

Received: 2004.02.10

Accepted: 2004.03.15

Published: 2004.04.20

## Działanie metotreksatu na odpowiedź immunologiczną w wybranych modelach doświadczalnych

### Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models

Michał Zimecki, Jolanta Artym

Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Metotreksat (MTX) jest związkiem immunosupresyjnym, który znalazł zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób, w tym: reumatoidalnego zapalenia stawów, toczenia rumieniowatego, łuszczyca i choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi oraz – w połączeniu z innymi cytotatykami – w leczeniu przeciwnowotworowym. Wykorzystując MTX w modelach zwierzęcych odpowiadających sytuacjom klinicznym, a także w leczeniu ludzi wykazano, że związek ten zmniejsza objawy chorobowe w różnego rodzaju zaburzeniach immunologicznych. MTX jest antagonistą syntezy kwasu foliowego wchodzącego w skład enzymów uczestniczących w syntezie DNA i RNA w komórce. Jego działanie polega głównie na indukcji apoptozy w pobudzonych komórkach znajdujących się w fazie G1 i S cyklu komórkowego. Związek ten działa także hamująco na syntezę lub aktywność kilku cytokin prozapalnych przez indukcję inhibitorów ich aktywności. Duże dawki MTX działają cytotoksycznie na komórki hemopoetyczne, jednakże jego niskie stężenie stymuluje proces hemopoezy. MTX działa też promująco na różnicowanie monocytarnych komórek nowotworowych zmieniając ich fenotyp, co w części może tłumaczyć jego efekty terapeutyczne w leczeniu niektórych zaburzeń. Związek ten jest supresorem odpowiedzi immunologicznej zarówno humoralnej jak i komórkowej, hamuje też proliferację komórek indukowaną mitogenami. Działanie MTX w tych modelach doświadczalnych zależy od dawki i czasu zastosowania związku. Najsilniejsze działanie supresorowe przejawia, gdy podany jest 24–48 godzin po immunizacji lub traktowaniu komórek mitogenami. Zastosowanie MTX w warunkach niekorzystnych (stres, towarzyszące schorzenia) obniża tolerancję na lek zwiększając jego toksyczność. Niepożądane działanie MTX można łagodzić farmakologicznie, stosując preparaty syntetyczne lub pochodzenia roślinnego. Supresję odpowiedzi immunologicznej wywołaną MTX można także odwrócić stosując laktoferynę. Reasumując, MTX pozostaje nadal skutecznym środkiem immunosupresyjnym (od blisko 50 lat), znajdującym wciąż liczne zastosowania.

Słowa kluczowe:

metotreksat • choroby autoimmunizacyjne • apoptoza • cykl komórkowy • cytokiny • hemopoeza

#### Summary

Methotrexate (MTX) is one of the immunosuppressory compounds applied in the prophylaxis and treatment of several diseases, including: rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, graft-versus-host disease and, in combination with other drugs, neoplastic diseases. Studies in humans and in animal model, of clinical disease, have demonstrated that MTX diminishes the clinical symptoms of various immunological disorders. MTX, an antagonist of folic acid synthesis, causes apoptosis in activated cells, primarily in the G1 and S phases of the cell cycle. One of its actions, is inhibition of the synthesis or activity of several proinflammatory cytokines. At high doses, MTX is cytotoxic to hemopoietic cells; low doses, however, promote hemopoiesis. MTX also induces the differentiation of monocytic tumor cells, which may explain, in part, its therapeutic effects in the treatment of some disorders. The compound suppresses both cellular and humoral immune response and mitogen-induced lymphocyte proliferation. These ef-

fects are dose- and time-dependent. The strongest suppressory activity is exerted when MTX is applied 24 or 48 hours after immunization or mitogen stimulation. Administration of MTX in unfavorable conditions such as stress or other diseases, diminishes its tolerance and increases its toxicity. Side-effects of MTX may be ameliorated by application of pharmacological synthetic agents and plant extracts. In summary, MTX has been an effective agent in suppressing immunological disorders (for 50 years) and is still finding many applications.

**Key words:** methotrexate • autoimmune diseases • apoptosis • cell cycle • cytokines • hemopoiesis

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/5451.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5451.pdf)

**Word count:** 5540

**Tables:** –

**Figures:** 1

**References:** 59

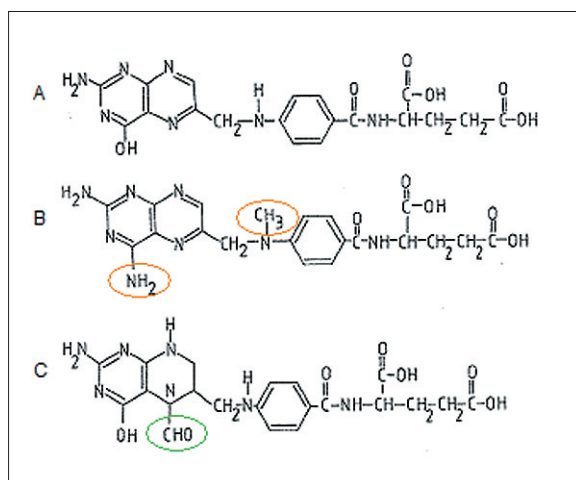
**Adres autorów:** Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: zimecki@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **MTX** – metotreksat (methotrexate); **CsA** – cyklosporyna (cyclosporine); **CP** – cyklofosamid; **SLE** – toczeń rumieniowaty trzewny (systemic lupus erythematosus); **IL** – interleukina; **IFN** – interferon; **SCID** – ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency); **Th** – pomocnicze limfocyty T (T helper); **NK** – naturalne komórki cytotoksyczne (natural killer); **MPA** – kwas mykofenolowy (mycophenolic acid); **TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (granulocyte macrophage colony-stimulating factor); **PBMC** – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells); **IL-1Ra** – antagonist receptoru IL-1 (interleukin-1 receptor antagonist); **STNFR** – rozpuszczalna postać receptora TNF (soluble TNF receptor); **CFU-S** – komórki tworzące kolonie śledzionowe (spleen colony forming units), równoważnik wielopotencjalnej komórki macierzystej; **CFU-C** – komórki tworzące kolonie progenitorowe (colony forming units committed), obecnie GM-CFU; **LF** – laktoferyna (lactoferrin); **PFC** – komórki tworzące łysinki (plaque forming cells); **BSA** – albumina surowicy bydłowej (bovine serum albumin); **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (intercellular adhesion molecule-1); **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **PHA** – fitohemaglutynina (phytohemagglutinin); **BCG** – atenuowany szczep prątka bydłowego gruźlicy używany jako szczepionka przeciwko gruźlicy u człowieka, *Bacillus Calmette Guerin* (BCG); **TGF- $\alpha$**  – transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ); **CRP** – białko C-reaktywne (C-reactive protein); **PPD** – oczyszczone białko tuberkulinowe z *Mycobacterium* (purified protein derivative); **GvHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft-versus-host disease)

#### **MECHANIZM DZIAŁANIA METOTREKSATU – WPŁYW NA METABOLIZM NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH I PIRYMIDYNOWYCH**

Związki immunosupresyjne stosowane są w prewencji i leczeniu zaburzeń autoimmunizacyjnych, chorób neoplastycznych, w chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi i zapobieganiu odrzucania przeszczepów. Jednym z tych związków jest metotreksat (MTX, kwas 4-amino-N<sup>10</sup>-metylofoliowy) – lek z grupy antymetabolitów, analog kwasu foliowego (ryc. 1AB). Kwas foliowy i jego pochodne (foliany) odgrywają ważną rolę w metabolizmie, spełniając funkcje koenzymów w reakcjach przenoszenia grup jednowęglowych w procesie syntezy zasad purynowych i pirymidynowych. Niezbędnym warunkiem udziału kwasu foliowego w tych reakcjach jest jego redukcja do kwasu tetrahydrofoliowego (H<sup>4</sup>-folianu). W reakcjach redukcji uczestniczy reduktaza dihydrofolianowa (dehydrogenaza tetrahydrofolianowa), z którą MTX (podobny strukturalnie do kwasu foliowego) wiąże się ponad 10 000 razy silniej niż naturalny metabolit, powodując w ten sposób zablokowanie enzymu. Poza hamowaniem

reduktazy dihydrofolianowej, MTX blokuje kompetycyjnie również syntetazę tymidylową (enzym katalizujący przekształcenie pochodnej uracylu do pochodnej tyminy) [3, 15,20]. W niektórych typach komórek ssaków MTX częściowo podlega także metabolicznemu przekształceniu, które polega na przyłączeniu kilku grup glutaminowych (z udziałem syntetazy folianowo-metoglutaminowej) [3, 41]. Poliglutaminacja zwiększa siłę działania leku. Taka pochodna MTX pozostaje w komórce przez długi czas (im dłuższe są łańcuchy poliglutaminianów tym dłużej) i jest inhibitorem nie tylko dehydrogenazy tetrahydrofolianowej, ale i innych enzymów zależnych od kwasu foliowego (m.in. transformylazy rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-karboksyamidu, ostatniego enzymu w syntezie puryn *de novo*) [3]. Wymienione powyżej enzymy są istotne dla syntezy puryn i pirymidyn. Nukleotydy purynowe i pirymidynowe odgrywają zasadniczą rolę w komórce: uczestniczą w syntezie DNA i RNA, biosyntezie lipidów błonowych oraz glikozylacji białek, wchodzi w skład koenzymów i cząsteczek sygnałowych. Blokada syntezy tych związków prowadzi do zaburzeń wzro-



**Ryc. 1.** Wzory kwasu foliowego (A), metotreksatu (B) i kwasu folinowego (C). MTX (kwas 4-amino-N<sup>10</sup>-metylofoliowy) różni się od kwasu foliowego (kwasu pteroioglutaminowego –PteGlu) obecnością grupy CH<sub>3</sub> w miejscu grupy OH w pozycji 4 pierścienia pterydynowego oraz grupy CH<sub>3</sub> przy atomie N między dwoma pierścieniami. Kwas folinowy to uwodorniona pochodna kwasu foliowego z podstawnikiem formylowym (CHO) w pozycji 5 pierścienia pterydynowego; pochodna wapniowa (folinian wapniowy) tego związku to leukoworyna; jej zastosowanie pozwala częściowo ominąć blok enzymatyczny wywołany stosowaniem MTX, a przez to ograniczyć jego toksyczne działanie

stu i do śmierci komórki. Są one niezbędne również do rozwoju, przeżycia oraz stymulowanej antygenem proliferacji limfocytów T, a aktywacja tych komórek wiąże się ze wzrostem puli puryn i pirymidyn [45]. Z najnowszych badań [45] (dotyczących proliferacji limfocytów T) wynika, że te dwa rodzaje nukleotydów w zróżnicowany sposób regulują cykl komórkowy: puryny kontrolują fazę G1 aż do końca fazy S, podczas gdy pirymidyny wpływają tylko na progresję wczesnej do pośredniej fazy S. Ponadto zahamowanie syntezy pirymidyn indukuje apoptozę bez względu na to, w jakim czasie od aktywacji był dodany inhibitor, podczas gdy zahamowanie syntezy puryn indukuje śmierć apoptotyczną jedynie wtedy, gdy inhibitor został zastosowany do już dzielących się komórek. Sugeruje to, że zarówno puryny jak i pirymidyny są niezbędne do przeżycia komórek wchodzących w fazę S. Wyniki te wskazują na nieznaną dotąd rolę syntezy *de novo* puryn i pirymidyn w regulacji cyklu komórkowego i przeżycia aktywowanych komórek T. MTX może wywierać wpływ immunosupresyjny przez hamowanie syntezy jednego bądź obu rodzajów nukleotydów [19]. Indukcja przez ten lek apoptozy aktywowanych limfocytów jest jednym z mechanizmów jego aktywności immunosupresyjnej [3, 19]. MTX należy do leków swoistych fazowo, zabija komórki znajdujące się w fazie S cyklu komórkowego [19,41]. Oprócz działania proapoptotycznego, MTX i jego poliglutaminyne pochodne mogą hamować odpowiedź immunologiczną przez uwalnianie adenozyne z różnych typów komórek, które wykazują ekspresję ekto-5'-nukleotydazy (uwalnianie adenozyne odbywa się przez mechanizm wymagający przekształcenia nukleotydów adenozynowych z udziałem tego enzymu) [3, 19,31].

## ZASTOSOWANIE METOTREKSATU W KLINICE I JEGO DZIAŁANIE W DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANYCH ZABURZENIACH AUTOIMMUNOLOGICZNYCH U ZWIERZĄT

MTX znalazł szerokie zastosowanie kliniczne. Od wielu lat jest stosowany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (r.z.s.) [2, 3,23,39], jest to najważniejsze kliniczne zastosowanie MTX. W terapii r.z.s. lek ten należy do grupy tzw. leków modyfikujących chorobę. Jego podanie powstrzymuje postęp choroby przez blokowanie różnych elementów procesu immunologiczno-zapalnego leżącego u podłoża schorzenia. Najnowsze badania przeprowadzone na dużej liczbie pacjentów wykazały, że MTX jest bardziej skuteczny w leczeniu r.z.s. w porównaniu z innymi lekami z tej grupy: leflunomidem i sulfasalazyną [2]. Może to wynikać m.in. z tego, że MTX jest pochłaniany i zatrzymywany (w postaci poliglutaminyń) przez komórki T znajdujące się w spoczynku, a prowadzić do ich apoptozy po przejściu w stan pobudzenia. Stąd, w odróżnieniu od innych związków immunosupresyjnych i przeciwzapalnych, które muszą być podawane codziennie z powodu ich krótkiego czasu rozpadu lub odwracalnej aktywności, MTX może być stosowany również w okresie między ujawnianiem się objawów choroby [19]. Związek ten jest także skuteczny w leczeniu postaci układowej toczenia rumieniowatego (SLE) [26,57]. Stosowany jest głównie w ciężkich postaciach tej choroby (przebiegających z niewydolnością narządów) i pozwala zredukować dawki stosowanych jednocześnie przeciwzapalnych leków steroidowych. MTX wykorzystywany jest także w leczeniu łuszczycy [58], gdzie bezpośredni efekt leczniczy MTX w hiperplazji komórek nabłonka jest związany z hamowaniem syntezy DNA. Ponadto MTX hamuje chemotaksję neutrofilów do skóry prowadząc do zmian w potencjalnie patologicznej aktywności neutrofilów powszechnie obecnych w uszkodzonej tkance. MTX znalazł również (w skojarzeniu z cyklosporyną – CsA) zastosowanie u pacjentów z anemią aplastyczną leczonych przeszczepem szpiku kostnego jako profilaktyka choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) [16]. Podobne zastosowanie MTX znajduje u pacjentów cierpiących na inne choroby wymagające przeszczepienia szpiku (choroby nowotworowe, ciężkie niedobory immunologiczne). Ocenił także kliniczną i hematologiczną odpowiedź na MTX u kobiet z zespołem Feltyego (przewlekłe zapalenie wielostawowe z powiększeniem śledziony i neutropenią, w patogenezie uczestniczy prawdopodobnie autologiczna reakcja spowodowana obecnością kompleksów immunologicznych), u których od 1–3 lat występowała neutropenia [18]. U wszystkich pacjentek nastąpił szybki i znaczny wzrost liczby krążących neutrofilów w ciągu 1–2 miesięcy od początku zastosowania terapii. Wykazano też obniżenie poziomu przeciwciał reagujących z neutrofilami.

W celu wyjaśnienia mechanizmu leczniczego działania MTX w różnych chorobach autoimmunizacyjnych zastosowano modele zwierzęce, będące odpowiednikami zaburzeń immunologicznych u człowieka. W badaniach na myszach z doświadczalnie indukowanym SLE (odpowiednik toczenia rumieniowatego) zastosowano MTX w fazie choroby, gdy myszy wytwarzały już wysokie poziomy auto-przeciwciał. Preparat podawano przez 10 miesięcy [48]. Chociaż MTX nie miał wpływu na indukowane wytwarza-

nie autoprzeciwił, korzystnie wpływał na kliniczne objawy choroby, takie jak: liczba leukocytów, stężenie białka w moczu i depozytów kompleksów immunologicznych w nerkach. Podawanie MTX myszom odwracało także zmiany w wytwarzaniu cytokin u chorych zwierząt (zwiększone wytwarzanie IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-10 a obniżone IL-2, IL-4 i IL-6). W innym opracowaniu, dotyczącym tego samego modelu [11], badano kinetykę wytwarzania kilku cytokin zaangażowanych w rozwój SLE. Po 2 tygodniach od indukcji choroby obserwowano znaczny wzrost wytwarzania TNF- $\alpha$  przez makrofagi i splenocyty, a po miesiącu wzrost wytwarzania IL-1. Później rejestrowano podwyższone poziomy IL-2 i IFN- $\alpha$  (2–4 miesiące). Zastosowanie MTX u myszy (2 mg/kg m.c. jeden raz w tygodniu przez 7 miesięcy) spowodowało powrót poziomu cytokin do wartości otrzymanych u myszy kontrolnych. W końcowej fazie choroby (po 5 miesiącach) u zwierząt otrzymujących MTX przeważały cytokiny typu Th2: IL-4 i IL-10. W zjawiskach autoimmunizacji dominuje odpowiedź typu komórkowego, w której główny udział mają limfocyty Th1 i wytwarzane przez nie cytokiny: IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF. Niektóre z cytokin prozapalnych (IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) odgrywają istotną rolę w immunopatogenezie tocznia, a ich duże stężenie w surowicy chorych potwierdza ten udział. Limfocyty Th2 wytwarzające m.in.: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$  przez swój antagonistyczny wpływ na limfocyty Th1 i odpowiedź typu komórkowego, mogą hamować rozwój choroby. MTX, odtwarzając prawidłowy profil wytwarzania cytokin, wpływa korzystnie na przebieg leczenia. Oceniano także skuteczność działania MTX oraz innego antagonisty kwasu foliowego, MX-68, na rozwój autoimmunizacyjnej choroby nerek, która rozwija się spontanicznie u myszy MRL/lpr (odpowiednik uszkodzeń nerek występujących w SLE) [33]. Oba leki opóźniały wystąpienie białkomoczu i przedłużały przeżycie zwierząt w sposób zależny od dawki. Ponadto obniżały podniesiony poziom azotu mocznikowego i cholesterolu w surowicy. Efekty terapeutyczne nie były jednak powiązane z ograniczeniem wytwarzania autoprzeciwił i proliferacji komórek oraz z obniżeniem poziomu kompleksów immunologicznych w surowicy.

W badaniach prowadzonych na modelach zapalenia stawów oceniano wpływ farmakologicznego działania MTX na maziówkę stawów pacjentów z r.z.s, używając myszy SCID, którym wszczepiono tkankę pobraną od chorych [36]. MTX podawano myszom doustnie i badano nasilenie procesów apoptozy w obrębie wszczepionej tkanki maziówkowej. Porównywano też działanie innych związków przeciwzapalnych, takich jak: salazosulfapirydyna, auranofin, bucylamina i indometacyna. Jednakże indukcję apoptozy stwierdzono tylko w przypadku MTX. Spowodowało to znaczny spadek liczby komórek zapalnych w zmienionej tkance. Właściwości proapoptotyczne leku mogą się przyczyniać do jego przeciwzapalnego działania w r.z.s. W modelu adiuwantowego zapalenia stawów u szczurów wykazano różnice w działaniu MTX i takrolimusu (FK-506, inhibitor kalcynuryiny o silniejszym działaniu immunosupresyjnym od CsA) [30]. Stwierdzono, że FK-506 był bardziej skuteczny niż MTX w obniżaniu podniesionego poziomu cytokin prozapalnych, takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-6, gdyż MTX powodował obniżenie je-

dynie stężenia IL-1 $\beta$ . Zajmowano się także działaniem MTX w modelu kolagenowego zapalenia stawów u myszy [37]. Dootrzewnowe podanie MTX przed wystąpieniem objawów zapalenia całkowicie zapobiegało pojawieniu się klinicznych i patologicznych zmian. Było to związane ze znacznym zahamowaniem wytwarzania TNF- $\alpha$  przez komórki śledziony. Dane te wskazują na mechanizm hamowania reumatoidalnego zapalenia stawów u pacjentów.

#### DZIAŁANIE METOTREKSATU NA CYKL KOMÓRKOWY I METABOLIZM KOMÓRKI

Mechanizm działania MTX był analizowany na różnorodnych modelach doświadczalnych, głównie *in vitro*. Oceniano wpływ tego związku na apoptozę, cykl komórkowy, wytwarzanie cytokin, różnicowanie komórek i hemopoetę. W porównawczych badaniach wielu związków immunosupresyjnych, takich jak: deksametazon, kwas mykofenolowy (MPA), FK-506, CsA, rapamycyna, cyklofosfamid (CP) i MTX, stwierdzono, że tylko MTX i CsA zapobiegały antygenowo swoistej proliferacji komórek T oraz obniżały cytotoksyczność komórek T poprzez indukcję apoptozy [52]. Wpływ MTX na apoptozę pobudzonych komórek T był także badany na modelu komórek T ludzkiej krwi obwodowej [19]. Komórki poddano działaniu MTX (0,1–10  $\mu$ M) przez 8 godzin, po czym je aktywowano. Wykazano, że MTX indukował apoptozę pobudzonych komórek T, a wystąpienie apoptozy wymagało przejścia komórek do fazy S cyklu komórkowego i było odwracane przez związki lub przeciwciała, które interferują z syntezą lub ścieżkami sygnałowymi IL-2. Apoptoza była niezależna od interakcji APO-1/Fas (CD95) z jego ligandem (receptor Fas jest odpowiedzialny za przewodzenie sygnału apoptozy). Co więcej, MTX podany pacjentom z r.z.s. prowadził do apoptozy pobranych od nich limfocytów, aktywowanych następnie *in vitro*. Wyniki te wskazują, że związek ten może selektywnie usuwać aktywowane limfocyty krwi, a to może tłumaczyć immunosupresyjny wpływ leczenia z użyciem jego małych dawek. Na modelu hodowli komórek śródbłonna z naczyń płucnych wołu wykazano, że traktowanie tych komórek MTX powodowało znaczny spadek liczby hodowanych komórek znajdujących się w fazie intensywnego wzrostu (po 4 dniach ekspozycji na ten związek) [32]. Jednakże MTX dodany do hodowli komórek znajdujących się w fazie postmitotycznej (niedzielących się) również obniżał ich liczbę po 1, 3 i 4 dniach ekspozycji na ten związek. Wyniki te wskazują, że apoptoza jest jednym z mechanizmów uszkodzenia komórek śródbłonna przez MTX, przy czym może ona dotyczyć nie tylko komórek w fazie S czy G1 cyklu komórkowego, ale także komórek znajdujących się w fazie spoczynkowej.

Badanie wpływu MTX na wytwarzanie cytokin było związane głównie z próbą wytłumaczenia działania leczniczego tego związku w reumatoidalnym zapaleniu stawów. I tak, badano wpływ MTX na wytwarzanie IL-1 (będącej główną cytokiną odpowiedzialną za destrukcję tkanki chrzęstnej [38]) przez ludzkie komórki krwi obwodowej oraz mysie komórki z jamy otrzewnowej i śledziony stymulowane LPS [49]. Nie zaobserwowano zahamowania wytwarzania IL-1, ale w innych testach, mierzących aktywność IL-1, np. z użyciem linii D10.G4.1 (linia mysich



komórek Th), wykazano, że MTX jest w stanie hamować działanie IL-1 na komórki tej linii (hamowanie proliferacji zależnej od IL-1). Hamowanie aktywności IL-1, bez wpływu na jej wytwarzanie czy uwalnianie, może być jednym z mechanizmów działania MTX w r.z.s. Najnowsze badania przeprowadzone u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów również wskazują, że właściwości przeciwzapalne MTX w tej chorobie mogą wynikać z jego wpływu na wytwarzanie cytokin [1, 21, 39]. W testach *in vitro* badano wytwarzanie cytokin przez komórki krwi obwodowej chorych. Spontaniczne (ale nie stymulowane LPS) wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) było znacznie większe w porównaniu z osobami zdrowymi [1]. Dwie grupy pacjentów: otrzymująca MTX oraz otrzymująca placebo, na początku leczenia wykazywały podobny poziom zarówno spontanicznego jak i indukowanego uwalniania cytokin. Po 4 tygodniach stosowania MTX stwierdzono znaczny spadek wytwarzania IL-6 stymulowanego LPS, w porównaniu do chorych otrzymujących placebo. Obniżenie uwalniania IL-6 przez aktywowane komórki może być odpowiedzialne za przeciwzapalne właściwości metotreksatu. Lek ten miał także hamujący wpływ na wytwarzanie cytokin przez pobudzone limfocyty T oraz monocyty krwi obwodowej pacjentów z r.z.s. [21]. Efekt ten dotyczył: IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, w mniejszym stopniu: IL-1, IL-8, IL-6. Nowak i wsp. badali wpływ terapii MTX (w skojarzeniu z prednizonem) na poziom IL-1 oraz IL-6 we krwi pacjentów chorych na r.z.s. [39]. U chorych tych stwierdzano znacznie podwyższone stężenia tych cytokin (średnio: 4, 6 i 9, 2 razy odpowiednio dla IL-1 i IL-6). Po 6 miesiącach podawania MTX stężenia te obniżyły się prawie dwukrotnie i było to połączone z poprawą stanu klinicznego pacjentów.

Na innym modelu (choroba GvH u myszy) badano immunomodulujący wpływ małych dawek MTX [22]. Podawanie myszom F1 małej dawki MTX, odpowiadającej dawkom stosowanym u pacjentów z r.z.s, zapobiegało supresji funkcji komórek T mierzonej wytwarzaniem IL-2 i odpowiedzią na mitogeny. Mechanizm tego ochronnego działania polegał na hamowaniu proliferacji komórek supresorowych zarówno dawcy jak i biorcy. Nie dotyczyło to komórek CD4+ dawcy, których funkcja nie była zakłócona. W innej pracy [17] podawanie myszom małej dawki MTX (0,45 mg/kg m.c.) przez 4 tygodnie powodowało znaczne hamowanie uwalniania TNF- $\alpha$  i tlenu azotu po podaniu LPS, natomiast wytwarzanie IL-10 było niezmiennione. Zjawisko to było wynikiem mniejszego wytwarzania cytokin przez makrofagi z jamy otrzewnowej. MTX nie hamował uwalniania TNF- $\alpha$  przez komórki T, co stwierdzono obserwując brak jego wpływu na poziom tej cytokiny po podaniu myszom ConA lub przeciwciał anty-CD3 (użytych w celu stymulacji komórek T). W innych badaniach [54] okazało się, że MTX może również wpływać na wytwarzanie IL-10, jednej z głównych cytokin regulujących różnicowanie komórek Th. Związek ten (w stężeniu 10  $\mu$ M) powodował słabą, aczkolwiek statystycznie znaczącą, redukcję wytwarzania IL-10 przez stymulowane ConA komórki D10.G4.1 w obecności IL-1. Wydaje się prawdopodobnym, że mechanizm hamującego działania MTX na syntezę cytokin prozapalnych jest następstwem hamowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co wykazano na modelu komórek Jurkat

(komórki nowotworowe wywodzące się z limfocytów T), ale zjawisko to dotyczy również innych typów komórek [31]. Takie działanie MTX zachodzi głównie za pośrednictwem uwalniania adenozyiny (dodatek adenozyiny nasładował efekt MTX, a antagonisty receptorów adenozyiny go znosił). Supresja aktywacji NF- $\kappa$ B przez uwalnianie adenozyiny może w dużym stopniu przyczynić się do przeciwzapalnych, antyproliferacyjnych i immunomodulujących właściwości MTX. Sprawdzono także, czy MTX interferuje z wiązaniem IL-1 do jej receptora [7]. Doświadczenia przeprowadzono na monocytach, limfocytach i granulocytach krwi obwodowej używając ludzkiej rekombinowanej IL-1. MTX powodował znaczną obniżkę wiązania IL-1 $\alpha$  do jej receptora. Dla porównania, metylprednizolon i indometacyna były nieefektywne. MTX nie wpływał na integralność receptora i komórek docelowych, blokował natomiast interakcje między IL-1 a jej receptorem. Związek ten jest zatem efektywnym inhibitorem działania IL-1.

Wykazano też różnice w mechanizmie działania kwasu mykofenolowego (MPA) – inhibitora dehydrogenazy inozynomonofosforanu i MTX – antagonisty kwasu foliowego, inhibitora dehydrogenazy tetrahydrofolianowej [12]. Małe stężenia obu związków hamowały wytwarzanie cytokin przez komórki T w hodowlach komórek krwi obwodowej. Jednak hamowanie wytwarzania cytokin przez MPA było głębsze i zaczynało się wcześniej w porównaniu z MTX. MTX indukował apoptozę w komórkach T, które zostały pobudzone, podczas gdy MPA w sposób odwracalny zapobiegał aktywacji komórek T przez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1.

Stwierdzono również, że MTX wpływa na różnicowanie komórek z linii monocytarnej. Celem badania [8] było określenie, czy taki mechanizm działania MTX może tłumaczyć korzystny wpływ tego związku w leczeniu białaczki monoblastycznej. MTX dodawano do hodowli komórek U937 (linia komórek ludzkiej białaczki monoblastycznej) osobno, lub z GM-CSF i po 72 godzinach badano odsetek komórek CD14+. Inkubacja z MTX (20 nmol/L) powodowała zmiany morfologiczne komórek oraz wzrost odsetka komórek CD14+ z 3 do 20% (cząsteczka CD14 jest obecna na większości prawidłowych monocytów krwi obwodowej, a jej pojawienie się wskazuje na częściowe różnicowanie komórek). Po podaniu MTX z GM-CSF, odsetek ten wzrastał do 63%. Wyniki te wskazują, że małe dawki MTX podawane z GM-CSF znacznie stymulują różnicowanie monocytów i mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu białaczki monoblastycznej. Na podobnym modelu badano wpływ MTX na różnicowanie monocytów i wytwarzanie inhibitorów cytokin przez te komórki, jako próbę tłumaczenia przeciwzapalnych właściwości tego związku u pacjentów z r.z.s. [50]. Zastosowano linię U937, jednojądrzaste komórki szpiku i jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells – PBMC). MTX znacznie stymulował różnicowanie komórek U937, jednocześnie podnosząc ekspresję antygenu Fas. Różnicowanie to było połączone ze zwiększeniem wytwarzania przez monocyty U937 antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) i rozpuszczalnego receptora TNF- $\alpha$  (sTNFR). W przypadku szpiku i PBMC, metotreksat miał mniejszy wpływ na różnicowa-

nie tych komórek, ale także i tutaj obserwowano stymulację uwalniania IL-1Ra, występowało też hamowanie syntezy IL-1 $\alpha$  przez PBMC. Wyniki te wskazują, że MTX działa jako silny czynnik różnicujący niedojrzałe monocyty. Efekt ten jest połączony ze wzrostem uwalniania naturalnych inhibitorów cytokin z jednoczesnym spadkiem wytwarzania IL-1 $\beta$ . To z kolei tłumaczy istotne klinicznie, przeciwwzpalne działanie MTX w leczeniu r.z.s.

MTX, podobnie jak wiele leków przeciwnowotworowych, wykazuje małą selektywność w stosunku do komórek nowotworowych, działa również na szybko proliferujące prawidłowe tkanki gospodarza, a jego efektywność jest limitowana przez toksyczność w stosunku do tych tkanek (głównie nabłonka przewodu pokarmowego i szpiku kostnego) [53]. MTX wpływa na hemopoezę w sposób zależny od dawki. W badaniach [53] dotyczących wpływu MTX na tworzenie się kolonii hemopoetycznych szpiku w półpłynnym agarze, stwierdzono, że związek ten (w całym zakresie badanych stężeń: 10 nM–1  $\mu$ M) nie jest cytotoksyczny w stosunku do hemopoetycznych komórek progenitorowych szpiku; może natomiast indukować odwracalny blok w proliferacji i różnicowaniu tych komórek. Na modelu mysim badano także wpływ dużej dawki MTX, podanego *in vivo*, na wczesną rekrutację prekursorów granulocytów [44]. Wyniki oceniano *in vitro* w wolnej od MTX agarowej hodowli komórek szpiku. Ciągła ekspozycja myszy na MTX (stężenie związku w surowicy 10  $\mu$ M) powodowała gwałtowny spadek ogólnej liczby komórek w szpiku (do 35% wartości kontrolnej). Spadek ten, w ciągu pierwszych 24 godzin ekspozycji na MTX, dotyczył zarówno wielopotencjalnych komórek pnia (CFU-S), jak i komórek ukierunkowanych (CFU-C). Jednakże, w przeciwieństwie do dodatkowego spadku liczby CFU-S od godziny 24 do 48, obserwowano w tym czasie wzrost liczby CFU-C. Sugeruje to rekrutację CFU-C z puli CFU-S pomiędzy 24-48 godziną, pomimo kontynuowania infuzji MTX. Hauser i wsp. w swoich badaniach [25] wykazali niewielką toksyczność MTX w stosunku do komórek zrębu (podścieliska) szpiku. Komórki te wypełniają jamy szpikowe kości, m.in. przez wytwarzanie cytokin tworzą środowisko sprzyjające procesom hemopoety. Na mysim modelu *in vitro* (długoterminowa hodowla komórek szpiku) oceniano wpływ 1  $\mu$ M MTX na morfologię zrębu oraz hemopoezę. MTX początkowo powodował niewielkie zmiany w morfologii podścieliska, później natomiast nastąpił znaczny wzrost ogólnej liczby tworzących go komórek, w tym: fibroblastów, komórek śródbłonka, komórek tłuszczowych oraz makrofagów. Wraz z odnową komórek zrębu odnawiała się także hemopoza. Te wyniki wskazują, że MTX nie ma bezpośredniego toksycznego wpływu na komórki podścieliska, co więcej, pod wpływem MTX ich liczba nawet wzrasta, co może się przyczyniać do wzrostu hemopoety.

#### **DZIAŁANIE METOTREKSATU NA ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ**

Literatura dotycząca wpływu MTX na odpowiedź immunologiczną jest skąpa i pochodzi głównie z lat 70. i 80. ub. w. W większości prac opisano hamujący wpływ MTX. Badano działanie MTX (na tle innych związków immunosupresyjnych) na humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną myszy na antygen komórek linii nowotwo-

rowej EL4. Było to działanie hamujące w całym zakresie stosowanych dawek i dotyczyło zarówno odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej [42]. W odpowiedzi humoralnej (mierzonej liczbą komórek wytwarzających przeciwciała – PFC) u myszy, obserwowano różne następstwa działania MTX, w zależności od czasu jego podania względem momentu immunizacji zwierząt [14]. MTX (0,5 mg/kg m.c.), podany w jednorazowej dawce w okresie 1–10 dni przed immunizacją, nie powodował supresji odpowiedzi immunologicznej. Podanie związku 6–9 dni przed immunizacją miało wyraźnie stymulujący wpływ (320–350% wartości kontroli), natomiast podawanie leku codziennie przez 6 dni nie powodowało istotnych zmian w natężeniu odpowiedzi immunologicznej, a jedynie zastosowanie MTX przez 7–8 dni znacznie ją obniżało. Autorzy konkludują, że czas odnowy populacji komórek immunokompetentnych w śledzeniu myszy wynosi 6–9 dni. Badano również wpływ podania MTX (2,5 mg/kg m.c.) w 48 lub 72 godzinie po immunizacji, na odpowiedź immunologiczną myszy na erytrocyty barana (SRBC), wyrażoną liczbą PFC w śledzeniu, którą mierzono w odstępach 4-godzinnych [46]. W grupie kontrolnej wzrost odpowiedzi immunologicznej był wykładniczy i wykazywał wzorzec „schodkowy”. Po podaniu MTX wzór odpowiedzi immunologicznej zmieniał się na „falowy”, to znaczy po wzroście odpowiedzi następował jej spadek. Znaczny wzrost liczby PFC, zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i traktowanych MTX stwierdzano w godzinach 60, 72–76, 84–88 po immunizacji. Autorzy sugerują, że MTX nie zapobiega rekrutacji komórek prekursorowych PFC i w konsekwencji liczba PFC wzrasta. Obniżenie liczby PFC pod wpływem MTX prawdopodobnie wynikało ze zjawiska „niezbilansowanego wzrostu”. Z kolei, używając modelu matematycznego, w oparciu o dane literaturowe ustalono, że MTX podany 72 godziny po immunizacji powodował śmierć komórek B we wczesnej fazie G1 i w fazie S, blokadę fazy S i obniżenie wytwarzania przeciwciał z powodu upośledzenia syntezy RNA i białka [28].

Podanie MTX w liposomach, wraz z immunizacją albuminą surowicy bydłowej (BSA) zawartą w innych liposomach, wywoływało supresję humoralnej odpowiedzi immunologicznej (mierzoną liczbą PFC) [51]. Supresja ta wystąpiła, gdy MTX podano 1 dzień przed, w czasie immunizacji i 1 dzień po immunizacji. Natomiast użycie MTX zamkniętego w liposomach oplaśzczonych BSA podnosiło lub obniżało odpowiedź immunologiczną. Wyniki te wskazują, że zamknięcie związku immunosupresyjnego w małych dawkach w liposomach może modyfikować wywierane przez niego działanie immunologiczne (lek obecny w tym samym stężeniu w wolnej postaci nie wykazuje istotnego działania na odpowiedź immunologiczną).

W porównawczym badaniu wpływu MTX i trimetreksatu, będącego alternatywnym związkiem dla MTX, o podobnym mechanizmie działania, wykazano, że oba związki były silnymi supresorami zależnej od komórek T odpowiedzi immunologicznej (hamowały, w sposób zależny od dawki, uwarunkowane obecnością komórek T tworzenie przeciwciał) [47]. Związki te także znacząco hamowały proliferację limfocytów stymulowanych LPS lub PHA. Najwyższą aktywność supresorową wykazywały po dodaniu do stymulowanych limfocytów po 24–48 godzi-

nach hodowli. Oba leki podane *in vivo* znacznie hamowały również aktywność naturalnych komórek zabijających (NK).

Inne badania [9, 10] tłumaczą właściwości immunosupresyjne małych dawek MTX w modelu alogenicznego przeszczepu serca u szczurów. W procesie odrzucania przeszczepu istotna jest infiltracja tkanek przeszczepu przez leukocyty gospodarza, a dużą rolę odgrywa tu obecność cząsteczek adhezyjnych, zarówno na powierzchni leukocytów, jak i komórek śródbłonka naczyń. Autorzy badań wykazali, że MTX obniżał ekspresję cząsteczek adhezji komórkowej: podjednostki  $\beta 2$ -integriny (CD18) na powierzchni leukocytów oraz jej receptora (ICAM-1), pojawiającego się podczas odpowiedzi immunologicznej na powierzchni komórek śródbłonka naczyń obwodowych węzłów chłonnych i śledziony. Ograniczał tym samym naciekanie tkanek przeszczepu przez leukocyty biorcy. MTX zmniejszał również infiltrację przeszczepu przez limfocyty T, a podany z małymi dawkami CsA, przedłużał także czas przeżycia przeszczepu. Immunosupresyjne działanie MTX w tym modelu może być zatem związane z wpływem tego związku na wczesne etapy odpowiedzi immunologicznej – adhezję leukocytów do śródbłonka podczas ich migracji przez naczynia krwionośne.

#### OGRANICZENIA W STOSOWANIU METOTREKSATU I ZAPOBIEGANIE JEGO TOKSYCZNOŚCI

Stosowanie MTX, podobnie jak innych cytostatyków, wiąże się z wystąpieniem niebezpiecznych objawów niepożądanych będących skutkiem toksyczności leku. Szybko proliferujące tkanki gospodarza – nabłonek przewodu pokarmowego, komórki naskórka i komórki szpiku kostnego są szczególnie wrażliwe na działanie tego antymetabolitu (największe uszkodzenia są wynikiem stosowania dużych dawek MTX). Następstwem polekowego (najczęściej odwracalnego) uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego mogą być stany zapalne, nudności, wymioty, biegunka, a nawet owrzodzenia prowadzące do perforacji ścian przewodu pokarmowego. Uszkodzenie wątroby przez MTX ma najczęściej charakter łagodny i mija po odstawieniu preparatu. Długie stosowanie leku (np. w łuszczycy) może prowadzić do zwłóknienia i marskości tego narządu. Groźnym powikłaniem, aczkolwiek odwracalnym, leczenia MTX jest niewydolność nerek związana z bezpośrednim toksycznym działaniem na kanaliki nerkowe. Stosowanie dużych dawek MTX, lub jego dokanałowe podanie, uszkadza również układ nerwowy, czego objawem mogą być zaburzenia świadomości, zaburzenia mowy, porażenia, drgawki. Objawy te są zwykle przejściowe [13,15,41]. Zastosowanie MTX w warunkach niekorzystnych, dodatkowo obciążających organizm (wiek, stan odżywienia, uprzednie leczenie, choroby współistniejące) obniża tolerancję na lek zwiększając jego toksyczny wpływ. Gorsza regeneracja po zastosowaniu dużych dawek MTX była obserwowana u osób uprzednio leczonych cytostatykami lub napromienianych. Choroby przewlekłe (np. kolagenozy) leczone długoterminie niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, także wpływają niekorzystnie na regenerację układu krwiotwórczego po leczeniu cytostatykami [41]. Czynnikiem niekorzystnym, zwiększającym toksyczność chemioterapii mo-

że być również stres. W badaniach na szczurach [56] wykazano, że psychiczny stres, wynikający z umieszczenia zwierząt pojedynczo w klatkach, prawie 2-krotnie zwiększał cytotoksyczny wpływ MTX na przewód pokarmowy. U zwierząt poddanych stresowi zaobserwowano dodatkowo hamowanie proliferacji enterocytów, zwiększoną apoptozę komórek śródbłonka, uszkodzenie kosmków jelitowych, wygładzenie krypt oraz zaburzenia w wytwarzaniu mucyn i enzymów jelitowych. Wyniki te wskazują, że unikanie stresu psychicznego podczas chemioterapii lekami cytostatycznymi może ograniczać niekorzystny wpływ leczenia na stan i funkcjonowanie przewodu pokarmowego pacjentów. Występowanie współistniejących chorób może ujawniać lub nasilać niekorzystne działanie chemioterapii. Mitchell i Turk [34] w swoich badaniach wykorzystali zwierzęcy model ziarniniakowej choroby jelit przypominającej chorobę Crohna u ludzi (przewlekły proces zapalny obejmujący całą ścianę jelita). Przez inokulację do jelita krętego BCG lub napromienionych *Mycobacterium leprae*, u świnek morskich wywołano zmiany ziarniniakowe w ścianie jelita składające się z komórek nabłonka i makrofagów. Zastosowanie leków immunosupresyjnych (CP, MTX, CsA) ograniczało tworzenie zmian ziarniniakowych przez ograniczenie infiltracji komórek do miejsc inokulacji bakterii. U zwierząt otrzymujących MTX stwierdzono także zwiększoną, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, liczbę prątków BCG w miejscu podania. O osłabieniu odpowiedzi immunologicznej po podaniu leków immunosupresyjnych świadczy też obniżona odpowiedź zwierząt po podaniu PPD (oczyszczonego białka z *Mycobacterium*; PPD podane śródskórnym w tzw. teście tuberkulinowym, u zwierząt lub osób, które wcześniej zetknęły się z prątkami gruźlicy dają odczyn świadczący o uczuleniu).

Niekorzystny wpływ MTX na ustrój można złagodzić przez podanie pewnych preparatów lub cytokin. Ekstrakt wodny z *Astragali radix* chronił przed supresją odpowiedzi proliferacyjnej na mitogen splenocytów myszy traktowanych MTX [27]. Ten immunomodulujący wpływ preparatu mógł być częściowo związany ze zwiększoną ekspresją mRNA dla IL-1 $\alpha$  i IL-12p40 w tych komórkach. Badano też skojarzone działanie wyciągu z *Cordyceps sinensis* z MTX na przeżycie myszy obciążonych czerniakami B16 [35]. Chociaż sam MTX powodował znaczny spadek masy ciała, to podanie go z ekstraktem nie wywoływało takiego efektu. Poza tym średnie przeżycie zwierząt było dłuższe przy podaniu MTX i ekstraktu w porównaniu z przeżyciem myszy otrzymujących ekstrakt lub MTX oddzielnie. Toksyczność dużych dawek MTX dla tkanek prawidłowych można zmniejszyć przez podanie folinianu wapnia (sól wapniowa kwasu folinowego; leukoworyna) (ryc. 1C). Pozwala to częściowo ominąć blok enzymatyczny wywołany stosowaniem MTX [13,15,41]. Związek ten zwiększa wewnątrzkomórkową zawartość zredukowanych folianów, co pozwala na utrzymanie syntezy DNA, mimo wywołanego przez MTX bloku enzymatycznego. Zwiększa ponadto wpływ wolnej frakcji leku z komórek oraz hamuje syntezę poliglutaminianów [15]. Leukoworyna może zapobiegać cytotoksycznym konsekwencjom podawania MTX na proces hemopoezy [43]. Wykazano to na modelu mysim przy zastosowaniu jednorazowej dużej dawki MTX (500 mg/kg m.c.) i leukoworyny podawanej w podzielonych dawkach



przez okres następných 24 godzin. MTX, w ciągu 1–2 dni od podania, powodował znaczną depopulację komórek śledziony i szpiku kostnego (komórek wielopotencjalnych i ukierunkowanych oraz dających się zidentyfikować prekursorów). W ciągu 2–3 dni obserwowano gwałtowny spadek liczby leukocytów krwi i retikulocytów. Leukoworyna chroniła wszystkie etapy hemopoetyki i zapobiegała spadkowi liczby komórek w szpiku i zawartości komórek pnia. Korzystne działanie leukoworyny w mniejszym stopniu dotyczyło komórek krwi obwodowej. Działanie leukoworyny było największe w stosunku do najwcześniejszych etapów hemopoetyki; jej zastosowanie zapewniało utrzymanie w szpiku zadawalającej liczby komórek pnia oraz komórek progenitorowych. Leukoworyna dawała też „ochronę“ w uszkodzeniach skóry podczas leczenia MTX – nawet stosowanie dużych dawek leku z jednoczesnym podaniem leukoworyny nie powodowało wypadania włosów [41]. Leukoworyna zmniejsza też toksyczne działanie MTX na błonę śluzową przewodu pokarmowego [41]. Okazało się także, że ochronną rolę w zapobieganiu uszkodzeniu nabłonka jelita przez MTX może spełniać TGF- $\alpha$ , zarówno egzogenny jak i wytwarzany endogennie [59]. Wykazano to na modelu myszy z nokautem genu dla TGF- $\alpha$  i u myszy niemodyfikowanych genetycznie. Chociaż nokaut genu dla TGF- $\alpha$  nie upośledzał w istotny sposób regeneracji komórek nabłonka jelita cienkiego uszkodzonych przez MTX, to powodował wyższą odpowiedź apoptotyczną w pierwszych godzinach po podaniu MTX i opóźnioną oraz ograniczoną proliferację komórek krypt w czasie regeneracji. Z kolei po podaniu MTX myszom kontrolnym, wytwarzających TGF- $\alpha$ , poziom mRNA dla tej cytokiny ulegał znacznemu podwyższeniu w czasie pierwszych godzin po podaniu leku i później, podczas regeneracji. Świadczy to o tym, że TGF- $\alpha$  może odgrywać dużą rolę we wczesnej odpowiedzi apoptotycznej i występującej później odpowiedzi proliferacyjnej komórek nabłonka jelit uszkodzonych przez MTX.

W badaniach własnych wykazano, że laktoferyna (LF) – białko związane z metabolizmem żelaza i stanowiące ważny element odporności wrodzonej [29] ma zdolność do rekonstrukcji funkcji układu immunologicznego po zastosowaniu niektórych cytostatyków. Na modelu mysim stwierdzono, że LF przyspieszała odnowę odpowiedzi komórkowej [5] i humoralnej [6] oraz normalizowała poziom leukocytów i proporcje głównych typów komórek krwi obwodowej [4] po podaniu myszom jednorazowej, subletalnej dawki cyklofosfamidu. Ponadto, nasze wyniki doświadczalne wykazały, że LF powodowała odnowę odpowiedzi typu komórkowego po podaniu dużej dawki MTX (220 mg/kg m.c.) w 2 dobie po immunizacji (dane niepubliko-

wane). Inne badania *in vitro* (dane w przygotowaniu do druku) wykazały, że LF zapobiegała supresji przez MTX (w stężeniu wywołującym apoptozę komórek – 1  $\mu$ M) odpowiedzi immunologicznej na SRBC. Sugeruje to, że LF może zapobiegać apoptozie komórek indukowanej MTX.

Stwierdzono również ochronne działanie laktoferyny w toksycznym uszkodzeniu przewodu pokarmowego przez duże dawki MTX [55]. Szczury podczas terapii MTX były pojęte roztworem LF. W morfologii przewodu pokarmowego zwierząt kontrolnych wystąpiły znaczne zmiany: zniszczenie komórek nabłonka, wygładzenie kosmków jelitowych i zwiększenie przepuszczalności jelita. U zwierząt otrzymujących LF uszkodzenia były znacznie mniejsze (dłuższe kosmki jelitowe, większa powierzchnia chłonna jelita, mniejsza przepuszczalność). Takie ochronne działanie LF może wynikać z osłabienia ostrej odpowiedzi zapalnej lub osłabienia hamującego wpływu cytostatyku na proliferację komórek jelita.

Działanie ochronne LF, wykazane w różnych modelach doświadczalnych z udziałem CP i MTX wskazuje, że białko to może znaleźć zastosowanie w łagodzeniu skutków ubocznych chemioterapii. Co interesujące, w przypadku podawania MTX pacjentom, wzrastają w ich surowicach poziomy białek wykazujących działanie ochronne, takich jak: LF i białko C-reaktywne (CRP) [24]. Podobny efekt uzyskano u pacjentów z białaczką limfoblastyczną przy profilaktycznym (w ramach zapobiegania zajęciu centralnego układu nerwowego przez proces nowotworowy) dokanałowym podaniu MTX. U chorych zaobserwowano wzrost poziomu LF,  $\beta$ 2-mikroglobuliny i lizozymu w płynie mózgowo-rdzeniowym [40]. Laktoferyna, lizozym,  $\beta$ 2-mikroglobulina, białko C-reaktywne to białka uczestniczące w odporności nieswoistej organizmu, która ma duży udział m.in. w odpowiedzi organizmu na uraz, infekcję lub innego typu uszkodzenie tkanek, istotna jest więc także w reakcji organizmu na chemioterapię. Razem z opisanym wyżej zjawiskiem zwiększania się ekspresji mRNA dla TGF- $\alpha$  pod wpływem podania MTX [59], atrakcyjną wydaje się nasza hipoteza o naturalnej obronie ustroju, przeciwdziałającej toksycznym działaniom tego związku.

Przedstawione dane wskazują na różnorodność zastosowań MTX, który jest wciąż niezastąpiony w leczeniu i profilaktyce wielu zaburzeń immunologicznych. Opisać mechanizm działania tego związku, wpływ na odpowiedź immunologiczną w wybranych modelach doświadczalnych oraz sposoby ograniczenia jego toksyczności.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Aggarwal A., Misra R.: Methotrexate inhibits interleukin-6 production in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, 2003; 23: 134-137
- [2] Aletaha D., Stamm T., Kapral T., Eberl G., Grisar J., Machold K.P., Smolen J. S.: Survival and effectiveness of leflunomide compared with methotrexate and sulfasalazine in rheumatoid arthritis: a matched observational study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003; 62: 944-951
- [3] Allison A.C.: Immunosuppressive drugs: the first 50 years and glance forward. *Immunopharmacology*, 2000; 47: 63-83
- [4] Artym J., Zimecki M., Kruzel M.L.: Normalization of peripheral blood cell composition in cyclophosphamide treated mice by lactoferrin. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10(5): BR84-BR89
- [5] Artym J., Zimecki M., Kruzel M.L.: Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology*, 2003; 207: 197-205
- [6] Artym J., Zimecki M., Paprocka M., Kruzel M.L.: Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice. *Immunol. Lett.*, 2003; 89: 9-15



- [7] Brody M., Bohm I., Bauer R.: Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995; 31: 667-674
- [8] Chen J., Gu L.J., Ying D.M.: Low dose methotrexate combined with GM-CSF induced differentiation of U937 cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.*, 2003; 24: 430-432
- [9] Ciesielski C.J., Mei J., Piccinini L.A.: Effects of cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transpl. Immunol.*, 1998; 6: 122-133
- [10] Ciesielski C.J., Pflug J.J., Mei J., Piccinini L.A.: Methotrexate regulates ICAM-1 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transpl. Immunol.*, 1998; 6: 111-121
- [11] Dayan M., Segal R., Mozes E.: Cytokine manipulation by methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 1997; 24: 1075-1082
- [12] De Lathouder S., Gerards A.H., de Groot E.R., Valkhof M., Aarden L.A.: Mycophenolic acid and methotrexate inhibit lymphocyte cytokine production via different mechanisms. *Eur. Cytokine Netw.*, 2002; 13: 317-323
- [13] Denisso T., Kowalski D.M.: Przegląd leków stosowanych w chorobach nowotworowych. W: *Onkologia kliniczna*. Red. M. Krzakowski, t.1. Wydawnictwo Medyczne Borgis, Warszawa, 2001; 83-110
- [14] Dmitrieva N.B., Uteshev B.S.: Effect of methotrexate on the early stages of immunogenesis in mice. *Farmakol. Toksikol.*, 1988; 51: 75-78
- [15] Drzewoski J., Robak T.: *Farmakologia leków przeciwnowotworowych*. Wydawnictwo NAUKA, Warszawa, 1991
- [16] Dulle F.L., Vigorito A.C., Aranha F.J., Sturaro D., Ruiz M.A., Saboya R., Macedo M.C., Da Silva R.L., Chamone D.A., Mehta J., Bacigalupo A., De Souza C.A.: Addition of low-dose busulfan to cyclophosphamide in aplastic anemia patients prior to allogeneic bone marrow transplantation to reduce rejection. *Bone Marrow Transplant.*, 2004; 33: 9-13
- [17] Durez P., Appelboom T., Vray B., Pira C., Goldman M.: Methotrexate inhibits LPS-induced tumor necrosis factor production *in vivo*. *Eur. Cytokine Netw.*, 1998; 9: 669-672
- [18] Fiechtner J.J., Miller D.R., Starkebaum G.: Reversal of neutropenia with methotrexate treatment in patients with Felty's syndrome. Correlation of response with neutrophil-reactive IgG. *Arthritis Rheum.*, 1989; 32: 194-201
- [19] Genestier L., Paillot R., Fournel S., Ferraro C., Miossec P., Revillard J.P.: Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J. Clin. Invest.*, 1998; 102: 322-328
- [20] Genestier L., Paillot R., Quemeneur L., Izeradjene K., Revillard J.P.: Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*, 2000; 47: 247-257
- [21] Gerards A.H., de Lathouder S., de Groot E.R., Dijkmans B.A., Aarden L.A.: Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2003; 42: 89-96
- [22] Gibbons J.J., Jr., Lucas J.: Immunomodulation by low-dose methotrexate. I. Methotrexate selectively inhibits Lyt-2+ cells in murine acute graft-versus-host reactions. *J. Immunol.*, 1989; 142: 1867-1873
- [23] Graninger W., Smolen J.: Treatment of rheumatoid arthritis by TNF-blocking agents. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002; 127: 10-14
- [24] Gutteberg T.J., Stordal L., Kolmannskog S.: Lactoferrin and C-reactive protein in response to cytostatic drugs with emphasis on methotrexate. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1987; 4: 315-322
- [25] Hauser S.P., Udupa K.B., Lipschitz D.A.: Murine marrow stromal response to myelotoxic agents *in vitro*. *Br. J. Haematol.*, 1996; 95: 596-604
- [26] Kipen Y., Littlejohn G.O., Morand E.F.: Methotrexate use in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 1997; 6: 385-389
- [27] Lee Y.S., Han O.K., Park C.W., Suh S.I., Shin S.W., Yang C.H., Jeon T.W., Lee E.S., Kim K.J., Kim S.H., Yoo W.K., Kim H.J.: Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragalus radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 84: 193-198
- [28] Loginov A.V., Uteshev B.S., Livshits M.A.: Mathematical modelling of the action of methotrexate on the kinetics of B-lymphocyte proliferation during the primary response. *Farmakol. Toksikol.*, 1987; 50: 58-70
- [29] Lonnerdal B., Iyer S.: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1995; 15: 93-110
- [30] Magari K., Miyata S., Nishigaki F., Ohkubo Y., Mutoh S., Goto T.: Differential effects of FK506 and methotrexate on inflammatory cytokine levels in rat adjuvant-induced arthritis. *J. Rheumatol.*, 2003; 30: 2193-2200
- [31] Majumdar S., Aggarwal B.B.: Methotrexate suppresses NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha phosphorylation and degradation. *J. Immunol.*, 2001; 167: 2911-2920
- [32] Merkle C.J., Moore I.M., Penton B.S., Torres B.J., Cueny R.K., Schaeffer R.C. Jr., Montgomery D.W.: Methotrexate causes apoptosis in postmitotic endothelial cells. *Biol. Res. Nurs.*, 2000; 2: 5-14
- [33] Mihara M., Takagi N., Urakawa K., Moriya Y., Takeda Y.: A novel antifolate, MX-68, inhibits the development of autoimmune disease in MRL/lpr mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997; 113: 454-459
- [34] Mitchell I.C., Turk J.L.: Effect of the immune modulating agents cyclophosphamide, methotrexate, hydrocortisone, and cyclosporin A on an animal model of granulomatous bowel disease. *Gut*, 1990; 31: 674-678
- [35] Nakamura K., Konoha K., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M.: Combined effects of Cordyceps sinensis and methotrexate on hematogenic lung metastasis in mice. *Receptors Channels*, 2003; 9: 329-334
- [36] Nakazawa F., Matsuno H., Yudoh K., Katayama R., Sawai T., Uzuki M., Kimura T.: Methotrexate inhibits rheumatoid synovitis by inducing apoptosis. *J. Rheumatol.*, 2001; 28: 1800-1808
- [37] Neurath M.F., Hildner K., Becker C., Schlaak J.F., Barbulescu K., Germann T., Schmitt E., Schirmacher P., Haralambous S., Pasparakis M., Meyer Zum Buschenfelde K.H., Kollias G., Marker-Hermann E.: Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.*, 1999; 115: 42-55
- [38] Nixon J.S., Bottomley K.M., Broadhurst M.J., Brown P.A., Johnson W.H., Lawton G., Marley J., Sedgwick A.D., Wilkinson S.E.: Potent collagenase inhibitors prevent interleukin-1-induced cartilage degradation *in vitro*. *Int. J. Tissue React.*, 1991; 13: 237-241
- [39] Nowak D., Lewandowicz J., Dbkowska B., Marczak J.: Combination of methotrexate and prednisone decreases circulating concentrations of interleukin 1 beta and interleukin 6 in patients with rheumatoid arthritis. Poor correlation of cytokine suppression with clinical improvement. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 1999; 12: 13-21
- [40] Oberg G., Hallgren R., Venge P.: Beta 2-microglobulin, lysozyme and lactoferrin in cerebrospinal fluid in patients with lymphoma or leukaemia: relationship to CNS involvement and the effect of prophylactic intrathecal treatment with methotrexate. *Br. J. Haematol.*, 1987; 66: 315-322
- [41] Orzechowska-Juzwenko K., Kotlarek-Haus S.: Niepożądane następstwa chemioterapii nowotworów – sposoby ich zwalczania i zapobiegania. W: *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Red. Orzechowska-Juzwenko K. Volumed, Wrocław, 2000
- [42] Otterness I.G., Chang Y.H.: Comparative study of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, azathiopurine and methotrexate. Relative effects on the humoral and the cellular immune response in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976; 26: 346-354
- [43] Pannacchiulli I., Massa G., Bogliolo G., Ghio R., Sobrero A.: Effects of high-dose methotrexate and leucovorin on murine hemopoietic stem cells. *Cancer Res.*, 1982; 42: 530-534
- [44] Pinedo H.M., Chabner B.A., Zaharko D.S., Bull J.M.: Evidence for early recruitment of granulocyte precursors during high-dose methotrexate infusions in mice. *Blood*, 1976; 48: 301-307
- [45] Quemeneur L., Gerland L.M., Flacher M., Ffrench M., Revillard J.P., Genestier L.: Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J. Immunol.*, 2003; 170: 4986-4995
- [46] Romanycheva V., Babichev V.A., Uteshev B.S., Kalinkovitch A.G.: The kinetics of inhibition with methotrexate and vinblastine of the primary immune response to sheep red blood cells in mice. *Folia Biol. (Praha)*, 1978; 24: 343-354
- [47] Rosenthal G.J., Germolec D.R., Lamm K.R., Ackermann M.F., Luster M.L.: Comparative effects on the immune system of methotrexate and trimetrexate. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1987; 9: 793-801
- [48] Segal R., Dayan M., Zinger H., Mozes E.: Methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus (SLE); clinical benefits associated with cytokine manipulation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1995; 101: 66-72
- [49] Segal R., Mozes E., Yaron M., Tartakovsky B.: The effects of methotrexate on the production and activity of interleukin-1. *Arthritis Rheum.*, 1989; 32: 370-377

- [50] Seitz M., Zwicker M., Loetscher P.: Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum.*, 1998; 41: 2032-2038
- [51] Shek P.N., Lopez N.G., Heath T.D.: Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. IV. Modulation of antibody formation by vesicle-encapsulated methotrexate. *Immunology*, 1986; 57: 153-157
- [52] Strauss G., Osen W., Debatin K.M.: Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002; 128: 255-266
- [53] Stromhaug A., Warren D.J., Slordal L.: Effect of methotrexate on murine bone marrow cells *in vitro*: evidence of a reversible antiproliferative action. *Exp Hematol.*, 1995; 23: 439-443
- [54] Tomkins P.T., Cooper K.L., Appleby P., Webber D.G.: Effect of pharmacological agents on the productions of interleukin-10 by the murine D10.G4.1 TH2 cell line *in vitro*. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1995; 17: 619-625
- [55] Van Beek N.M.A., Van't Land B., Meijer H., Van Rossen M., Rabel L., Hoijer M., Van der Berg J.J.M.: The effect of orally administered lactoferrin on chemotherapy induced intestinal damage in rats. *Biochem. Cell Biol.*, 2002; 80: 5<sup>th</sup> International Conference on Lactoferrin, Banf, Alberta, Canada, 4-9 May, 2001; 160
- [56] Verburg M., Renes I.B., Einerhand A.W., Buller H.A., Dekker J.: Isolation-stress increases small intestinal sensitivity to chemotherapy in rats. *Gastroenterology*, 2003; 124: 660-671
- [57] Wallace D.J.: Management of lupus erythematosus: recent insights. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2002; 14: 212-219
- [58] Weinstein G.D., Jeffes E., McCullough J.L.: Cytotoxic and immunologic effects of methotrexate in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 1990; 95: 49S-52S
- [59] Xian C.J., Cool J.C., Howarth G.S., Read L.C.: Effects of TGF- $\alpha$  gene knockout on epithelial cell kinetics and repair of methotrexate-induced damage in mouse small intestine. *J. Cell Physiol.*, 2002; 191: 105-115