

## ДА ЛИ ХЕМОТЕРАПИЈА КОЈА САДРЖИ ДОКСОРУБИЦИН МЕЊА МЕТАБОЛИЧКУ ФУНКЦИЈУ ЈЕТРЕ ТОКОМ ЛЕЧЕЊА АКУТНЕ ЛИМФОБЛАСТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ У ДЕЦЕ?

Коларовић Ј., Константинович Н., Каћански Н., Катанић Ј.

Институт за здравствену заштиту деце и омладине Војводине, Нови Сад

## DOES DOXORUBICIN CONTAINING CHEMOTHERAPY CHANGE METABOLIC LIVER FUNCTION DURING TREATMENT OF CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA?

Коларовић Ј., Константинович Н., Каћански Н., Катанић Ј.

Institute for Child and Youth Health Care of Vojvodina, Novi Sad

### SUMMARY

Doxorubicin is antitumor antibiotic extensively metabolized in the liver, and liver antioxidant capacity, including that provided by glutathione production. The aim of this study was to investigate whether doxorubicin containing chemotherapy changes metabolic liver function during treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Total protein concentration in serum, concentration of total, conjugated and non conjugated bilirubin, activity of aspartat aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase ( $\gamma$ GT), lactate dehydrogenase and creatin kinase activity were measured before and after treatment with doxorubicin containing chemotherapy and in the control group. Caffeine was applied as metabolic marker via controlled consumption of Coca-Cola and 8-hour urine was collected immediately afterwards. In the collected samples, urinary thioethers and caffeine metabolites concentrations were measured. Chemotherapeutic regiment established for initial treatment of childhood ALL containing prednisone, vincristine, doxorubicin and L-asparaginase did not alter metabolic liver function. This regiment did not change liver enzyme activity. Applied chemotherapy also did not alter caffeine biotransformation, but it did increase urinary thioethers excretion.

**Key words:** doxorubicin; children; acute lymphoblastic leukemia

### САЖЕТАК

Доксорубицин је анти туморски антибиотик које се интензивно метаболише у јетри укључујући и њене антиоксидативне капацитете везане за продукцију глутатиона. Циљ истраживања је био да се испита да ли примена комбиноване хемотерапије која садржи доксорубицин, а која се примењује у лечењу деце оболеле од акутне лимфобластне леукемије, мења метаболичку функцију јетре. Следеће биохемијске анализе рађене су пре и након примене хемотерапије која садржи доксорубицин: концентрација укупних протеина у серуму, концентрација укупног, коњугованог и некоњугованог билирубина, активност аспартат аминотрансферазе (AST), активност аланин аминотрансферазе (ALT), активност гама-глутамил трансферазе ( $\gamma$ GT), активност лактат дехидрогеназе (LDH) и активност креатин киназе (СК) у серуму. Као маркер метаболизма апликован је кофеин у облику комерцијалног безалкохолног пића Соса-Сола и сакупљан је 8-часовни у коме су мерене концентрације метаболита кофеина и тиола. Хемотерапијски режим који се примењује у индукционом лечењу акутне лимфобластне леукемије дечјег узраста а који садржи преднизон, винкрисдин, доксорубицин и Л-аспарагиназу није значајније мењао функцију јетре. Наведени хемотерапијски режим који садржи доксорубицин није утицао на промену активности јетрених ензима. Примењена хемотерапија није довела до промене биотрансформације кофеина, али је довела до повећања концентрације тиола у урину.

**Кључне речи:** доксорубицин; деца; акутна лимфобластна леукемија

### УВОД

Доксорубицин је анти туморски антибиотик које се интензивно метаболише у јетри укључујући и њене антиоксидативне капацитете везане за продукцију глутатиона (1). Његов активни и најважнији метаболит је доксорубинол, док је већина осталих метаболита неактивна. Доксорубицин се у јетри редукује у доксорубинол а метаболише се микрозомалним ензимима (2). Управо због оваквог начина метаболисања доксоруби-

цина могућа је интеракција са лековима и метаболитима који се из организма елиминису на овај начин, а у чијој разградњи учествује цитохром P450. Зато оштећена функција јетре доводи до споријег излучивања лека и за последицу има његово нагомилавање у плазми и ткивима (3). Примена доксорубина у болесника са оштећеном функцијом јетре може довести до тешких форми панцитопеније и мукозитиса. У случају оштећења јет-

рене функције потребно је смањити дозу лека, а његова примена у случајевима већег оштећења може бити чак и контраиндикована. Међутим, доксорубицином изазвана хепатотоксичност је ипак ретка појава (4). Кофеин (1,3,7 триметилксантин) је молекула који већина одраслих особа свакодневно уноси у организам путем напитака, безалкохолних пића и неких врста хране. Биотрансформација кофеина скоро је у потпуности позната и посредована је микросомалним и неким немикросомалним ензимима присутним у хепатоцитима (5,6,7,8). Кофеин је практично у свакодневној употреби, релативно је сигуран, а његова деградација посредована је са најмање два ензима који се могу пратити. Због тога кофеин представља погодан биомаркер за праћење варијабилности биотрансформације ксенобиотика у људи и животиња. Кинетика кофеина такође погодује његовој употреби као биомаркера (9).

## ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је испитати да ли примена комбиноване хемотерапије која садржи доксорубицин, а која се примењује у лечењу деце оболеле од акутне лимфобластне леукемије, мења метаболичку функцију јетре.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитивану групу чинило је 20 деце оба пола, узраста 2-15 година са први пут постављеном дијагнозом акутне лимфобластне леукемије. У свих оболелих болест је била умереног или високог ризика. Дијагностика и лечење спроведени су у Центру за хематологију и онкологију Института за здравствену заштиту деце и омладине у Новом Саду. Контролну групу су чинила деца оба пола, сличног узраста, која нису оболела од малигних болести или су била здрава.

Лечење је спроведено према протоколу YU ALL 95 за дијагностику и лечење акутне лимфобластне леукемије деце, типа non - B (10). Испитаници су праћени само на почетку лечења, пре примене хемотерапије и током фазе Ia индукционог лечења у којој се примењује доксорубицин.

Испитаници су примали хемотерапију према следећој шеми (протокол YU ALL 95):

### *Преднисон*

- дани 1-3, 20-60 mg/m<sup>2</sup>/дан пер ос у три дозе
- дани 4-28, 60 mg/m<sup>2</sup>/дан пер ос у три дозе
- дани 29-37, преполовити. дозу сваки 3. дан до укидања

### *Доксорубицин*

- 30 mg/m<sup>2</sup> i.v., дани 8, 15, 22, 29

### *Винкрестин*

- 1.5 mg/m<sup>2</sup> i.v., дани 8, 15, 22, 29

### *Метотрексат*

- доза према узрасту, интратекално, дан 1

### *Л-Аспарагиназа*

- 10000 јед/m<sup>2</sup> i.v., дани 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40

### *ТИТ*

- дозе према узрасту, интратекално, дани 15 и 29
- ТИТ=трипла интратекална терапија (МТХ-метотрексат, АРА-С цитосинарабинозид и PDS-преднисон)

Код деце у испитиваној и контролној групи мерен је хематокрит и одређивани су следећи биохемијски параметри који могу бити показатељи хепатотоксичног дејства а неки евентуално и кардиотоксичног дејства, а рутински се користе у клиничкој пракси. Мерени су: концентрација укупних протеина у серуму, концентрација укупног, коњугованог и некоњугованог билирубина, активност аспартат аминотрансферазе (AST), активност аланин аминотрансферазе (ALT), активност гама-глутамил трансферазе ( $\gamma$ GT), укупна активност лактат дехидрогеназе (LDH), и активност креатин киназе (СК) у серуму.

Хематокрит је одређен на аутоматском бројачу MS 9, произвођача Melet Schlesing. Концентрација укупних серумских протеина мерена је према биуре-тској методи (11). Активност AST, ALT,  $\gamma$ GT, LDH и СК у серуму одређена је рутинским кинетичким UV методама по познатој методологији, сетовима произвођача DIALAB, према препорукама IFCC (Интернационално удружење клиничких хемичара) (11). Све наведене биохемијске анализе урађене су на аутоматском биохемијском систему HITACHI 704.

Испитаницима је као маркер метаболизма апликован кофеин у облику комерцијалног безалкохолног пића Соса-Сола у дози од 10 мл/кг, што одговара унетој количини кофеина од 1.5 мг/кг телесне тежине детета (садржај кофеина у Соса-Соли је 150 мг/л). Кофеин је деци оболелој од леукемије дат непосредно пре примене доксорубицина. Након примене кофеина и доксорубицина сакупљен је осмочасовни урин. У осмочасовном урину су применом течне хроматографије високе резолуције (THVR), према модификованој методи Гранта и сарадника коју су описали Кариљо и сарадници 1994. године (12), квалитативно и квантитативно одређивани метаболити кофеина - 7 метилксантин (7X), 3,7 диметилмокраћна киселина (3,7 U), 1 метилксантин (1X), 3,7 диметилксантин (3,7 X), 1,7 диметилмокраћна киселина (1,7 U), збирне концентрације 1,7 диметилксантина и 1,3 диметилксантина (1,7 X + 1,3 X) и 1,3,7 триметилксантин (107). Такође су били праћени и односи појединих метаболита кофеина. Праћени су следећи односи: однос збира концентрација 1 метилксантина и 1,7 диметилмокраћне киселине са концентрацијом 3,7 диметилмокраћне киселине (1X+1,7U/3,7 U) и однос збира концентрација 3,7 диметилксантина и 7 метилксантина са збиром концентрација 1,3 диметилксантина и 1,7 диметилксантина (3,7X+7X/1,3X+1,7X).

Концентрација тиола у урину одређена је према модификованој методи Елмана (1959) коју су описали Самер и сарадници (13).

## РЕЗУЛТАТИ

Концентрације укупних протеина и укупног, коњугованог и некоњугованог билирубина нису се разликовале између испитиваних група, и кретале су се у границама референтних вредности за примењену методу.

Активност AST није се међусобно разликовала по испитиваним групама. Просечна активност AST мерена пре почетка полихемотерапије, била је око 50% убрзана, али ова разлика није статистички значајна.

Активност  $\gamma$ GT, ALT, AP и СК је била слична у свим испитиваним групама, и кретала се у опсегу методом датих референтних вредности.

Активност LDH у серуму (Табела 1) била је значајно убрзана у групи деце оболеле од ALL пре започињања хемотерапије са доксорубицином (ALLD<sub>0</sub>), у поређењу са активношћу овог ензима у истој групи, а након завршетка хемотерапије (ALLD<sub>1</sub>), и у поређењу са његовом активношћу у контролној групи деце (KD). Активност LDH је такође била убрзана и након спровођења протоколом предвиђене хемотерапије у групи деце оболеле од ALL (ALLD<sub>1</sub>), у поређењу са његовом активношћу у серуму деце у контролној групи (KD).

**Табела 1.** Активност лактат дехидрогеназе (LDH) у серуму ( $\mu$ kat/L) у испитиваној и у контролној групи.

Група	LDH ( $\mu$ kat/L)
KD	4.58 $\pm$ 1.16
ALLD <sub>0</sub>	36.40 $\pm$ 64.43* <sup>‡</sup>
ALLD <sub>1</sub>	6.64 $\pm$ 1.70 <sup>‡</sup>

\* $p < 0.05$  за групу ALLD<sub>0</sub> према групи ALLD<sub>1</sub>

<sup>‡</sup> $p < 0.05$  за групу ALLD<sub>0</sub> према групи KD

<sup>‡</sup> $p < 0.005$  за групу ALLD<sub>1</sub> према групи KD

Хематокрит је био значајно нижи у групи деце оболеле од акутне лимфобластне леукемије и пре и после хемотерапије, у поређењу са хематокритом у деце из контролне групе KD. У групи деце оболеле од ALL, није било значајних разлика између вредности хематокрита измерених пре и после терапије (Табела 2).

**Табела 2.** Хематокрит изражен као фракција броја један у испитиваној и у контролној групи.

Група	Хематокрит (HTC)
KD	39.67 $\pm$ 1.58
ALLD <sub>0</sub>	23.98 $\pm$ 6.35**
ALLD <sub>1</sub>	29.02 $\pm$ 8.57**

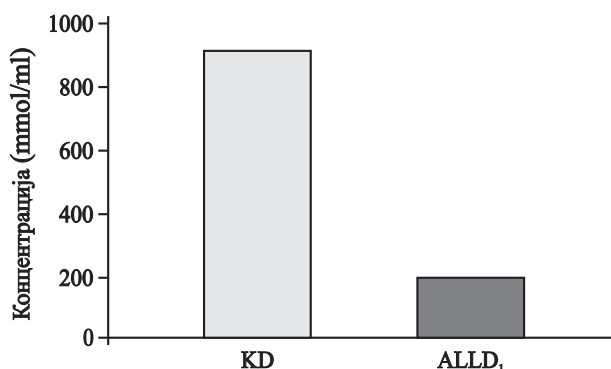
\* $p < 0.005$  за групу ALLD<sub>0</sub> према групи KD

\*\* $p < 0.005$  за групу ALLD<sub>1</sub> према групи KD

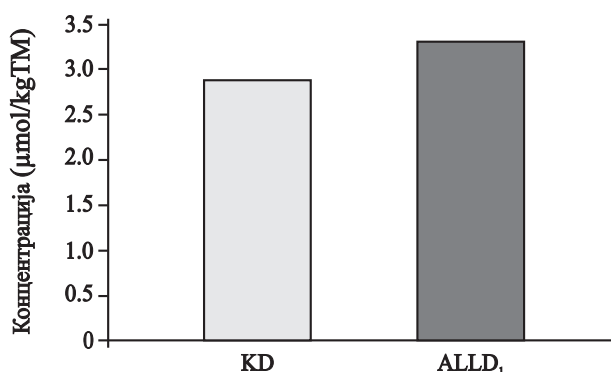
<sup>‡</sup> $p < 0.05$  за групу ALLD<sub>0</sub> према групи ALLD<sub>1</sub>

Анализом концентрација метаболита кофеина у урину и њихових раније дефинисаних односа, утврђено је да се њихова концентрација у урину није значајно разликовала у испитиваним групама. Од свих испитиваних метаболита кофеина, једино је уринарна екскреција 3,7 диметилмокрајне киселине (3,7 U) била значајно мања у испитиваној групи у поређењу са контролном (Графикон 1). Анализирани односи метаболита кофеина (1X+1,7U/3,7U и 3,7X+7X/ 1,3X+1,7X) се такође нису разликовали између група. (Граф. 1).

Концентрација тиола у урину била значајно већа у испитиваној него у контролној групи (граф. 2).



**Графикон 1.** Уринарна екскреција 3,7 диметилмокрајне киселине (3,7 U) у испитиваној и контролној групи.



**Графикон 2.** Концентрација тиола у урину у испитиваној и контролној групи.

## ДИСКУСИЈА

Концентрације укупних протеина у серуму су се кретале у границама референтних вредности и биле су међусобно сличне у обе испитиване групе. Овакав налаз могао би бити индиректни показатељ очуване синтетске функције јетре.

Концентрација билирубина у серуму је једна од метода функционалних испитивања јетре. У случају лезије јетре и некрозе хепатоцита, могле би се очекивати повећане концентрације билирубина, првенствено на рачун повећања концентрације коњугованог билирубина (14). Праћењем концентрација укупног, коњугованог и некоњугованог билирубина, нису запажене њихове промене, нити постојање значајних разлика између испитиваних група.

Активност аспартат-аминотрансферазе је била око 50% убрзана у деце оболеле од ALL пре започињања хемотерапије, али је ова разлика била испод нивоа статистичке значајности. Овај ензим се налази и у другим органима, а не само у јетри, тако да његова повишена активност не мора бити одраз измењене функције хепатоцита (14,17). По завршетку терапије антрациклинима активност овог ензима је била нормална. У прилог претходној тврдњи иде и чињеница да је активност аланин-аминотрансферазе (ALT) која је специфичнији показатељ функције јетре од AST, била у гра-



ницама референтних вредности у деце оболеле од ALL пре започињања терапије доксорубицином и по њеном завршетку. У серији од 6 пацијената оболелих од ALL је након примене индукционе терапије која се састојала од винкристина, преднизона и доксорубицина убрзо дошло до пораста концентрација билирубина, активности AST и ALT. Ове биохемијске промене биле су праћене фокалним накупљањем инфламаторног инфилтрата и стеатозом у узорцима биопсије јетреног ткива. Аутори сматрају да се ради о идиосинкразији (15).

Активност гама глутамил-трансферазе ( $\gamma$ GT) и алкалне фосфатазе (AP) се такође није разликовала међу испитиваним групама и кретала се у границама референтних вредности.

Насупрот томе, активност лактат дехидрогеназе је била скоро пет пута убрзана у деце оболеле од акутне лимфобластне леукемије пре започињања терапије. Значајно убрзање активности LDH је последица основне болести, а не дисфункције јетре, пошто су лимфоласти богати овим ензимом (16). Оволико убрзаној леукоцити просечној активности LDH у највећој мери су допринеле високе активности овог ензима у два болесника са изразито високим иницијалним бројем леукоцита ( $120 \times 10^9/l$  и  $150 \times 10^9/l$ ). Убрзана активност LDH у оболелих од ALL је најчешће последица лизе лимфоласти, и уједно представља индиректни показатељ оптерећења туморском масом. По завршетку фазе индукције активност LDH је у деце оболеле од ALL била нормална, што је одраз повољног одговора на терапију и смањења туморске масе (17).

Миоцити су ћелије са високим садржајем креатин-киназе (СК), али је овај ензим присутан и у другим мишићима. Током истраживања нисмо били у могућности да одређујемо активност изоформе која се налази у миокарду, али би се ипак могло очекивати да дође до пораста укупне активности СК у случају значајније некрозе миоцита. Међутим, слична активност овог ензима измерена је у обе испитиване групе (18).

Снижена вредност хематокрита регистрована је у деце оболеле од ALL како непосредно пре почетка хемотерапије, тако и након њеног завршетка. Овакав налаз је последица активности основне болести (леукемијске инфилтрације косне сржи) и нежељеног дејства терапије (мијелосупресија).

Како је кофеин потпуно нешкодљив, а налази се у свакодневној употреби, одлучили смо се да га применимо као биомаркер у испитиване деце, и то у за њих погодном облику, кроз унос безалкохолног напитка Coca-Cola.

Од свих праћених метаболита кофеина, једино је екскреција 3,7 диметилмокраћне киселине била знатно мања у групи деце оболеле од ALL него у контролној групи. Концентрације осталих праћених метаболита нису се разликовале у испитиваним групама. Како и праћењем односа метаболита кофеина (осетљивији показатељ промене његове биотрансформације под дејством ксенобиотика) нису запажене разлике између испитиваних група, сматрамо да овај налаз није од значаја.

Уринарна екскреција тиола се сматра једним од индикатора изложености токсичним хемикалијама у жи-

вотној средини. Увек када постоји значајно повећање екскреције тиоетара у урину, то је знак да највероватније постоји изложеност неком штетном једињењу, најчешће алкилирајућим агенсима. Тиоли излучени у урину су крајњи продукти детоксикације настали коњугацијом електрофилних једињења са глутатионом која је катализована глутатион-С-трансферазом (13). У деце оболеле од ALL запажен је значајан пораст концентрације тиола у урину, у поређењу са контролном групом деце. Ово је највероватније последица изложености ове популације цитотоксичним лековима.

## ЗАКЉУЧАК

Хемотерапијски режим који се примењује у индукционом лечењу акутне лимфобластне леукемије дечјег узраста а који садржи преднизон, винкристин, доксорубин и Л-аспарагиназу није значајније мењао функцију јетре. Наведени хемотерапијски режим који садржи доксорубин није утицао на промену активности јетрених ензима. Примењена хемотерапија није довела до промене биотрансформације кофеина, али је ипак оптеретила јетру токсичним метаболитима чија је детоксикација довела до повећања концентрације тиола у урину.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Meredith MJ, Reed DJ. Depletion in vitro of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by Adriamycin and 1,3 chloroethyl-nitrosourea (BCNU). *Biochem Pharmacol* 1983;32:1383-1388
2. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW (editors). New York: MCGraw-Hill, 1996: 1233-87
3. Droz J, Cvitkovic E, Armand J, Khoury Y. Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology, second edition. Ed. Scientific Communication International Ltd, Jersey, Channel Islands 221-224, 1993.
4. King PD, Perry MC. Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist* 2001; 6(2): 162-76.
5. Silverman K. Withdrawal syndrome after double blind cessation of caffeine consumption. *N Engl J Med* 1992; 327:1109
6. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P450 PA (P-4501A2), the phenacetin O-deethylase is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad USA* 1989; 86:769-70
7. Berthou F, Guillos B, Riche Z, Dreano E, Jacqz-Aigrain E, Beaune PH. Interspecies variation in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. *Xenobiotica* 1992; 22(6): 671-80
8. Kalow W, Campbell M. Biotransformation of caffeine by microsomes. *ISI Atlas Sci Pharmacol* 1988; 2:381-6
9. Burg AW. Physiological disposition of caffeine. *Drug Metab Rev* 1975; 4:199-228
10. Cvetković P, Stojimirović E, Janić D, et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia: The results of YU 0184 and 0187 protocols. *Bilt hematol.* 1995;23(1-2):43-6
11. Tietz NW. *Osnovi kliničke hemije*, Beograd: Vel Arta, 1997
12. Carillo JA, Benitez J. Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-Acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55(3):293-304 (HPLC)

13. Summer KH, Rozman K, Coulston F, Greim H. Urinary Excretion of Mercapturic Acids in Chimpanzees and Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 50:207-212
14. Borota R, Lučić A. Priručnik praktičnih i seminarskih vežbi iz patološke fiziologije. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, 1998.
15. Aviles A, Herrera J, Ramos E et al. Hepatic injury during doxorubicin therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:912-913
16. Cvetkovic P. Akutne limfoblastne leukemije non-B. U: Mandić V, urednik. *Klinička dečja onkologija*. Beograd: Sava Centar, 2000: 119-40
17. Al-Tonbary Y, Al-Haggar M, EL-Ashry R, et al. Vitamin E and N-Acetylcysteine as Antioxidant Adjuvant Therapy in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Adv Hematol*. 2009; (assessed online on 2010 April 28) October 20. doi: 10.1155/2009/689639.
18. Mahmood Khan M, Shobha JC, Mohan, JK et al. Protective Effect of Spirulina against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Phytother Res* 2005; 19:1030-37 (assessed online on 2010 April 28). doi: 10.1002/ptr.1783