

Т. В. Попруженко, С. П. Борис, О. В. Красько

МЕТОТРЕКСАТ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И РИСК РАЗВИТИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО МУКОЗИТА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Для оценки возможной роли прямого воздействия метотрексата (МТХ) на слизистую оболочку полости рта (СОПР) в развитии орального мукозита (ОМ) при противоопухолевой химиотерапии (ХТ) изучены параметры концентрации МТХ в биожидкостях 21 ребенка в течение 27 эпизодов ХТ с МТХ в режимах 1, 2 или 5 г/м² площади поверхности тела за 24 ч (в т. ч. 4 эпизодов с ОМ) – в образцах ротовой жидкости (РЖ), взятых на 6-й, 12-й, 24-й, 42-й, 48-й, 54-й ч, и крови, взятых на 42-й, 48-й, 54-й ч от начала инфузии МТХ.

Установлено, экскреция МТХ в полость рта повторяет алгоритм клиренса МТХ в крови, при этом концентрация МТХ в РЖ составляет, как правило, менее 1/10 от таковой в крови, в течение первых суток находится на децимикромольном, а затем до 54 ч – на сантимикромольном уровнях. У детей, имевших впоследствии ОМ, концентрация МТХ в РЖ на 6-й, 12-й и 24-й ч была вдвое ниже, чем у детей без ОМ ($p < 0,001$), в последующие часы значимых различий в параметрах этих подгрупп не было. Эти данные не поддерживают гипотезу об участии слюнного МТХ в патогенезе ОМ.

Ключевые слова: онкология, гематология, химиотерапия, дети, оральный мукозит, высокодозный метотрексат, слюна, кровь.

T. V. Papruzhenka, S. P. Borys, O. V. Krasko

METHOTREXATE IN SALIVA AND RISK IN THE DEVELOPMENT OF CHEMOTHERAPEUTIC MUCOSITIS IN CHILDREN

The aim of the study was to assess the possible direct effect of anticancer therapy with methotrexate (MTX) in bio liquids on the oral mucosa in the development of oral mucositis (OM). Twenty one children and adolescents participated in this study. Chemotherapy with MTX was administered in the following concentrations of 1, 2, 5 g/m² of body surface area during 24 hours (including four episodes with OM). Twenty seven episodes of chemotherapy with high dose MTX were assessed in the samples of saliva on the 6th, 12, 24, 42, 48, 54 hour from the start of infusion and in the samples of blood on the 42, 48, 54 hour from the start of infusion.

It was determined that excretion of MTX in the oral cavity repeated its clearance in blood. MTX concentration in saliva was less than 1/10 from its concentration in blood. During the first day, MTX concentration had decimicromol level and then until 54 hour it had santimicromol level. MTX concentration in saliva on the 6, 12, 24 hour in children with OM was lower by 2 times than in children without OM ($p < 0,001$). There was no significant difference in those parameters between two groups (with or without OM) in the following observed hours. This data does not support hypothesis concerning involvement of salivary MTX in OM pathogenesis.

Keywords: oncology, hematology, chemotherapy, children, oral mucositis, high dose methotrexate, saliva, blood.

Оральный мукозит (ОМ) сопровождает 20–90 % эпизодов химиотерапии (ХТ) пациентов с онкологическими заболеваниями, значительно ухудшает качество жизни и повышает стоимость лечения [3], при этом вопросы патогенеза ОМ и проблема разработки успешного протокола менеджмента ОМ все еще остаются актуальными [4].

Предположения о механизмах инициации и развития ОМ делят на три группы, выделяя факторы, связанные с основным заболеванием, пациентом и ХТ. В последней группе основным объектом внимания является метотрексат (МТХ) – антиметаболит группы структурных аналогов фолиевой кислоты, противоопухолевое (цитостатическое), иммунодепрессивное лекарственное средство. МТХ, будучи конкурентным аналогом фолиевой кислоты, подавляет синтез и репарацию ДНК, блокируя клеточный митоз [4]. По одной из версий ОМ может быть следствием прямого контакта МТХ, находящегося в ротовой жидкости (РЖ), со слизистой оболочкой полости рта (СОПР) [3]. Однако сведения об экскреции МТХ со слюной и его влиянии на возникновение ОМ немногочисленны и противоречивы.

Целью исследования стало изучение присутствия МТХ в РЖ и его влияния на возникновение ОМ в период противоопухолевой ХТ детей.

Материал и методы. В проспективном исследовании, одобренном комитетом по этике ГУ РНПЦДОГИИ, принял участие 21 пациент, получавший в 2014 г. в ГУ РНПЦДОГИИ лечение по поводу острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) или неходжкинской лимфомы (НХЛ) по протоколам ALL-MB 2008, ALL-REZ BFM 2002, B-NHL-M 2010, NHL BFM 95, включающим введение высокодозного МТХ.

У всех пациентов в 27 эпизодах ХТ с внутривенным введением МТХ в дозах 1, 2 или 5 г/м² площади поверхности тела за 24 ч, были взяты образцы РЖ на 6-й, 12-й, 24-й, 42-й, 48-й, 54-й часы, а также образцы крови на 42-й, 48-й, 54-й часы от начала введения МТХ для определения в них концентрации МТХ стандартным методом флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (ФПИА) на оборудовании TdX и Architect (Abbott, США) при помощи набора «MTX reagent pas» (Abbott, США) в соответствии с инструкциями производителя.

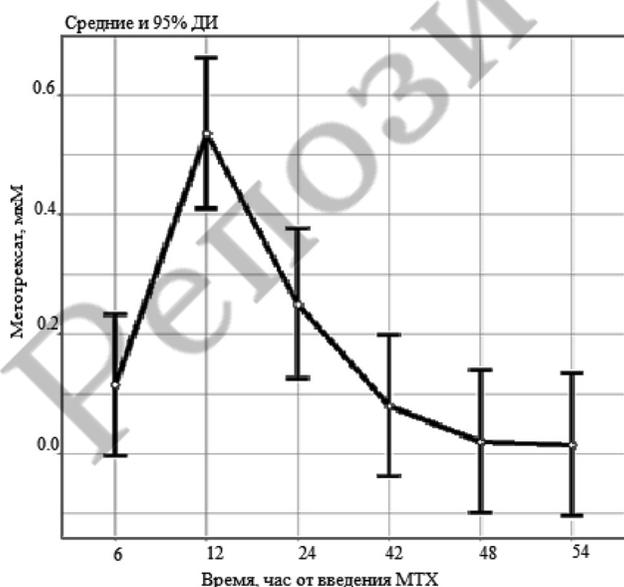
Для изучения параметров концентрации МТХ в РЖ использовали результаты всех измерений. В анализ возможного «местного» влияния МТХ на состояние СОПР включили данные о концентрации МТХ в РЖ восьми пациентов, у которых введение МТХ в дозе 2 г/м² сопровождалось ОМ (подгруппа ОМ+, $n = 4$) или не вызывало изменений СОПР (подгруппа ОМ–, $n = 4$).

Анализ динамики концентрации МТХ в образцах проводили с помощью линейной модели смешанных эффектов, на основе которой рассчитывали средние величины (М) и доверительные интервалы для них (95 % ДИ). Анализ корреляции уровней концентрации МТХ в крови и РЖ проводили по отдельным точкам времени (42-й, 48-й и 54-й часы) методом Спирмена (r). Расчеты выполнены в статистическом пакете R (версия 3.1.3) с использованием пакетов lme4 и lmerTest. Результаты анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Уровни концентрации МТХ в образцах РЖ варьировали в диапазоне от 0 (в некоторых образцах, взятых на 6-й ч от начала введения МТХ в дозе 1 г/м², а также на 42-й, 48-й и 54-й часы от начала введения разных доз до 1,015 мкМ (на 12-й час введения МТХ в дозе 2 г/м²). Общая тенденция динамики показателей – достижение максимума к 12-му часу и медленное снижение к 48-54-му часам – иллюстрируется графиком (см. рисунок), построенным по данным, полученным в восьми эпизодах ХТ с введением МТХ в дозе 2 г/м².

Содержание МТХ в РЖ во всех случаях было ниже такового в крови. Соотношение параметров в парах «РЖ/кровь» в образцах, взятых на 42-й, 48-й и 54-й часы составило ряды Me (мин...макс) = 0,08 (0...0,30); 0,02 (0...0,41) и 0,04 (0...0,7) соответственно. Корреляция между концентрацией МТХ в РЖ и в крови была ярко выражена в образцах, полученных на 42-й час ($r = 0,72$, $p < 0,001$); в последующие часы сила связи снижалась (на 48-й час – $r = 0,3$, $p = 0,150$; на 54-й час – $r = 0,26$, $p = 0,253$); кроме того, обнаружена значимая связь между концентрацией МТХ в РЖ, взятой на 48-й час, и в крови, полученной на 42-й час ($r = 0,57$, $p = 0,013$).

Динамика концентрации МТХ в РЖ в эпизодах ХТ, протекавших с ОМ и без него, представлена в таблице. В период инфузии концентрация МТХ была значительно выше в подгруппе ОМ-, чем в подгруппе ОМ+; начиная с 42-го часа, возникла некоторая тенденция к обратному соотношению показателей, не достигшая, однако, уровня статистической значимости.



Динамика концентрации МТХ в РЖ пациентов, получавших внутривенные инфузии МТХ (2 г/м² за 24 ч)

Содержание МТХ в РЖ пациентов в эпизодах ХТ, в дальнейшем осложненных и неосложненных ОМ

Время от начала введения МТХ (ч)	Концентрация МТХ, М (95 % ДИ для среднего) мкМ		p
	ОМ+	ОМ-	
6	0,09 (0–0,22)	0,15 (0,02–0,275)	0,532
12	0,23 (0,08–0,38)	0,76 (0,63–0,89)	<0,001
24	0,17 (0,02–0,32)	0,31 (0,18–0,44)	<0,001
42	0,12 (0–0,25)	0,05 (0–0,18)	0,454
48	0,04 (0–0,17)	0,01 (0–0,14)	0,767
54	0,02 (0–0,15)	0,01 (0–0,14)	0,925

Предположение об участии МТХ, экскретируемого со слюной и десневой жидкостью в полость рта, в патогенезе ОМ [3], лежащее в основе ряда попыток снизить риск ОМ изменением параметров саливации, защитой или очищением поверхности СОПР [7], все еще не верифицировано – как в части параметров выведения МТХ в полость рта, так и в отношении связи между оральной экспозицией МТХ и ОМ.

Механизмы слюнной экскреции МТХ не описаны. Известно, что МТХ – небольшая (454 Да) гидрофильная ($\log P = -1,85$) молекула, отрицательно заряженная при физиологическом уровне pH, может пассивно диффундировать через клеточные мембраны только при концентрации МТХ ≥ 100 мкМ, и что в обычных условиях перемещение МТХ в клетку и из нее выполняется активным фолат-специфическим транспортом, имеющего ограничения в емкости: так, перенос МТХ при помощи «вездесущих» (но в слюнных железах не описанных) транспортеров SLC19A1 насыщается при концентрации МТХ = 1–5 мкМ [4]. Обсуждая показатели концентрации МТХ в РЖ, важно иметь в виду зависимость этого параметра от объема РЖ – относительно небольшого, но заметно варьирующего в связи с индивидуальными особенностями саливации.

Параметры концентрации МТХ в оральных жидкостях прежде были описаны в нескольких отчетах [5, 7, 8, 10]; в сравнении с ними образцы РЖ без МТХ в нашем исследовании были гораздо более редкими, а показатели концентрации МТХ – более высокими (до 1,02 против 0,07 мкМ [5]), что можно объяснить различиями в дозах МТХ. Анализ концентрации МТХ в РЖ во времени позволил получить кривую слюнной экскреции МТХ, сходную по форме с таковой гематологического клиренса МТХ [4]. В упомянутых публикациях соотношение концентрации МТХ в РЖ и в крови описано как 0,01 [7] – 0,05 [10] – 0,2 [8], в нашем материале – от 0,00 до 0,7 с Me = 0,02 ÷ 0,08, вне связи со временем забора образцов и, соответственно, с концентрацией МТХ в крови. Нами выявлена прямая связь между показателями концентрации МТХ в одновременно взятых образцах РЖ и крови (наиболее ярко – в материалах 42-го ч), а также корреляция между концентрацией МТХ в РЖ и в предыдущих по времени забора образцах крови, что позволяет уверенно говорить о явлении орального клиренса МТХ (прежде связь такого рода была определена только на 100-й [8], но не на 20-й и 44-й [10] часы).

Таким образом, полученные клинико-лабораторные данные позволяют утверждать, что МТХ выводится со слюной, повторяя во времени кривую гематологического клиренса МТХ на относительно низких, но достаточных для воздействия на жизнедеятельность клеток [6] уровнях концентрации.

Токсическое действие МТХ определяется блокадой клеточного цикла в S-фазе (синтез ДНК) и, в высоких концентрациях, в G1-фазе (синтез белка, рост) [4]. Известно, что в многослойном плоском эпителии СОПР к делению способны только клетки самого глубокого, базального слоя; молодые эпителиоциты мигрируют к поверхности на смену стареющим клеткам, в пути созревают – увеличиваются в размере и уплощаются, синтезируют прочные белки и относительно водонепроницаемые липидные субстанции для обновления физико-механического барьера между полостью рта и внутренней средой, а затем, утратив большинство органелл, заканчивают жизнь апоптозом и слущиваются. Если верно утверждение о том, что «неделяющиеся клетки к МТХ не чувствительны» [4], то реализация местного токсического эффекта МТХ возможна только в том случае, если МТХ из РЖ пройдет сквозь многие слои кератиноцитов и проникнет в амплифицирующие клетки, упрятанные в складках базальной мембраны.

В соответствии с теорией, лежащей в основе разработки современных технологий буккальных лекарственных форм, все соединения могут проникать через СОПР, при этом скорость и способ пенетрации (пассивной парали интрацеллюлярной диффузии, активным транспортом или фагоцитозом) определяется их химической природой и размерами [7]. О наличии фолатных транспортеров в оральных кератиноцитах сведений нет. Полагают, что гидрофильные небольшие (до 500 Да) молекулы могут диффундировать через слой эпителия СОПР по воде межклеточных пространств [9]; в исследовании *in vitro*, выполненном для оценки риска интоксикации персонала при контакте с цитостатиками, гидрофильные мелкие молекулы цисплатина, циклофосфамида и фторурацила быстро, а относительно крупные молекулы доксорубина (544 Да) медленно пересекали тонкий слой реконструированного гидратированного эпителия человека по градиенту концентрации [2]. С другой стороны, есть указания на то, что в верхней трети ороговевающего и неороговевающего орального эпителия межклеточные пространства заполнены липидами, которые более или менее плотно блокируют продвижение гидрофильных соединений [9]; при разработке буккального пластыря с МТХ для обеспечения его траверса через нативный препарат СОПР овцы в формулу добавляли дезориентирующий липидные молекулы глицерин [9]. Таким образом, прямого ответа на вопрос о возможности доступа МТХ из РЖ к клеткам базального слоя эпителия СОПР нет – как нет единства в результатах клинических исследований, посвященных роли МТХ РЖ в развитии ОМ.

В трех доступных публикациях по теме изложены противоречивые результаты: у взрослых пациентов с ОМ, получавших 42-часовые инфузии МТХ, концентрация МТХ в слюне была не выше, чем у пациентов без ОМ [7]; у детей, получавших ХТ с МТХ в режиме 0,5 г/м² за 24 ч, нашли положительную корреляцию между концентрацией МТХ в слюне на 6-й час и развитием ОМ, сделав выводы о критическом значении ранней «местной» нагрузки МТХ на СОПР [5]; у детей, получавших МТХ в режиме 5–8 г/м² за 24 ч, по признаку концентрации МТХ в слюне критическим для развития ОМ назван 20-й час от начала инфузии [1]. В нашем исследовании не найдена положительная связь между концентрацией МТХ в слюне и развитием ОМ, напротив, в ранние – 6-й, 12-й, 24-й – часы СОПР детей, прошедших ХТ без ОМ, контактировала с РЖ с вдвое-втрое

большей концентрацией МТХ, чем СОПР детей, позже пострадавших от ОМ. Известное предположение о том, что риск ОМ определяется не столько уровнем МТХ в околоклеточной среде (в диапазоне 1÷100 мкМ), сколько длительностью экспозиции (в диапазоне 24÷72 часа) [6], в применении к РЖ как к среде, омывающей (клетки поверхностных слоев!) СОПР, в результатах нашего 54-часового исследования статистических подтверждений не нашло.

Выводы

1. При высокодозной ХТ МТХ экскретируется в полость рта в соответствии с клиренсом МТХ в крови, при этом концентрация МТХ в РЖ составляет, как правило, менее 1/10 от таковой в крови и находится в течение первых суток на децимикромольном, а затем до 54-го часа на сантимикромольном уровнях, достаточных для цитостатических эффектов.

2. Развитие ОМ у детей не определяется относительно высоким уровнем МТХ в РЖ в течение 54 часов от начала суточной инфузии высокодозного МТХ, что не поддерживает предположение об участии слюнного МТХ в патогенезе ОМ.

Литература

1. *Albertioni, F.* Monitoring of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in saliva from children with acute lymphoblastic leukemia receiving high-dose consolidation treatment: relation to oral mucositis / F. Albertioni, C. Rask, H. Schroeder, C. Peterson // *Anticancer Drugs*. – 1997. – Vol. 8, N 2. – P. 119–124.
2. *Dhiman, M. K.* A Transbuccal Delivery of 5-Fluorouracil: Permeation Enhancement and Pharmacokinetic Study / M. K. Dhiman, A. Dhiman, K. K. Sawant // *AAPS PharmSciTech*, – 2009. – Vol. 10, N 1. – P. 23–27.
3. *Epstein, J. B.* The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature / J. B. Epstein, A. H. Tsang, D. Warkentin // *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiolog., Endodont.* – 2002. – Vol. 94, N 1. – P. 39–44.
4. *Hilal-Dandan, R.* Manual of Pharmacology and Therapeutics / R. Hilal-Dandan, R. Brunton. – 2nd Ed.; Goodman and Gilman's, 2015. – 188 p.
5. *Ishii, E.* Oral mucositis and salivary methotrexate concentration in intermediate-dose methotrexate therapy for children with acute lymphoblastic leukemia / E. Ishii, S. Yamada, S. Higuchi // *Med. Pediatr. Oncol.* – 1989. – Vol. 17, N 5. – P. 429–432.
6. *Maiguma, T.* Relationship between oral mucositis and high-dose methotrexate therapy in acute lymphoblastic leukemia / T. Maiguma, Y. Hayashi, S. Ueshima // *J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 46, N 11. – P. 584–590.
7. *Oliff, A.* Methotrexate-induced oral mucositis and salivary methotrexate concentrations / A. Oliff, W. A. Bleyer, D. G. Poplack // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1979. – Vol. 2, N 3. – P. 225–256.
8. *Patterson, A. J.* Methotrexate serum and saliva concentrations in patients / A. J. Patterson, W. A. Ritschel, D. Zellner // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* – 1981. – Vol. 19, N 9. – P. 381–385.
9. *Raghavendra Rao, N. G.* Overview on Buccal Drug Delivery Systems / B. Shrivani, M. S. Reddy // *J. Pharm. Sci. & Res.* – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. 80–88.
10. *Schröder, H.* Lack of correlation between methotrexate concentrations in serum, saliva and sweat after 24h methotrexate infusions / H. Schröder, K. B. Jensen, M. Brandsborg // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1987. – Vol. 24, N 4. – P. 537–541.

Поступила 20.07.2017 г.