона, разрушая внеклеточный глутатион с образованием цистеина – лимитирующего субстрата для внутриклеточного синтеза глутатиона *de novo* [13]. Показано также, что его повышенная экспрессия ГГТ в опухолевых тканях коррелирует с их лекарственной резистентностью [14]. В нашем исследовании максимум повышения активности ГГТ на 4 ч от начала введения Мtx, по-видимому, отражает в большей степени гепатотоксическое действие этого цитостатика, проявляющееся в цитолизе гепатоцитов.

В работе [15] оценивалась гепатотоксичность ВДХТ Mtx. Активность ГГТ была повышена в 73% случаев, при этом в 23% она была повышена в 2,5 раза по отношению к верхней границе нормы. В нашем исследовании максимальное повышение составило 1,8 раза от верхней границы нормы, что не противоречит данным литературы. Период полувыведения ГГТ составляет примерно 3–7 дней [13]. В нашем случае период полувыведения ГГТ укладывался в эту норму и даже превосходил ее. В обзоре [16] продемонстрировано, что SAM также способствует понижению концентрации ГГТ в крови. Таким образом, наши результаты подтверждают положительное действие адemetионина на такой показатель гепатотоксичности и АОЗ, как ГГТ. На последних курсах имеет место истощение функциональных резервов организма и суммирование гепатотоксического действия Mtx, поэтому, несмотря на резкий скачок активности ГГТ после введения Mtx, она остается в пределах нормы и далее не изменяется в ответ на действие адemetионина, как на предыдущих курсах.

Активность антиоксидантных ферментов зависит от внутриклеточного редокс-статуса [17]. Экспрессия генов ГР регулируется редокс-чувствительными транскрипционными факторами и повышается в ответ на прооксидантные стимулы [18]. В экспериментах на животных Khalil и соавт. установлено ингибирующее действие Mtx на ферменты ГР и СОД [19]. В работе Akkemiki и соавт. [20] показано *in vitro* прямое неконкурентное ингибирующее действие Mtx на ГР. Наши результаты показали кратковременное снижение активности ГР с последующим ее повышением на всех курсах до уровня выше референсного. Таким образом, можно заключить, что понижение активности ГР происходит за счет действия Mtx, а последующее ее повышение может быть обусловлено несколькими факторами: постепенное выведение Mtx, индукция генов ГР редокс-чувствительными факторами и введение SAM (адemetионина), проявляющего антиоксидантные свойства. Поскольку повышение активности ГР происходит быстро, то можно предполагать, что основной вклад в этот эффект принадлежит SAM. В пользу данного вывода свидетельствует тот факт, что SAM вызывает значимое повышение активности ГР и уровня общего глутатиона, а также активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы в печени в эксперименте *in vivo* [21, 22]. При введении SAM вслед за гепатотоксическим и прооксидантным агентом ацетаминофеном значительно сниженная активность ГР повышалась до уровня, превышающего контрольные значения, уже к 4 ч после его введения. Ключевым механизмом, через который реализуется антиоксидантная активность

SAM, считается аллостерическая стабилизация цистатионин-бета-синтазы, участвующей в синтезе глутатиона [23]. Кроме того, он сам является предшественником антиоксидантов глутатиона, таурина, цистеина. Именно благодаря этому наблюдается последовательное повышение ОАОС после 4 ч от начала введения Mtx.

Считается, что гены СОД экспрессируются конститутивно [24]. Поскольку измерение активности СОД в нашем исследовании проводилось в эритроцитарной массе и пересчитывалась в ЕД/л, ее пониженная исходная активность у больных ОС, по-видимому, связана с имеющейся у этих пациентов анемией. Повышение активности СОД к 4 ч в нашем исследовании совпадает с минимальным значением ОАОС. В работе [25] показан механизм активации Cu/Zn-зависимой СОД за счет увеличения степени диссоциации ее агрегированных форм в присутствии активных форм кислорода до функционально активных мономеров. Однако чрезмерное повышение концентрации свободных радикалов способно подавлять активность СОД. Активация СОД к 4 ч может быть вызвана оксидативным стрессом на фоне проводимой ВДХТ Mtx. По-видимому, в данном случае имеет место регуляция активности уровнем супероксида, механизм которой описан в работе [25]. На фоне последовательного повышения активности ГР и ОАОС можно говорить о снижении уровня окислительного стресса и соответственно уровня супероксида. Таким образом, дальнейшее снижение активности СОД на фоне повышения ОАОС может быть связано с этим же редокс-зависимым механизмом (снижение активности происходит на фоне снижения уровня АФК) или с действием самого Mtx [19]. В работе [26] активность СОД у животных сохранялась пониженной на 6-й день после введения Mtx, что свидетельствует о том, что сам Mtx не активирует СОД в нормальных тканях. Напротив, под действием SAM значительно повышается активность не только ГР, но и СОД [22]. Таким образом, повторное повышение активности СОД на фоне повышенного ОАОС скорее всего связано именно с действием SAM. Так, в вышеупомянутой работе Brown и соавт. [22] почти двукратно сниженная активность СОД восстанавливалась практически до исходного уровня, не превышая его. Меньшая степень восстановления СОД по сравнению с ГР говорит о ее меньшей чувствительности к действию SAM, чем у ГР. Это согласуется с полученными нами данными об отсроченном (только к 48 ч) и неполном восстановлении активности СОД.

Таким образом, наши результаты подтверждают значимое антиоксидантное действие адemetионина. Мы заключаем, что введение адemetионина оказывает превентивное действие в отношении окисли-

тельного стресса на фоне проводимой ВДХТ, что находит отражение в повышении таких показателей, как ОАОС, ГР и СОД.

Ранее при изучении динамики маркера гепатотоксичности Мtx гомоцистеина нами было установлено, что в изменении его концентрации можно выделить тетрады: концентрация в сыворотке последовательно снижается с 1-го по 4-й курс, тогда как 5-й курс нарушает эту закономерность [27]. Стоит отметить, что наше исследование тоже позволяет говорить о неких тетрадах в отношении кинетики проанализированных показателей. В частности, описанные в данной работе биокинетические закономерности для ГГТ, ОАОС, ГР и СОД справедливы только для первых 4 курсов. Начиная с 5-го курса, эти закономерности отсутствуют для ГГТ и СОД, а кинетика ГР и ОАОС в некоторой степени отличается от первых 4 курсов. Тем не менее биокинетика последних двух показателей (ГР и ОАОС), наиболее чувствительных к действию адemetионина, сохраняет свою прямолинейность в полулогарифмических координатах на протяжении всех 8 курсов. Из этого можно сделать вывод, что стабильность биокинетических параметров поддерживается адemetионином. Можно постулировать усиление токсичности ВДХТ Мtx после 4-го курса, что проявляется клинически, которое уже не может быть скомпенсировано антиоксидантной терапией в той мере, какая имела место на первых 4 курсах.

### Заключение

Наше исследование показало, что ВДХТ Мtx вызывает сильный оксидативный стресс в организме пациентов. Адemetионин – гепатопротектор с регенераторными и антиоксидантными свойствами. Выявленные закономерности динамики показателей АОЗ при проведении нескольких курсов ВДХТ Мtx отражают взаимодействие этих двух факторов – прооксидантного действия Мtx и антиоксидантного действия адemetионина. Наиболее чувствительные к действию адemetионина показатели (ОАОС, ГР) в большей степени отражают его положительное действие на организм. Менее чувствительные к нему показатели (ГГТ, СОД) свидетельствуют об усугублении оксидативного стресса от курса к курсу. Таким образом, оксидативный стресс может быть в некоторой степени скомпенсирован введением гепатопротекторов с антиоксидантным действием типа адemetионина, который положительно влияет на все проанализированные показатели. Однако при множественных курсах ВДХТ функциональные резервы организма постепенно истощаются, на что указывает отсутствие восстановления такого важного параметра, как активность СОД, и резкое снижение ГГТ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Дзампаев А.З., Нисиченко Д.В., Хестанов Д.Б., Алиев М.Д. Эндотоксикоз как приоритетное направление в комбинированном лечении костных сарком у детей. *Онкопедиатрия*. 2014, № 1, с. 50-53.
2. Jaffe N., Gorlick R. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease – Time for Final Acceptance. *J. of Clin. Onc.* 2008, v. 28, No. 27, p. 4365-4366.
3. Гудман А., Гилман А.Г. Клиническая фармакология. Кн. 3. Пер. с англ. М.: ППП, 2006, с. 10791083.
4. Milone M.C. Therapeutic Drug Monitoring of Selected Anticancer Drugs: Pharmacogenomics Issues. A. Dasgupta. *Therapeutic Drug Monitoring*. Elsevier Inc. 2012, p. 291-321.
5. Uzar E., Koyuncuoglu H.R. et al. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Cell Biochem.* 2006, v. 291 (1-2), p. 63-68.
6. Vardi N., Parlakpınar H., Ates B. Beneficial effects of chlorogenic acid on methotrexate-induced cerebellar Purkinje cell damage in rats. *J. Chem. Neuroanat.* 2012, v. 43 (1), p. 43-47.
7. Фролов Б.А., Калинина О.В., Кириллова А.В., Штиль А.А. Преодоление гепатотоксичности метотрексата: роль тритерпеноидов. *Клиническая онкогематология*. 2013, т 6, № 1, с. 1-10.
8. Байкова В.Н., Байков К.Э., Иванов А.В., Кошечкин К.А., Калинкина А.В., Паршина Н.А., Арзамасцев А.П., Дурнов Л.А. Антиоксидантные препараты, их место и роль в детской онкологии. *Практикующий врач сегодня*. М., 2005, № 1, с. 29-32.
9. Rashid K., Sinha K., Sil P.C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem. Toxicol.* 2013, v. 62, p. 584-600. DOI: 10.1016/j.fct.2013.09.026. Review.
10. Погодина Е.А., Стрижевская А.М., Шварова А.В., Иванова Н.М., Байкова В.Н. Изменение состояния антиоксидантной защиты при высокодозной химиотерапии метотрексатом у детей с остеосаркомой. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2013, т. 24, № 1, с. 19-23.
11. Денисова Н.А., Плетенева Т.В., Байкова В.Н., Березов Т.Т. Кинетические характеристики биохимических показателей при приеме препарата «Консупрен» после аллогенной трансплантации почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004, т. 138, № 10, с. 458-462.
12. Ершов Э.Б. Распространение коэффициента детерминации на общий случай линейной регрессии, оцениваемой с помощью различных версий метода наименьших квадратов (рус., англ.). *ЦЭМИ РАН Экономика и математические методы*. М.: ЦЭМИ РАН. 2002, т. 38, вып. 3, с. 107-120.
13. Jiang Sh., Jiang D., Tao Y. Experimental Cardiology: Review Role of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp. Clin. Cardiol.* 2013, v. 18 (1), p. 53-56.
14. Hanigan M.H. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv. Cancer Res.* 2014, v. 122, p. 103-41. DOI: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00003-7.
15. Holmboe L., Andersen A.M., Mørkrød L., Slørdal L., Hall K.S. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2012, v. 73 (1), p. 106-114. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04054.x.
16. Quentin M. Anstee, Christopher P. Day S-adenosylmethionine (SAMe) therapy in liver disease: A review of current evidence and clinical utility. *J. Hepatol.* 2012, v. 57 (5), p. 1097-109. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.04.041.
17. Sies H., Jones D.P. Oxidative stress. *Encyclopedia of stress*. Eds. Fink G. San Diego: Elsevier. 2007, v. 3, p. 45-48.
18. Jones C.I., Zhu H., Martin S.F. et al. Regulation of antioxidants and phase 2 enzymes by shear-induced reactive oxygen

- species in endothelial cells. *Ann. Biomed. Eng.* 2007, v. 35, No. 5, p. 683-693.
19. Khalil F.A., El-Kirsh A.A., Ali Kamel E., El-Rahmany N.G. Beneficial effort of propolis extract (bee glue) against methotrexate-induced stress in liver and brain of albino rats. *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences.* 2013 (2), p. 111-113.
  20. Akkemiki E., Şenturk M., Ozgeris F.B., Taser P., Ciftci M. *In vitro* effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turk. J. Med. Sci.* 2011, v. 41 (2), p. 235-241.
  21. Gonzalez-Correa J.A., De La Cruz J.P., Martin-Aurioles E., Lopez-Egea M.A., Ortiz P., Sanchez de la Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on hepatic and renal oxidative stress in an experimental model of acute biliary obstruction in rats. *Hepatology.* 1997, v. 26 (1), p. 121-127.
  22. Brown M., Ball J.G., Wright M.S., Van Meter S., Valentovic M.A. Novel protective mechanisms for S-adenosyl-L-methionine against acetaminophen hepatotoxicity: improvement of key antioxidant enzymatic function. *Toxicol. Lett.* 2012, v. 212 (3), p. 320-328. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.05.018. Epub 2012 Jun 5.
  23. Pey A.L., Majtan T., Sanchez-Ruiz J.M., Kraus J.P. Human cystathionine {beta}-synthase (CBS) contains two classes of binding sites for S-adenosylmethionine (SAM): complex regulation of CBS activity and stability by SAM. *Biochem. J.* 2013, v. 449 (1), p. 109-121.
  24. Miao L., Clair D.K. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, v. 47 (4), p. 344-356.
  25. Милякова М.Н., Шабанов В.В. Возможный механизм и патофизиологическая значимость регуляции активности супероксиддисмутазы свободными радикалами кислорода. *Биомедицинская химия.* 2006, т. 52, вып. 2, с. 130-137.
  26. Somi M.H., Hajipour B., Abad G.D., Hemmati M.R., Ghabili K., Khodadadi A., Vatankhah A.M. Protective role of lipoic acid on methotrexate induced intestinal damage in rabbit model. *Indian J. Gastroenterol.* 2011, v. 30 (1), p. 38-40.
  27. Стрижевская А.М., Головня Е.Г., Дзампаев А.З., Байкова В.Н. Биохимические критерии токсичности терапии высокими дозами метотрексата у детей с остеосаркомой. *Успехи молекулярной онкологии.* 2015, № 1, с. 82-89.

Статья поступила 02.02.2017 г., принята к печати 16.02.2017 г.  
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

## DYNAMICS OF ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM INDICATORS IN CHILDREN WITH OSTEOSARCOMA DURING HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY WITH METHOTREXATE

Neborak E.V., Lebedeva A.V., Golovnya E.G., Nisichenko D.V., Dzampaev A.Z., Baykova V.N., Aliev M.D.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

**Key words:** children, high-dose chemotherapy, methotrexate, oxidative stress, antioxidant defense system, glutathione reductase, superoxide dismutase, gamma-glutamyl-transpeptidase, total antioxidant status

One of the factors of Mtx toxicity during high-dose chemotherapy is its prooxidant action. For the compensation of arising oxidative stress such antioxidant drugs as ademetionin are used in clinical. The purpose of the study: investigation of the dynamics of antioxidant defense system indicators in children during high-dose chemotherapy. The object of study: 246 patients who received high-dose Mtx chemotherapy, aged 9–15 years.

**Methods.** Determination of GGT, GR, SOD and OAOS in blood on key hours from the start of Mtx administration – 4, 24, 42, 48; determination of their biokinetics parameters.

**Results.** For the first 4 courses the regularities are found: GGT activity and SOD have a maximum increase in the 4<sup>th</sup> hour, further reduced. SOD activity recovers slightly up to 48<sup>th</sup> hour. Levels of GR and OAOS are the lowest for the 4<sup>th</sup> hour, then increased to a level above the reference one.

**Conclusion.** Oxidative stress caused by the action of Mtx, can be compensated by coadministration of ademetionine, which has a positive effect on all measured indicators. After 4 courses of high-dose Mtx chemotherapy hepatotoxicity increases despite of treatment with ademetionine the degree of hepatotoxicity is growing, which finds the reflection in the dynamics of SOD and GGT.