

М.А. Сташкевич
 Е.В. Хомутов
 О.П. Шатова
 А.В. Сидюк
 Ю.А. Попович
 А.Ю. Попович
 И.И. Зинкович

Донецкий национальный
 медицинский университет
 им. М.Горького, Донецк,
 Украина

Ключевые слова:

флуороурацил,
 фармакокинетика,
 дигидропиримидиндегидрогеназа,
 рак желудка, нормальная
 слизистая желудка.

ФАРМАКОКИНЕТИКА ФЛУОРОУРАЦИЛА В ОПУХОЛЕВОЙ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЖЕЛУДКА

Резюме. Проведено сравнительное изучение фармакокинетики флуороурацила (ФУ) в опухолевой и нормальной (не трансформированной) ткани стенки желудка 16 пациентов с аденокарциномой желудка. Через 2–60 мин после внутриартериального введения ФУ были отобраны образцы опухолей и нормальных тканей, в которых определяли концентрацию ФУ и активность дигидропиримидиндегидрогеназы (ДПДГ). Установлено, что в опухолевой ткани концентрация ФУ экспоненциально уменьшается с увеличением времени после его введения ($R = -0,74$ при $p = 0,01$). Отмечена умеренная корреляция активности ДПДГ с концентрацией ФУ ($R = -0,62$ при $p = 0,06$), а также со временем после его введения ($R = 0,59$ при $p = 0,07$). В то же время в смежной нормальной ткани все вышеперечисленные связи отсутствуют. Таким образом, в опухолевой ткани разных пациентов отмечено отсутствие индивидуальных особенностей катаболизма ФУ, что не характерно для нормальных, смежных тканей.

ВВЕДЕНИЕ

Цитостатик флуороурацил (ФУ) уже свыше 40 лет остается наиболее часто применяемым препаратом в лечении больных раком органов желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Собственно 5-ФУ является предшественником активных метаболитов (5-фторуридин, 5-фтор-УМФ, 5-фтор-УДФ, 5-фтор-УТФ), которые и обеспечивают его противоопухолевое действие. Почками и печенью выводится 10–20% ФУ в неизменном виде, а до 80% введенного в организм ФУ катаболизирует фермент распада пиримидинов — дигидропиримидиндегидрогеназа (ДПДГ) [3, 4]. Максимальная активность этого фермента отмечается в печени и лимфоцитах [4, 5].

В ряде исследований было показано наличие связи между активностью ДПДГ и чувствительностью опухолевых тканей к ФУ, а также системной токсичностью препарата [6, 7]. У 3–5% населения генетически детерминирована низкая активность этого фермента, что обуславливает возможность развития тяжелых побочных эффектов при введении ФУ [3]. С другой стороны, имеются данные, что для пациентов с высокой активностью ДПДГ терапия 5-ФУ, вероятно, будет неэффективной [6, 8]. С прогностической целью активность ДПДГ обычно определяют в мононуклеарных клетках периферической крови. Предполагают, что активность фермента в мононуклеарных клетках периферической крови прямо коррелирует с его активностью в печени [5, 9]. Результаты некоторых исследований дают основания полагать, что такой подход эффективен для оценки риска развития проявлений токсичности препарата, но не позволяет предсказать чувствительность к

нему опухолевых клеток, определяющим фактором которой является активность ДПДГ непосредственно в опухоли [9, 10].

Целью исследования было сравнение показателей фармакокинетики ФУ в опухолевой ткани желудка и в смежной с опухолью нормальной, непогрязенной стенке желудка.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили образцы опухоли и смежных с ней тканей (без видимых признаков опухолевого поражения или воспаления), изъятые во время операции у 16 больных (9 мужчин и 7 женщин в возрасте от 43 до 74 лет) раком желудка на разных стадиях заболевания (ТII–TIV). Исследование было одобрено Комитетом по этике Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Препарат ФУ вводили всем пациентам в дозе 250 мг струйно в желудочно-сальниковую артерию за 2–60 мин до удаления опухоли. Образцы опухолей и смежной ткани массой 2–5 г хранили при -20°C . Для приготовления экстракта образцы гомогенизировали на холоде в фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$) в соотношении масса образца/буфер 1:20 и центрифугировали при 3000 об/мин.

Для определения концентрации ФУ использовали модифицированную нами методику N. Christophidis [11], состоящую в двойной экстракции ФУ и дальнейшем измерении концентрации препарата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). К 1 мл гомогената тканей добавляли 10 мл этилацетата, интенсивно встряхивали в тече-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ние 90 с, затем центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин и отбирали верхний органический слой в пробирку с 1 мл щелочного буфера (0,6 мМ Na_2HPO_4 доводили до $\text{pH} = 11,0$, 0,1 М раствором NaOH). Содержимое пробирок снова интенсивно перемешивали и центрифугировали, как описано выше. Верхний органический слой удаляли и добавляли к водной фазе 10 мкл 1 М серной кислоты для нейтрализации среды.

Анализ полученных образцов проводили на хроматографе Shimadzu (Япония) с УФ-детектором на обратнотазовой колонке Ascentis C-18LC длиной 10 см. В качестве элюента использовали ацетатный буфер ($\text{pH} = 4,5$). При скорости потока 0,1 мл/мин время выхода ФУ составляло 5,2 мин. Площадь пиков определяли автоматически в программе Shimadzu Liquid Solution. Для расчета концентрации ФУ использовали калибровочный график (коэффициент корреляции $R = 0,99$ при $p = 0,05$), построенный по 5 различным концентрациям вещества (10–300 мкмоль/л) после вышеописанной подготовки проб.

Принцип метода определения активности ДПДГ состоит в оценке изменения оптической плотности при длине волны поглощения субстрата этого фермента — НАДФН — при добавлении к раствору последнего гомогената тканей. В кварцевую кювету толщиной 0,5 см помещали 0,25 мл 1 мМ НАДФН, 0,25 мл раствора, содержащего MgCl_2 (8 мМ) и ФУ (1 мМ), и 0,41 мл фосфатного буфера ($\text{pH} = 7,4$) с меркаптоэтанолом (1 мкМ). Содержимое кюветы нагревали до 40°C , после чего добавляли 0,05 мл гомогената и сразу проводили измерения на УФ-спектрометре Sresord-200 при длине волны 340 нм в течение 240 с с интервалом в 2 с. Расчет активности проводили по углу наклона линии тренда графика изменения оптической плотности НАДФН с учетом концентрации белка в гомогенате, которую измеряли по методу Лоури [12].

Обработку цифрового материала проводили в статистическом пакете Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опухоли желудка концентрация ФУ экспоненциально уменьшается с увеличением времени после его введения (рис. 1 а). Коэффициент корреляции для такой экспоненциальной зависимости составляет $-0,74$ при $p = 0,01$. Максимальная концентрация препарата была отмечена в опухоли пациента, которому ФУ ввели за 2 мин до иссечения ткани, — 41,4 мкмоль/г ткани, а минимальная — 0,33 мкмоль/г ткани при иссечении через 60 мин после введения препарата. Для нормальных, смежных с опухолевым узлом, тканей стенки желудка подобной зависимости не наблюдали (рис. 1 б). Концентрация ФУ в таких образцах не зависела от времени после его введения (коэффициент корреляции $R = 0,1$ при $p = 0,76$).

Более того, корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи между показателем концентрации цитостатика в опухолях и в смеж-

ных с ними, неизмененных тканях стенки желудка ($R = 0,02$ при $p = 0,94$).

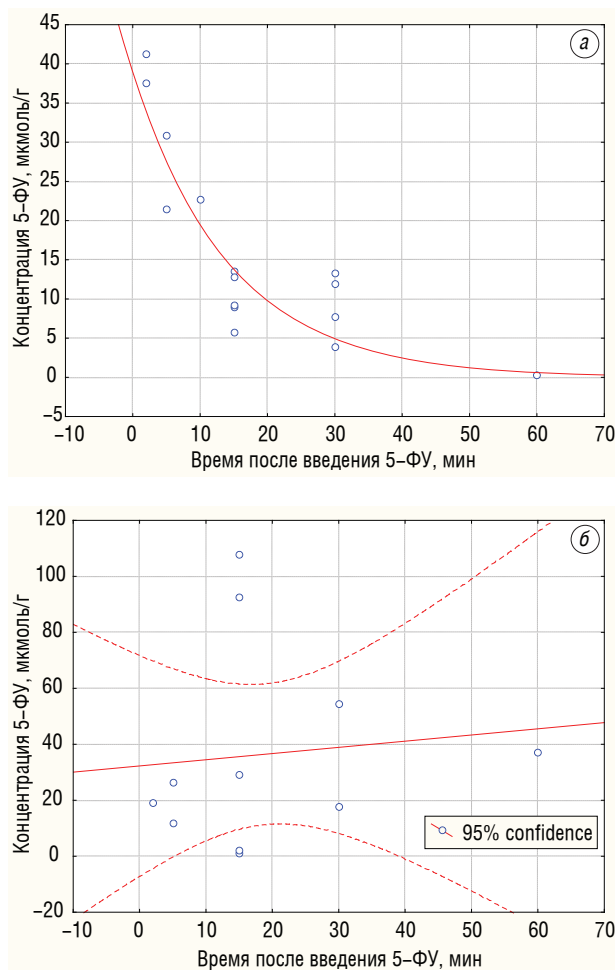
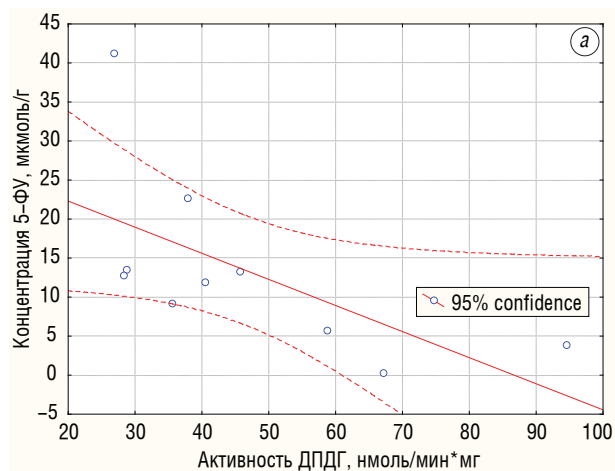


Рис. 1. Динамика концентрации ФУ в опухолевой (а) и нормальной (б) тканях стенки желудка с течением времени после введения препарата

Как и предполагалось, в опухолевой ткани наблюдали умеренную обратную корреляцию активности ДПДГ с концентрацией ФУ ($R = -0,62$ при $p = 0,06$), то есть уровень препарата пропорционально ниже у пациентов с высокой активностью ДПДГ (рис. 2 а). В смежной ткани статистически значимая связь между этими показателями отсутствует ($R = -0,30$ при $p = 0,46$) (рис. 2 б).



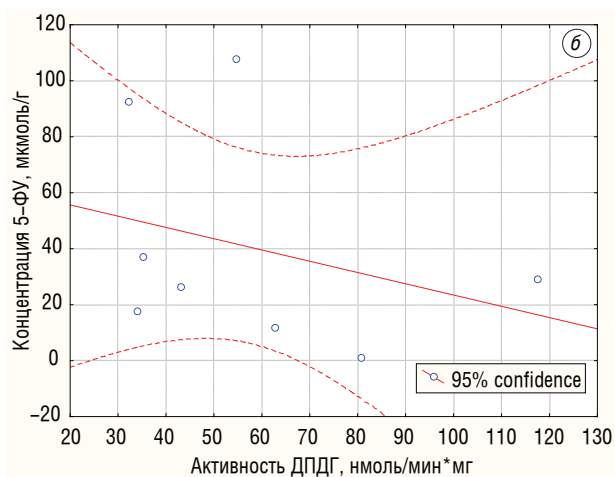


Рис. 2. Связь между активностью ДПДГ и концентрацией ФУ в опухолевой (а) и нормальной (б) тканях желудка

В узлах опухолей показатель активности ДПДГ прямо связан со временем после введения ФУ ($R = 0,59$ при $p = 0,07$), что позволяет допустить стимулирующее влияние цитостатика на изучаемый фермент (рис. 3 а). В смежной ткани (рис. 3 б) такой зависимости не наблюдали ($R = -0,32$ при $p = 0,4$).

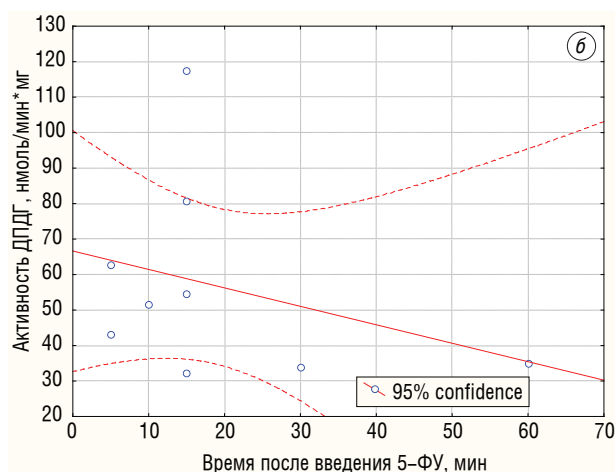
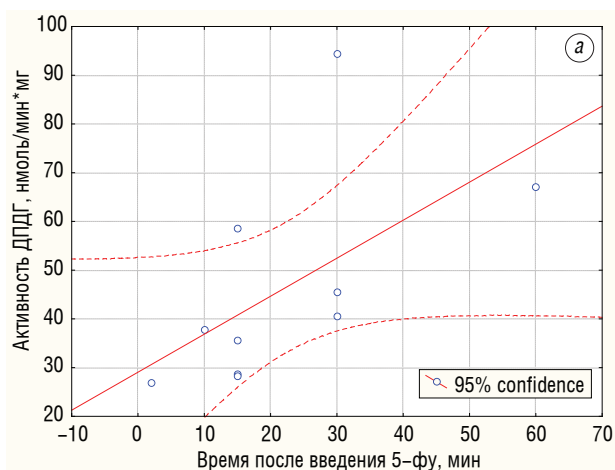


Рис. 3. Связь между активностью ДПДГ в опухоли (а) и нормальной ткани (б) желудка и временем после введения ФУ

Полученные данные свидетельствуют о принципиально различном характере фармакокинети-

ки ФУ в злокачественно трансформированных и в нормальных, смежных с опухолью тканях. Об этом же свидетельствует отсутствие статистически значимой связи между концентрацией ФУ в опухоли и смежной ткани у одного и того же пациента. Эти данные подтверждают известное мнение, что злокачественная трансформация сопровождается радикальными изменениями метаболического профиля опухолевых клеток [13, 14].

Обнаруженные особенности фармакокинетики ФУ в узле опухоли и в смежных тканях указывают, что характерные нормы межлические различия в активности ферментов катаболизма ФУ (в частности ДПДГ) [15–17] исчезают в малигнизированных клетках.

Закономерное экспоненциальное снижение концентрации ФУ в опухоли при увеличении времени от его введения, вероятнее всего, объясняется преобразованиями ФУ под действием ДПДГ и тимидинфосфорилазы/оротатфосфорибозилтрансферазы. В то же время в смежных с опухолью тканях такая тенденция не отслеживается, несмотря на заметную активность фермента. Возможно, такая устойчивость ФУ связана с отсутствием другого субстрата ДПДГ — НАДФН — вследствие относительно низкой активности пентозофосфатного пути окисления глюкозы в смежных с опухолью тканях [18].

Роль ДПДГ в катаболизме ФУ хорошо известна [2, 4]. Однако в нашем исследовании статистически значимая (при $p = 0,06$) отрицательная корреляционная связь между активностью фермента и концентрацией препарата обнаружена только в тканях опухолей. Более того, показано, что активность ДПДГ растет с увеличением времени от инфузии препарата до иссечения узла, то есть времени контакта препарата с опухолевой клеткой. Проявляющийся эффект может быть вызван как экспрессией гена ДПДГ, так и влиянием ФУ на другие ферменты метаболизма [19].

Обнаруженные различия в метаболизме ФУ в опухоли и смежной ткани согласуются с результатами японских исследователей, изучавших образцы биоптатов пациентов с раком кишечника. Они продемонстрировали обратную связь между концентрацией ФУ и активностью ДПДГ в опухоли и отсутствие таковой в нормальной ткани. Ими же было показано, что уровень мРНК ДПДГ коррелирует с активностью ДПДГ только в опухолях, а в нормальной ткани такой статистической связи не обнаружено [4]. Другие авторы утверждают, что связь между мРНК и активностью ДПДГ отсутствует как в нормальной, так и в злокачественно трансформированной ткани [20].

Показанные особенности метаболизма ФУ в нормальной и опухолевой тканях могут свидетельствовать о различиях в регуляции либо экспрессии, либо активности ДПДГ и других ферментов пиримидинового обмена и пентозофосфатного пути окисления глюкозы.

Интенсивная пролиферация клеток при раковом перерождении блокирует дифференцировку, что обуславливает приобретение клетками общих признаков, нивелирует характерные здоровым тканям индивидуальные особенности метаболических механизмов. Известно, что белковые профили малигнизированных тканей у различных больных практически совпадают, в то время как между нормальными тканями, из которых произошли эти злокачественные новообразования, есть существенные межиндивидуальные различия на белковом уровне. Это свидетельствует о конвергенции в опухолях экспрессии белков, в том числе и ферментов [13], что может объяснять показанную нами в узлах аденокарциномы желудка закономерную (однотипную у разных пациентов) динамику концентрации ФУ и ее согласованность с активностью ДПДГ.

В то же время полученные результаты ставят под сомнение обоснованность прогнозирования эффективности терапии ФУ на основе оценки активности ДПДГ в клетках периферической крови [6]. Такое прогнозирование может быть признано целесообразным при многочасовой внутривенной инфузии, когда препарат длительное время циркулирует в кровотоке и частично утилизируется печеночной ДПДГ, активность которой коррелирует с таковой в мононуклеарных клетках периферической крови [5].

При целенаправленном введении данного препарата, например, при его болюсной инъекции в желудочно-сальниковую артерию больным раком желудка обеспечиваются высокие концентрации ФУ в опухоли. В таком случае, как показано в настоящей работе, деградация препарата происходит по другим закономерностям, не характерным для смежных тканей и не зависящим от активности ДПДГ в клетках периферической крови.

ВЫВОДЫ

1. Параметры фармакокинетики ФУ в узлах аденокарциномы желудка принципиально отличаются от таковых в нормальных, немалигнизированных тканях желудка.

2. У разных больных скорость катаболизма ФУ в нормальных тканях отличается, в то время как распад препарата в опухолевой ткани происходит с примерно равной скоростью, что необходимо учитывать при подборе схемы лечения пациента и способа введения препарата.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией Государственной инспекции по контролю качества лекарств в Донецкой области Матийчиной Валентине Ивановне за консультативную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salonga D, Danberg KD, Johnson M, *et al.* Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression of di-

hydropyrimidinedehydrogenase, thymidilate synthase and thymidine phosphorilase. *Clin Cancer Res*, 2000; **6**: 1322–27.

2. Lazar A, Jetter A. Pharmacogenetics in oncology: 5-fluorouracil and the dihydropyrimidine dehydrogenase. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008; **133**(28–29): 1501–4.

3. Bocci G, Danesi R, Di Paolo A, *et al.* Comparative pharmacokinetic analysis of 5-fluorouracil and its major metabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil after conventional and reduced test dose in cancer patients. *Clin Cancer Res*; 2000; **6**(8): 3032–7.

4. Tanaaka-Nozaki M, Onda M, Tanaka N, *et al.* Variations in 5-fluorouracil concentrations of colorectal tissues as compared with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme activities and DPD messenger RNA levels. *Clin Cancer Res*. 2001; **7**(9): 2783–87.

5. Milano G. Dihydropyrimidine dehydrogenase and treatment by fluoropyrimidines. Past and future directions. In: *Fluoropyrimidines in cancer therapy*. Totowa, New Jersey: Humana press, 2003: 29–36.

6. Kralovánszky J, Adleff V, Hitre E, *et al.* Pharmacogenetic studies on the prediction of efficacy and toxicity of fluoropyrimidine-based adjuvant therapy in colorectal cancer. *Magy Onkol*. 2007; **51**(2): 113–25.

7. Yen JL, McLeod HL. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? *Eur J Cancer*. 2007; **43**(6): 1011–6.

8. Jensen SA, Vainer B, Sorensen JB. The prognostic significance of thymidilate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. *Int. J Cancer*. 2007; **120**(3): 694–701.

9. Collie-Duquid ES, McLeod HL, Cassidy J. Estimation of dihydropyrimidine dehydrogenase activity: Does it have a role in cancer therapy? *Ann Oncol*. 2000; **11**(3): 273–9.

10. Milano G, Etienne MC. Individualizing therapy with 5-fluorouracil related to dihydropyrimidine dehydrogenase: theory and limits. *Ther Drug Monit*. 1996; **18**(4): 335–40.

11. Christophidis N, Michaly G, Vajda F, *et al.* Comparison of liquid and gas chromatographic assays of 5-fluorouracil in plasma. *Clin Chem*. 1979; **25**(1): 83–86.

12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**(1): 265–75.

13. Muller U, Ernst G, Melle C, *et al.* Convergence of the proteomic pattern in cancer. *Bioinformatics* 2006; **22**: 1293–6.

14. Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics*. 2006; **6**(20): 5650–61.

15. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Morel A. Detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency before treatment by fluoropyrimidines. *Therapie*. 2007; **62**(2): 99–103.

16. Niwa T, Shiraga T, Ohno Y, Kagayama A. Interindividual variability in 5-fluorouracil metabolism and procainamide N-acetylation in human liver cytosol. *Biol Pharm Bull*. 2005; **28**(6): 1071–4.

17. Fleming RA, Milano G, Thyss A. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res*. 1992; **52**(10): 2899–902.

18. Vizán P, Alcarraz-Vizán G, Díaz-Moralli S. Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Int J Cancer*. 2009; **124**(12): 2789–96.

19. Yoshisue K, Nagayama S, Shindo T. Effects of 5-fluorouracil on the drug-metabolizing enzymes of the small intestine and the consequent drug interaction with nifedipine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; **297**(3): 1166–75.

20. Zimovjanova M, Sykora V, Novotny J, *et al.* Comparative analysis of thymidilate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in colorectal cancer and surrounding normal tissue. *Neoplasma* 2005; **52**(3): 208–10.

THE FLUOROURACIL PHARMACOKINETICS IN TUMOR AND NORMAL TISSUES OF PATIENTS WITH GASTRIC ADENOCARCINOMA

*M.A. Stashkevych, E.V. Khomutov, O.P. Shatova,
A.V. Sidyuk, Y.A. Popovych, A.Y. Popovych,
I.I. Zynkovych*

Summary. *A comparative study of the pharmacokinetics of fluorouracil (FU) in tumor and normal (non transformed) tissues in 16 patients with gastric adenocarcinoma was carried out. In 2–60 min after intraarterial injection of FU samples of tumors and normal tissues were selected, and there was determined concentration of FU and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. It is established, that in the tumor tissue concentration of FU decreases exponentially with the increase of time after its introduction ($R = -0,74$ at $p = 0.01$). It is marked the moderate correlation activity of DPD with the concentration of FU ($R = -0.62$ for $p = 0,06$)*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

and DPD activity with time after the introduction of FU ($R = 0,59$ for $p = 0,07$). At the same time in the adjacent normal tissue all the above links are not available. Thus, in the tumor tissue there is a lack of individual peculiarities of the catabolism FU in different patients, which is not typical for normal, adjacent tissues.

Key words: fluorouracil, pharmacokinetics, dihydropyrimidine dehydrogenase, gastric cancer, tumor tissue, normal tissue.

Адрес для переписки:

Сташкевич М.А.
03049, Киев, ул. Стадионная, 13, кв. 107
E-mail: matviyenko.maryna@gmail.com

Попович А.Ю.
ДОПЦ, торакальное отделение
83092, Донецк, ул. Полоцкая, 2а