Т. В. ПОПРУЖЕНКО¹, С. П. БОРИС¹, О. В. КРАСЬКО² (Минск)

МЕТОТРЕКСАТ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ОРАЛЬНОГО МУКОЗИТА У ДЕТЕЙ

¹Белорусский государственный медицинский университет;²Объединённый институт проблем информатики НАН Беларуси <iris-24@mail.ru>

Для оценки возможной роли прямого воздействия метотрексата на слизистую оболочку полости рта (СОПР) в развитии орального мукозита (ОМ) при противоопухолевой химиотерапии (ХТ) изучены параметры концентрации метотрексата в биожидкостях 21 ребёнка в течение 27 эпизодов ХТ с метотрексатом в режимах 1 г/м², 2 г/м² или 5 г/м² площади поверхности тела за 24 ч (в том числе 4 эпизода с ОМ) – в образцах ротовой жидкости (РЖ), взятых на 6, 12, 24, 42, 48 и 54-й часы, и крови, взятых на 42, 48 и 54-й часы от начала инфузии метотрексата. Концентрацию метотрексата измеряли стандартным методом флуоресцентного поляризационного иммуноанализа при помощи набора «MTX reagent ras» в соответствии с инструкциями производителя. Анализ динамики концентрации метотрексата 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 метотрексата в крови и РЖ проводили по отдельным точкам времени (42, 48 и 54-й часы) методом Спирмена (r). Установлено, что экскреция метотрексата в полость рта повторяет алгоритм клиренса метотрексата в крови, при этом концентрация метотрексата в РЖ составляет, как правило, менее 1/10 таковой в крови, в течение первых суток находится на децимикромольном, а затем до 54 ч – на сантимикромольном уровнях. У детей, у которых впоследствии возник ОМ, концентрация метотрексата в РЖ на 6, 12 и 24-й часы была вдвое ниже, чем у детей без ОМ ($P < 0,001$), в последующие часы достоверных различий в параметрах этих подгрупп не выявлено. Полученные данные не подтверждают гипотезу об участии метотрексата в слюне в патогенезе ОМ.

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

Оральный мукозит (ОМ) развивается в 20–90 % случаев химиотерапии (ХТ) больных с онкологическими заболеваниями, значительно ухудшая качество жизни и повышая стоимость лечения [3], при этом вопросы патогенеза ОМ и проблема разработки успешного протокола менеджмента ОМ остаются актуальными [4].

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

Цель исследования – изучение наличия метотрексата в РЖ и его влияния на возникновение ОМ в период противоопухолевой ХТ больных детей.

Материалы 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, В-NHL-М 2010, NHL BFM 95, включающим введение высокодозного метотрексата.

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

Для изучения параметров концентрации метотрексата в РЖ использовали результаты всех измерений. В анализ возможного «местного» влияния метотрексата на состояние СОПР включали данные о концентрации метотрексата в РЖ 8 пациентов, у которых введение метотрексата в дозе 2 г/м² сопровождалось ОМ (подгруппа ОМ+, $n = 4$) или не вызывало изменений СОПР (подгруппа ОМ–, $n = 4$).

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

Результаты и их обсуждение. Уровни концентрации метотрексата в образцах РЖ варьировали в диапазоне от 0 (в некоторых образцах, взятых на 6-й час от начала введения метотрексата в дозе 1 г/м², а также на 42, 48 и 54-й часы от начала введения разных доз) до 1,015 мкмоль (на 12-й час введения метотрексата в дозе 2 г/м²). Общую тенденцию динамики показателей – достижение максимума к 12-му часу и медленное снижение к 48–54-му часу – иллюстрирует график (рисунок), построенный по данным, полученным в восьми эпизодах ХТ с введением метотрексата в дозе 2 г/м².

Динамика концентрации метотрексата в ротовой жидкости пациентов, получавших внутривенную инфузию препарата (2 г/м² за 24 ч)

Содержание метотрексата в РЖ во всех случаях было ниже такового в крови. Соотношение параметров в парах «РЖ/кровь» в образцах, взятых на 42, 48 и 54-й часы, составило ряды Ме (мин ... макс) = 0,08 (0 ... 0,3); 0,02 (0 ... 0,41) и 0,04 (0 ... 0,7) соответственно. Корреляция между концентрацией метотрексата в РЖ и 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 – $r = 0,3$; $P = 0,15$; на 54-й час – $r = 0,26$; $P = 0,253$); кроме того, обнаружена достоверная связь между концентрацией метотрексата в РЖ, взятой на 48-й час, и в крови, полученной на 42-й час ($r = 0,57$; $P = 0,013$).

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

**Содержание метотрексата в ротовой жидкости пациентов
в эпизодах химиотерапии, в дальнейшем осложнённых и неосложнённых
оральным мукозитом**

Время от начала введения метотрексата, ч	Концентрация метотрексата, М (95 % ДИ для среднего), мкмоль		Р
	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 метотрексата, 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], ещё не верифицировано как в отношении параметров выведения метотрексата в полость рта, так и связи между оральной экспозицией метотрексата и ОМ.

Механизмы слюнной экскреции метотрексата не описаны. Известно, что метотрексат – небольшая (454 Да) гидрофильная ($\log P = -1,85$) молекула, отрицательно заряжённая при физиологическом уровне pH, может пассивно диффундировать через клеточные мембраны только при концентрации метотрексата ≥ 100 мкмоль), и в обычных условиях метотрексат перемещается в клетку и из неё активным фолатспецифическим транспортом, имеющим ограничения в ёмкости: перенос метотрексата при помощи «вездесущих» (но в слюнных железах не описанных) транспортёров SLC19A1 насыщается при концентрации метотрексата = 1–5 мкмоль [4]. Обсуждая показатели концентрации метотрексата в РЖ, следует иметь в виду зависимость этого параметра от объёма РЖ – относительно небольшого, но заметно варьирующего в связи с индивидуальными особенностями саливации.

Параметры концентрации метотрексата в оральных жидкостях ранее были описаны в нескольких отчетах [5, 7, 8, 10]; в сравнении с ними образцы РЖ без метотрексата в нашем исследовании были гораздо более редкими, а показатели концентрации метотрексата – более высокими (до 1,02 против 0,07 мкмоль) [5], что можно объяснить различиями в дозах метотрексата. Анализ концентрации метотрексата в РЖ во времени позволил получить кривую слюнной экскреции

метотрексата, сходную по форме с таковой гематологического клиренса метотрексата [4]. В упомянутых публикациях соотношение концентрации метотрексата в РЖ и крови описано как 0,01 [7] – 0,05 [10] – 0,2 [8], в нашем исследовании – от 0 до 0,7 с $Me = 0,02 \div 0,08$, без связи со временем забора образцов и, соответственно, с концентрацией метотрексата в крови. Нами выявлена прямая связь между показателями концентрации метотрексата в одновременно взятых образцах РЖ и крови (наиболее ярко – в материалах 42-го часа), а также корреляция между концентрацией метотрексата в РЖ и предыдущих по времени забора образцах крови, что позволяет утверждать о явлении орального клиренса метотрексата (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 метотрексат выводится со слюной, повторяя во времени кривую гематологического клиренса метотрексата на относительно низких, но достаточных для воздействия на жизнедеятельность клеток [6] уровнях концентрации.

Токсическое действие метотрексата 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, 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, после утраты большинства органелл, происходит их апоптоз и слущивание. Если правильное утверждение о том, что «неделяющиеся клетки к метотрексату не чувствительны» [4], то реализация местного токсического эффекта метотрексата возможна только в том случае, если метотрексат из РЖ пройдёт сквозь многие слои кератиноцитов и проникнет в амплифицирующие клетки, спрятанные 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 пара- или интрацеллюлярной диффузии, активным транспортом или фагоцитозом) определяются их химической природой и размерами [7]. О фолатных транспортерах 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]. Вместе с тем 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 метотрексатом 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 метотрексата из РЖ к клеткам базального слоя эпителия СОПР нет, как и в результатах клинических исследований, посвящённых роли метотрексата в РЖ в развитии ОМ.

В трёх доступных публикациях, посвящённых этой теме, изложены противоречивые результаты: у взрослых с ОМ, получавших 42-часовые инфузии мето-

трексата, концентрация метотрексата в слюне была не выше, чем у пациентов без ОМ [7]; у детей, получавших ХТ с метотрексатом в режиме 0,5 г/м² за 24 ч, обнаружили положительную корреляцию между концентрацией метотрексата в слюне на 6-м часе и развитием ОМ. Сделаны выводы о критическом значении ранней «местной» нагрузки метотрексата на СОПР [5]; у детей, получавших метотрексат в режиме 5–8 г/м² за 24 ч, по признаку концентрации метотрексата в слюне критическим для развития ОМ назван 20-й час от начала инфузии [1]. В нашем исследовании не обнаружена положительная связь между концентрацией метотрексата в слюне и развитием ОМ, наоборот, в ранние – 6, 12 и 24-й часы – СОПР детей, получавших ХТ без ОМ, контактировала с РЖ с 2–3 раза большей концентрацией метотрексата, чем СОПР детей, у которых развился ОМ. Известное предположение о том, что риск ОМ определяется не столько уровнем метотрексата в околоклеточной среде (в диапазоне 1 ÷ 100 мкмоль), сколько длительностью экспозиции (в диапазоне 24 ÷ 72 ч) [6], в применении к РЖ как к среде, омывающей (клетки поверхностных слоёв!) СОПР, в результатах нашего 54-часового исследования статистических подтверждений не получило.

Выводы. 1. При высокодозной ХТ метотрексат экскретируется в полость рта в соответствии с клиренсом метотрексата в крови, при этом концентрация метотрексата в РЖ составляет, как правило, менее 1/10 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 метотрексата в РЖ в течение 54 ч от начала суточной инфузии высокодозного метотрексата, что не подтверждает предположение об участии слюнного метотрексата в патогенезе ОМ.

Список литературы

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

МЕТОТРЕКСАТ У РОТОВІЙ РІДИНІ ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ
ФАКТОР РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ОРАЛЬНОГО
МУКОЗИТУ У ДІТЕЙ

Т. В. Попруженко, С. П. Борис, О. В. Красько (Мінськ, Білорусь)

Для оцінки можливої ролі прямого впливу метотрексату на слизову оболонку порожнини рота (СОПР) у розвитку орального мукозиту (ОМ) при протипухлинній хіміотерапії (ХТ) вивчені параметри концентрації цього препарату в біорідинах 21 дитини протягом 27 епізодів ХТ з метотрексатом в режимах 1 г/м², 2 г/м² або 5 г/м² площі поверхні тіла за 24 год (в тому числі 4 епізоди з ОМ) – в зразках ротової рідини (РР), взятих на 6, 12, 24, 42, 48 і 54-ту години, і крові, взятих на 42, 48 і 54-ту години від початку інфузії метотрексату. Концентрацію метотрексату вимірювали стандартним методом флуоресцентного поляризаційного імуноаналізу за допомогою набору «MTX reagent pac» відповідно до інструкцій виробника. Аналіз динаміки концентрації цього препарату в зразках проводили за допомогою лінійної моделі змішаних ефектів, на основі якої розраховували середні величини (*M*) і довірчі інтервали для них (95 % ДІ). Аналіз кореляції рівнів концентрації цього препарату в крові і РР проводили по окремих точках часу (42, 48 і 54-та години) методом Спірмена (*r*). Встановлено, що екскреція метотрексату в порожнину рота повторює алгоритм кліренсу метотрексату в крові, при цьому концентрація метотрексату в РР становить, як правило, менше 1/10 такої в крові, протягом першої доби перебуває на децимікромолярному, а потім до 54 год – на сантимікромолярному рівнях. У дітей, у яких згодом виник ОМ, концентрація метотрексату в РР на 6, 12 і 24-ту години була вдвічі нижча, ніж у дітей без ОМ ($P < 0,001$), в наступні години достовірних відмінностей в параметрах цих підгруп не виявлено. Отримані дані не підтверджують гіпотези про участь метотрексату в слині у патогенезі ОМ.

Ключові слова: онкологія; гематологія; хіміотерапія; діти; оральний мукозит; високодозовий метотрексат; слина; кров.

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

T. Papruzhenska¹, S. Borys¹, O. Krasko² (Minsk, Belarus)

¹Belarusian State Medical University; ²The United Institute of Informatics
Problems of the National Academy of Sciences of Belarus

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. Concentration of methotrexate was measured by standard fluorescent polarization immunoassay using MTX reagent pac kit according to the manufacturer's instructions. Analysis of dynamics of methotrexate concentration in samples was performed using a linear model of mixed effects, on the basis of which the average values (*M*) and confidence intervals for them were calculated (95 % CI). The analysis of the correlation of the levels of methotrexate in the blood and oral liquid was performed at individual time points (42; 48 and 54 hours) using the Spearman method (*r*). 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.

Key words: oncology; hematology; chemotherapy; children; oral mucositis; high dose methotrexate; saliva; blood.