# Metotreksat - primjena u liječenju malignih bolesti

**Bradić, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:338004

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Department of Chemistry, Osijek









Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ivan Bradić

# Metotreksat – primjena u liječenju malignih oboljenja

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Katarina Mišković Špoljarić, dipl.ing.

Osijek, 2017. Godina

# SAŽETAK

Maligna oboljenja jedan su od glavnih uzroka smrti u svijetu. Karakteristika malignih stanica je nekontrolirana proliferacija te se stoga maligne stanice brzo razmnožavaju i prodiru u druga tkiva. Uzroci malignih oboljenja su brojni što dokazuju i razne studije i znastvena istraživanja. Danas postoji mnogo metoda liječenja malignih oboljenja, a koja metoda će se primijeniti određuje se ovisno o vrsta tumora i njegovoj uznapredovalost. Lijekovi koji se koriste u liječenju malignih oboljenja nazivaju se citostatici. Metotreksat je citostatik koji spada u skupinu antimetabolita, on je analog folne kiseline. Djelovanje metotreksata temelji se na inhibiciji dihidrofolat-reduktaze, enzima važnog u sintezi deoksitimidin monofosfata. Inhibicijom spomenutog enzima, metotreksat inhibira sintezu deoksitimidin monofosfata i tako onemogućava sintezu deoksiribonukleinske kiseline (eng.deoxyribonucleic acid-DNA). Metotreksat uz dihidrofolat-reduktazu inhibira i druge enzime važne u sintezi purina, serina i metionina. Budući da je polarna molekula za njegov prijenos potrebni su transporteri za prijelaz krvno-moždane barijere. Metotreksat se u stanici prevodi u metotreksat poliglutamate, 2,4-Diamino-N-10-metil-pteroičnu kiselinu i 7-hidroksi metotreksat. Metotreksat poliglutamat je aktiviran oblik metotreksata i može sadržavati do 6 glutamatskih ostataka. Primjenom metotreksata stanice razvijaju određenu otpornost prema lijeku zbog čega je prilikom liječenja potrebno povećavati dozu ili smanjivati vremenske intervale između primjene lijeka. Metotreksat se može primijeniti intratekalno, oralno, intravenozno ili intramuskularno. Prilikom korištenja metotreksata potrebna je stroga kontrola koncentracije metotreksata u krvi zbog jakog toksičnog djelovanja.


.


# KLJUČNE RIJEČI

Metotreksat, folna kiselina, maligna oboljenja, tumor.

# ABSTRACT

Malignant diseases are one of the most common causes of death in the world. The characteristic of malignant cells is uncontrolled proliferation, hence the malignant cells rapidly multiply and penetrate into other tissues. The causes of malignant illnesses are numerous, as evidenced by various studies and scientific research. There are many methods available for treating malignant diseases, but which will be applied depends on cancer type and stage at diagnosis. Cytotoxic drugs or cytostatics are used fore cancer treatment. Methotrexate, a folic acid analog is a cytostatic from antimetabolite group. Methotrexate inhibits dihydrofolate reductase, an enzyme essential to the deoxythymidine monophosphate synthesis. By inhibition of dihidrofolate reductase methotrexate disables DNA synthesis. Methotrexate also inhibits other enzymes important in purine, serine and methionine synthesis. Because of methotrexate polarity, transproters are needed to make the drug pass through the blood-brain barrier.When methotrexate enters the cell it is converted into methotrexate polyglutamate, 7-hydroxy methotrexate and 2,4-Diamino-N-10-methylpteroic Acid. Methotrexate polyglutamate is activated form of methotrexate, this form can contain up to 6 glutamate residues. With common use of methotrexate cells can develop a certain resistance to the drug, which means that it is necessary to increase dose or reduce the time intervals between drug administration. Methotrexate can be administered intrathecally, orally, intravenously or intramuscalarly. Methotrexate must be safely administered, because it can cause significant toxicity.



# KEY WORDS

Methotrexate, folic acid, malignant diseases, cancer

# SADRŽAJ

1. UVOD ..... 1
2. MALIGNA OBOLJENJA ..... 2
2.1. Učestalost pojave malignih oboljenja ..... 2
2.2. Liječenje malignih oboljenja ..... 3
3. METOTREKSAT ..... 4
3.1. Povijest metotreksata ..... 4
3.2. Folna kiselina ..... 5
4. CIKLUS SINTEZE DEOKSITIMIDIN MONOFOSFATA ..... 7
5. PRIMJENA METOTREKSATA U LIJEČENJU MALIGNIH OBOLJENJA ..... 8
5.1. Transport metotreksata ..... 8
5.2. Metabolizam metotreksata ..... 9
5.3. Mehanizmi otpornosti na metotreksat ..... 10
5.4. Toksičnost metotreksata ..... 11
6. ZAKLJUČAK ..... 13
7. LITERATURA ..... 14

# 1. UVOD

Metotreksat je lijek koji se koristi u liječenju malignih oboljenja, reumatoidnog artritisa i raznih kožnih bolesti. Kod malignih oboljenja potrebno je uzimati veće količine lijeka, dok kod kožnih oboljenja i reumatoidnog artritisa isključivo niske količine. Dozu lijeka potrebno je strogo kontrolirati zbog toksičnog djelovanja lijeka i velike mogućnosti smrti uslijed predoziranja. Maligna oboljenja karakterizira brzo dijeljenje stanica i njihov nekontroliran rast. Kako za dijeljenje malignih stanica treba puno materijala, osnovni pristup liječenju malignih oboljenja zasniva se na ograničavanju dostupnog materijala potrebnog za dijeljenje malignih stanica [1].

U ovom radu objasniti će se osnovna biokemija malignih oboljenja, pristup liječenju istih i mehanizam djelovanja metotreksata u liječenju malignih oboljenja.

# 2. MALIGNA OBOLJENJA

Maligna oboljenja karakteriziraju odstupanja od normalnog staničnog ciklusa, zahvaćene stanice imaju narušene mehanizme razmnožavanja, rasta i razgradnje. Maligne stanice imaju promijenjeni genotip u odnosu na normalne zdrave stanice i često se pojavljuju štetne kromosomske mutacije koje uključuju razne translokacije i amplifikacije pojedinog gena ili genske sekvencije. Maligne stanice se brzo razmnožavaju jer im je narušen mehanizam koji regulira dijeljenje stanica, zbog čega lako i u kratkom vremenu prodiru u druga tkiva i šire se po ostatku tijela. Uzroci ovakvih oboljenja mogu biti brojni, učestalost pojave ovisi o spolu, dobi, genetskim predispozicijama i izlaganju raznim kancerogenim spojevima. Najvažniji faktor odgovoran za većinu tumora je upravo izlaganje kancerogenima, kao što su kemikalije poput azbesta, benzena, azo boja. Dim cigarete je povezan s većinom tumora jer je većinski sastav dima kancerogen. Također, ionizirajuće zračenje uzrokuje oštećenja u stanicama koja mogu rezultirati pojavom tumora. Virusi poput hepatitisa b i c, virusa humane imunodeficijencije i humanog papiloma virusa uzrokuju razne vrste tumora, od kojih su najčešći Hodgkinov i Ne-Hodgkinov limfom i rak vrata maternice. Normalne stanice djelovanjem gena virusa mogu biti pretvorene u tumorske stanice, a geni koji potiču takvu promjenu nazivaju se onkogeni. Onkogeni često kodiraju faktore rasta ili receptore faktora rasta, ako se takvi geni mutiraju često dolazi do nastanka tumorskih stanica. Tumor supresorski geni, druga su vrsta gena koji igraju važnu ulogu u sprječavanju nastanka malignih oboljenja. Gen p53 je najpoznatiji tumor supresorski gen, kod kojeg je u 50% malignih oboljenja pronađena mutacija u sekvencij što upućuje na njegovu važnost u regulaciji nastanka tumorskih stanica [1].

## 2.1. Učestalost pojave malignih oboljenja

Maligna oboljenja jedan su od glavnih uzroka smrti u svijetu. U 2012. godini zabilježeno je 14.1 milijuna malignih oboljenja u svijetu, od kojih je 8.2 milijuna završilo smrtnim slučajem. Najčešći oblici malignih oboljenja su rak pluća, rak debelog crijeva, rak dojke i rak prostate. Trenutno milijardu ljudi puši duhanske proizvode, iako je poznato da pušenje značajno povećava rizik od raka pluća. Pušenje je jedan od faktora rizika koje je najlakše kontrolirati, ali unatoč tome jedna trećina smrti uzrokovanih duhanskim proizvodima je zbog malignih oboljenja koja su posljedica pušenja [2].

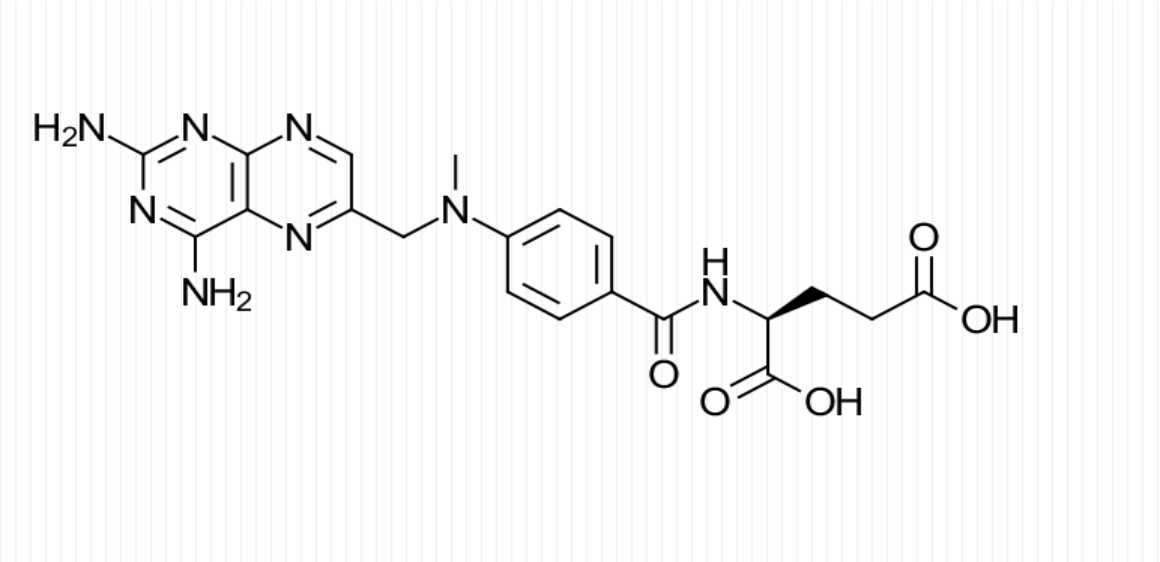
## 2.2. Liječenje malignih oboljenja

S današnjim metodama liječenja, trećina rano dijagnosticiranih tumora bude uspješno izliječena. U liječenju se primjenjuju razni pristupi, a odabir liječenja ovisi o stadiju i vrsti tumora. Kemoterapija se koristi na više načina, odnosno kao primarna indukcijska kemoterapija, neoadjuvantna kemoterapija i adjuvantna kemoterapija. Primarna indukcijska kemoterapija se koristi kod naprednijih stadija tumora, za koje ne postoje alternativne mogućnosti liječenja [1]. Neoadjuvantna kemoterapija se koristi kod tumora koji su lokalizirani na jednom dijelu tijela, osnovna svrha ove terapije je smanjenje tumora do operabilne veličine. Neoadjevantna kemoterapija se najčešće koristi kod tumora dojke, jednjaka, mokraćnog mjehura, ali i kod drugih zloćudnih bolesti. Adjuvantna kemoterapija temelji se na sistematskom liječenju pomoću citostatika ili regionalnim zračenjem nakon što se operacijom uklone maligne stanice. Svrha adjuvantne kemoterapije je uništavanje zaostalih malignih stanica i sprječavanje ponovnog vraćanja tumora. Kemoterapija se temelji na korištenju citostatika, lijekova koji uništavaju maligne stanice. Osnovna zapreka u izlječenju malignih oboljenja je neselektivnost citostatika, odnosno oni uz maligne stanice uništavaju i zdrave stanice. Naime, zbog neselektivnosti citostatika i njihovog toksičnog učinka potrebno je strogo kontrolirati njihovu primjenu. Citostatici se dijele prema mehanizmu djelovanja na alkilirajuća sredstva, antimetabolite i prirodne spojeve [3].

Antimetaboliti su strukturno nalik na prirodne kemijske spojeve koji sudjeluju u metabolizmu, a jedan od najpoznatijih lijekova ove skupine je metotreksat. Zbog sličnosti antimetabolita s prirodnim supstratima enzima, antimetaboliti se natječu s prirodnim supstratima i na taj način mijenjaju biokemijsku aktivnost [1]. Takve molekule mogu inhibirati enzime na reverzibilan ili ireverzibilan način. Ireverzibilne inhibitore karakterizira vezanje za enzim s čvrstom kovalentnom vezom. Reverzibilni inhibitori vrlo brzo disociraju s aktivnog mjesta ciljanog enzima. Nadalje, reverzibilne inhibitore dijelimo na kompetitivne, akompetitivne i nekompetitivne. Metotreksat spada u skupinu kompetitivnih inhibitora, inhibira dihidrofolat reduktazu jer ima tisuću puta veći afinitet za vezanje na aktivno mjesto enzima od prirodnog supstrata [4].

# 3. METOTREKSAT

Metotreksat (Slika 1) je analog folne kiseline, odnosno dihidrofolata. Koristi se kao lijek za maligna oboljenja, reumatoidni artritis i razne kožne bolesti. Spada u skupinu antimetabolita, ili točnije antifolata koji su antagonisti folne kiseline. Metotreksat djeluje kao kompetitivni inhibitor i veže se na aktivno mjesto dihidrofolat reduktaze što spriječava sintezu tetrahidrofolata. Tetrahidrofolat je osnovni prijenosnik jedinica od jednog ugljikovog atoma, spriječavanjem njegove sinteze za posljedicu ima nemogućnost sinteze deoksitimidin monofosfata, purinskih nukleotida, serina i metionina. Nadalje, ako je sinteza navedenih spojeva onemogućena, ne mogu se sintetizirati DNA i RNA [1].




Slika 1. Metotreksat (Izrađeno u ChemDoodle-u)

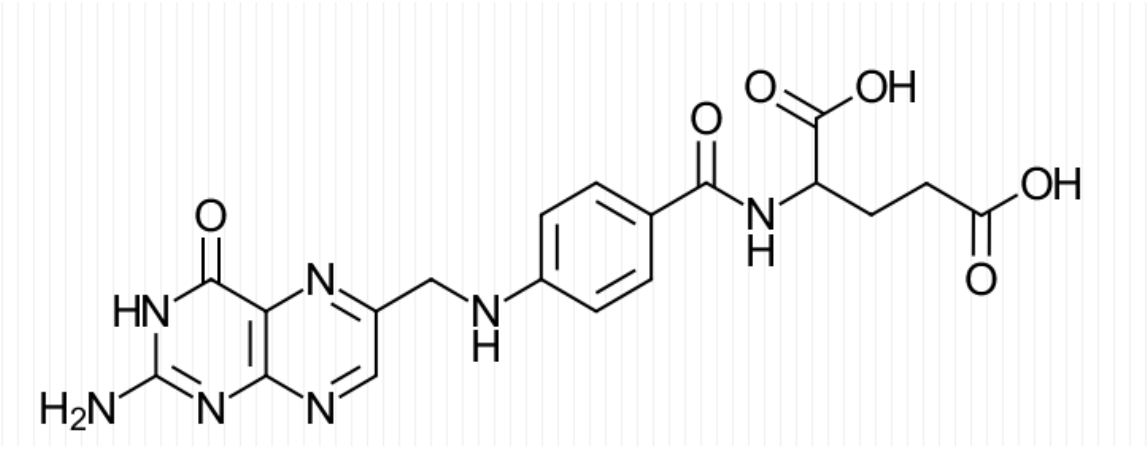
## 3.1. Povijest metotreksata

Primjena antifolata u liječenju malignih oboljenja počela je 1947. godine kada je Seeger sintetizirao aminopterin koji je pokazao dobre rezultate u liječenju dječje leukemije. Strukturno slični metotreksat pokazao je bolju učinkovitost u liječenju i manju toksičnost od aminopterina, te je nakon nekog vremena zamijenio upotrebu aminopterina. Unatoč tome što je metotreksat sintetiziran u prošlom stoljeću i dalje se često koristi kao lijek u liječenju malignih oboljenja [5]. Kemoterapija s usmjerenim djelovanjem na metabolizam folata je prva u povijesti pokazala dobre rezultate u liječenju leukemije i koriokarcinoma. Primjena antagonista folne kiseline je porasla nakon što se utvrdilo kako pokazuju dobre rezultate

kada se koriste u kombiniranoj kemoterapiji za liječenje dječje akutne limfoblastične leukemije. U toj terapiji, metotreksat je bio najvažniji lijek jer je pokazao dobre rezultate kad se injektirao u spinalni kanal ili subarahnoidni prostor i kad se injektirao u venu ili primjenio oralno. Također, kad se utvrdilo da se toksičnost metotreksata i općenito antagonista folne kiseline može smanjiti primjenom lijekova koji sadrže kalcijev folinat, omogućena je primjena metotreksata u većim dozama. Nedavno otkriveni pemetreksed, analog metotreksata pokazao je dobre rezultate u liječenju uznapredovalog karcinoma pluća [6].

## 3.2. Folna kiselina

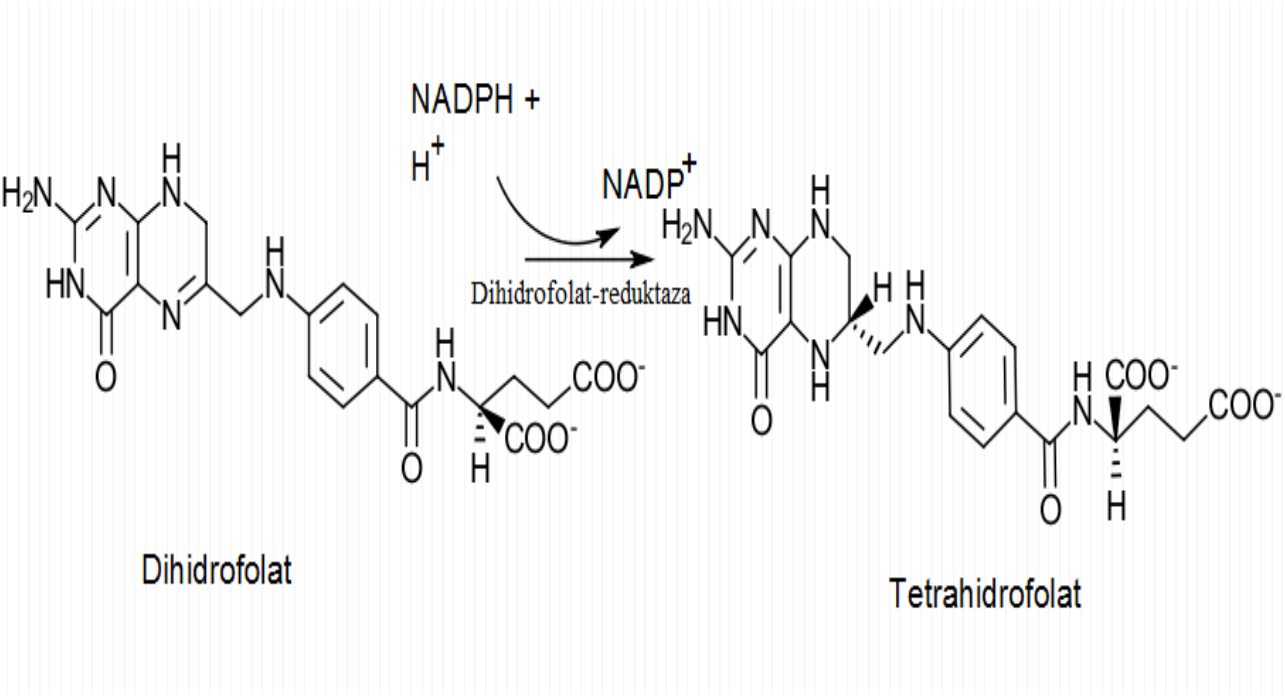
Folna kiselina (Slika 2.) ili vitamin B9, važna je za većinu biokemijskih reakcija u kojima se sintetiziraju purinski nukleotidi i aminokiseline. U reakciji kataliziranoj dihidrofolat-reduktazom folna kiselina se prevodi u dihidrofolat, a dihidrofolat se dalje može reducirati uz isti enzim do tetrahidrofolata. Tetrahidrofolat služi kao donor jednog ugljikovog atoma, a sudjeluje u reakciji nastanka deoksitimidin monofosfata. Reakcijom kataliziranom timidilat-sintazom prenosi se jedan ugljikov atom sa $N^5$,$N^{10}$-metilentetrahidrofolata na deoksiuridin monofosfat i nastaje deoksitimidin monofosfat [1].




Slika 2. Folna kiselina (Izrađeno u ChemDoodle-u)

Reakcija sinteze deoksitimidin monofosfata je potrebna jer uracil koji nastaje u putu biosinteze pirimidina nije komponenta DNA, već je potrebno metilirati uracil kako bi se dobio timin. U reakciji metiliranja metilna skupina sa $N^5$,$N^{10}$-metilentetrahidrofolata se prenosi na C-5 atom aromatskog prstena deoksiuridin monofosfata [3]. U stanicama koje se

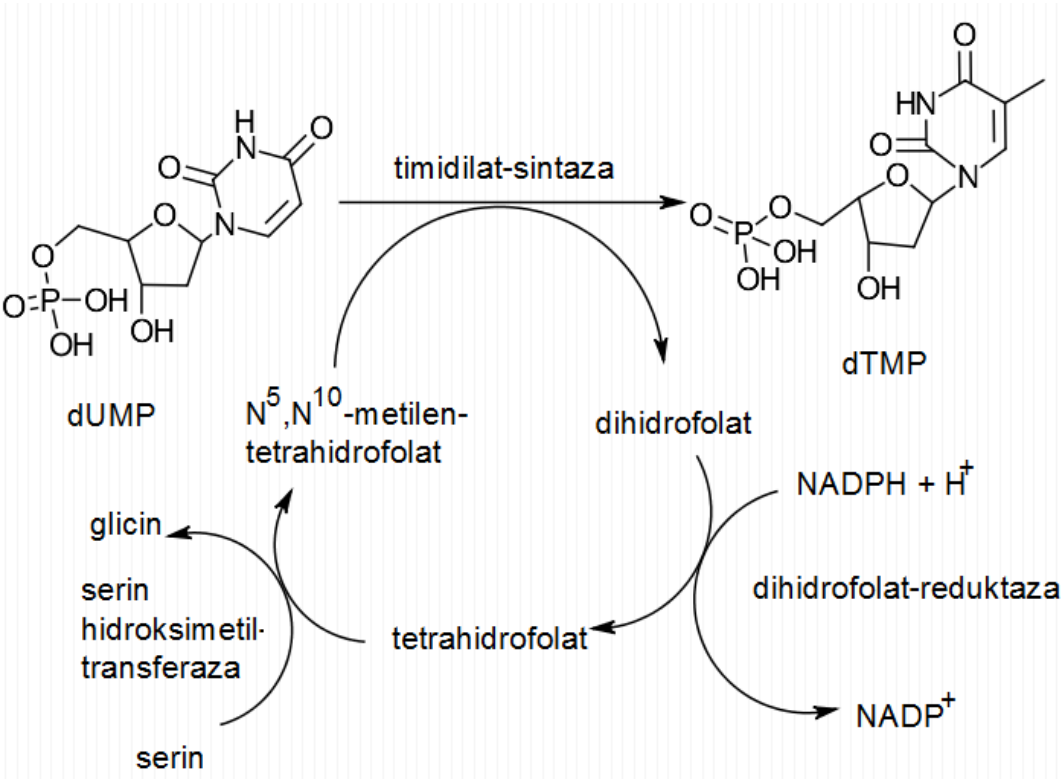
brzo razmnožavaju, kao što su maligne stanice troše se velike količine tetrahidrofolata, jer se za sintezu jednog mola deoksitimidin monofosfata koji je potreban za sintezu DNA potroši jedan mol tetrahidrofolata. Kako sinteza DNA troši puno tetrahidrofolata, pogotovo u dijeljenju malignih stanica, potrebna je konstantna regeneracija tetrahidrofolata. Tetrahidrofolat se regenerira pomoću dihidrofolata nastalog prilikom sinteze deoksitimidin monofosfata, a reakciju katalizira dihidrofolat-reduktaza koja koristi NADPH kao reducens (Slika 3.) [1].




Slika 3. Regeneracija tetrahidrofolata (Izrađeno u ChemDoodle-u)

# 4. CIKLUS SINTEZE DEOKSITIMIDIN MONOFOSFATA

Kombinirana aktivnost dihidrofolat-reduktaze i serin hidroksimetil-transferaze u sintezi deoksitimidin monofosfata naziva se ciklusom sinteze deoksitimidin monofosfata (Slika 4.). U navedenom ciklusu dihidrofolat se u reakciji kataliziranoj dihidrofolat-reduktazom prevodi u tetrahidrofolat, a tetrahidrofolat se uz katalizu serin hidroksimetil-transferaze prevodi u $N^5$,$N^{10}$-metilentetrahidrofolat. $N^5$,$N^{10}$-metilentetrahidrofolat zatim donira ugljikov atom deoksiuracil monofosfatu (dUMP) u reakciji kataliziranoj timidilat-sintazom pri čemu nastaje deoksitimidin monofosfat (dTMP) i dihidrofolat. Enzimi ovog ciklusa česta su meta lijekova protiv tumora, kao što su metotreksat koji inhibira dihidrofolat-reduktazu i 5-fluorouracil koji je analog pirimidina i inhibira timidilat-sintazu [1]. Najpogodnije mete su timidilat-sintaza i dihidrofolat reduktaza, ovi enzimi su ujedno i najčešće mete kemoterapije. 5-fluorouracil djeluje kao suicidni inhibitor i ireverzibilno inhibira timidilat-sintazu, na način da se *in vivo* prevede u fluor-deoksiuridilat koji djeluje kao supstrat i veže se u aktivno mjesto enzima. Inhibicija se temelji na tome što je se kod prirodnog supstrata na C-5 atomu nalazi atom vodika, dok se kod fluor-deoksiuridilata nalazi atom fluora, a kako se atom fluora ne može ukloniti kao proton reakcija se zaustavlja u fazi kovalentnog kompleksa [4].




Slika 4. Ciklus sinteze deoksitimidin monofosfata (Izrađeno u ChemDoodle-u)

# 5. PRIMJENA METOTREKSATA U LIJEČENJU MALIGNIH OBOLJENJA

Namjena metotreksata u liječenju malignih oboljenja je inhibicija dihidrofolat-reduktaze, što ima kao posljedicu nemogućnost sinteze DNA. Metotreksat se ubraja u skupinu lijekova specifičnih za stanični ciklus i djeluje u S fazi ciklusa [6]. Zbog navedene specifičnosti metotreksat je učinkovit u liječenju brzorastućih tumora. Najčešće se koristi u liječenju akutne limfoblastične leukemije, osteosarkoma, raka pluća i raka dojke. Prilikom uzimanja metotreksata potrebno je obratiti pozornost na dozu koja se uzima jer djeluje na sve stanice koje se brzo dijele bez obzira bile one zloćudne ili ne [4]. Primarno djelovanje metotreksata u liječenju malignih oboljenja je u 12. koraku biosinteze pirimidinskih nukleotida, odnosno u koraku sinteze deoksitimidin monofosfata, prema slici 4. sintezom dTMP-a nastaje dihidrofolat koji se mora prevesti u tetrahidrofolat. Metotreksat onemogućava sintezu jer inhibira dihidrofolat-reduktazu tako da se veže u aktivno mjesto enzima. Inhibicija metotreksata može se nadvladati dodatkom većih količina folne kiseline jer je metotreksat kompetitivni inhibitor [7].

## 5.1. Transport metotreksata

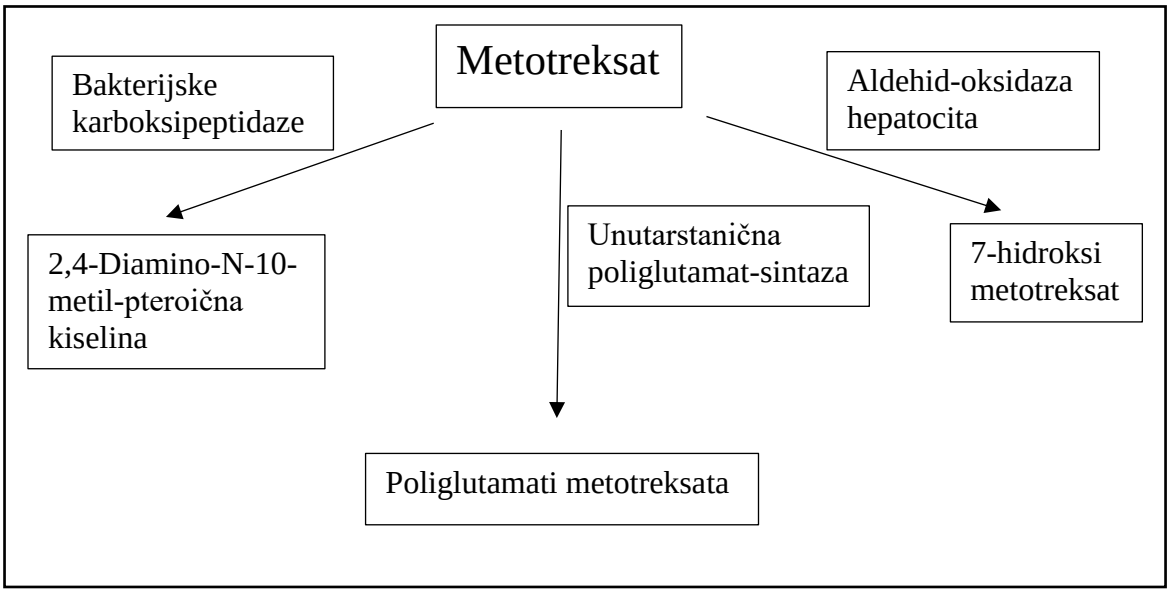
Djelovanje metotreksata uglavnom se može objasniti njegovim interakcijama s enzimima ciklusa folne kiseline. Kako su folna kiselina i njezini analozi polarni spojevi, oni teško prolaze krvno-moždanu barijeru i potrebni su im određeni transportni mehanizmi da bi ušli u stanicu. U sisavaca postoje tri vrste transportera, folatni prijenosnici koji uglavnom prenose folnu kiselinu, reducirani folatni prijenosnici koji uglavnom prenose metotreksat i prijenosnici aktivni pri niskim pH vrijednostima. Izvanstanični metotreksat koncentracije ispod 20 μM, u stanice ulazi prvenstveno preko reduciranog prijenosnika folata, dok se iz stanice uz ABC prenositelje prenosi kroz staničnu membranu [6,8]. Uz metotreksat reducirani folatni prijenosnici prenose i druge analoge metotreksata, ovaj mehanizam prijenosa je ovisan o energiji i potpomognut je ionskim gradijentom. Drugi mehanizam prijenosa metotreksata u stanicu odvija se preko folat-vezujućeg proteina. Folat-vezujući protein uz metotreksat prenosi i druge reducirane folate, i folnu kiselinu. Kad je koncentracija metotreksata u organizmu velika, dio metotreksata se također može prenositi

pasivnom difuzijom. Mutacije u genima koji kodiraju spomenute prenositelje povećavaju otpornost tumora na djelovanje metotreksata [9].

## 5.2. Metabolizam metotreksata

Unutar stanice metotreksat se u reakciji kataliziranoj unutarstaničnom poliglutamat-sintazom i uz utrošak energije u obliku ATP-a prevodi u metotreksat poliglutamate. Poliglutamati metotreksata sadrže od jednog do šest glutamatskih ostataka. Metotreksat uz inhibiciju dihidrofolat reduktaze inhibira i druge enzime ciklusa folne kiseline, kao što su metiltetradihidrofolat-dehidrogenaza, $N^5$,$N^{10}$-metiltetrahidrofolat-reduktaza i timidilat-sintaza [6,8]. Inhibicijom dihidrofolat-reduktaze metotreksat indirektno inhibira timidilat-sintazu, ali se pokazalo kako ta indirektna inhibicija nije dovoljna za značajnu inhibiciju sinteze deoksitimidin monofosfata. Naime, dokazano je da metotreksat direktno inhibira timidilat-sintazu, odnosno poliglutamati metotreksata s više glutaminskih ostatka pokazali su najbolje rezultate u inhibiciji timidilat-sintaze [9]. Za razliku od metotreksata, njegov aktiviran oblik metotreksat poliglutamat ima snažnije inhibitorsko djelovanje, uz to aktivirani oblik inhibira i glicinamid ribonukleotid transformilazu (eng.Phosphoribosylglycinamide transformylase-GAR transformylase) i aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilazu (eng.Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase-AICAR transformylase). Inhibicijom GAR transformilaze i AICAR transformilaze onemogućava se de novo sinteza purinskih nukleotida. Uz snažnije inhibitorsko djelovanje poliglutamati metotreksata se i duže zadržavaju u stanici od metotreksata jer su jače nabijeni zbog glutamatskih ostataka, stoga teže prolaze membranu i izlaze iz stanice [6,8]. Metabolizam metotreksata je gotovo isti kao i svim analozima folne kiseline. Uz navedene poliglutamate metotreksat, metotreksat se također može prevesti u 7-hidroksi metotreksat i u 2,4-diamino-N-10-metil-pteroičnu kiselinu (DAMPA) (Slika 5.) [9]. 7-hidroksi metotreksat je metabolit metotreksata nastao u hepatocitima u reakciji kataliziranoj aldehid-oksidazom [10]. Nastanak 7-hidroksi metotreksata je bitan jer se tako smanjuje toksično djelovanje metotreksata. Naime, nastali metabolit je manje toksičan i ima veći afinitet za prijenosnike, stoga brže izlazi iz stanice [9]. DAMPA je metabolit metotreksata nastao u intestinalnom traktu u reakciji kataliziranoj bakterijskim karboksipeptidazama. DAMPA je za razliku od

7-hidroksi metotreksata neaktivan metabolit metotreksata, a ujedno je i manje toksičan od metotreksata i 7-hidroksi metotreksata [11].




Slika 5. Metabolizam metotreksata

### 5.3. Mehanizmi otpornosti na metotreksat

Prilikom liječenja metotreksatom stanice mogu razviti određenu otpornost prema njegovom djelovanju. Mutacijama u genima koji kodiraju transportere metotreksata smanjuje se unos metotreksataa u stanice, sintezom drugih oblika dihidrofolat-reduktaze sa manjim afinitetom prema metotreksatu smanjuje se mogućnost inhibicije, povećanjem količine gena koji kodiraju dihidrofolat-reduktazu dolazi do sinteze većih količina enzima pa se inhibitorno djelovanje kompetitivnog metotreksata smanjuje, mutacijom poliglutamat-sintaze onemogućuje se sinteza poliglutamata metotreksata i povećanjem količine enzima koji hidroliziraju poliglutamate metotreksata dolazi do brzog uklanjanja metotreksata. Smanjeni transport metotreksata dokazan je korištenjem analoga metotreksata sa fluorescentnim lizinskim ostatkom. U bolesnika s akutom limfoblastičnom leukemijom koji su ranije koristili metotreksat zabilježen je u dvostruko manje efikasan transport nego u bolesnika koji ranije nisu uzimali metotreksat pri čemu, dobiveni rezultati odstupaju ovisno o bolesniku zbog heterogenosti tumora. Smanjenom sintezom poliglutamata metotreksata javlja se problem u zadržavanju metotreksata unutar stanice, jer monoglutamati izlaze puno

brže od poliglutamata. Takva mutacija u sintezi poliglutamata stvara problem u tumora poput sarkoma i akutne mijeloične leukemije koji zahtijevaju dulje zadržavanje metotreksata unutar stanice. Povećana količina dihidrofolat reduktaze, jedan je od čestih mehanizama otpornosti na metotreksat koji se može nadvladati uzastopnim povećanjem količine metotreksata [12].

## 5.4. Toksičnost metotreksata

Metotreksat se primjenjuje intratekalno u dozama od 12 mg, oralno u dozama od 20 mg/ $m^2$ i intravenozno ili intramuskularno u dozama do 33000 mg/$m^2$. Visoke doze metotreksata mogu imati vrlo toksično djelovanje, pri čemu se visokom dozom metotreksata smatra svaka doza veća od 500 mg/$m^2$. Visoke doze metotreksata se mogu koristiti u liječenju mnogo vrsta tumora, ali se najčešće primjenjuju u liječenju akutne limfoblastične leukemije i osteosarkoma. Jedna od čestih nuspojava prilikom uzimanja visokih doza metotreksata je oštećenje bubrega, javlja se u do 12% posto bolesnika liječenih metotreksatom. Najčešća bolest bubrega uzrokovana metotreksatom je akutna nekroza tubula, nastaje uslijed oštećenja stanica bubrežnih kanalića zbog kristalizacije metotreksata u kiselom pH okruženju i vodi u zatajenje bubrega. Kristalizirani metotreksat iz bubrega se izlučuje mokraćom, ali u tekućem obliku jer je pH mokraće bazičan pa ne uzrokuje kristalizaciju. Kako bi se spriječilo oštećenje bubrega i pH mokraće održao bazičnim potrebno je piti velike količine vode 12 sati prije početka terapije s metotreksatom i nastaviti kroz cijelu terapiju. Naime, više od 90% metotreksata se izlučuje pomoću bubrega, a velika količina tekućine potpomaže izlučivanje. Nadalje, preporučuje se uzimanje natrijeva bikarbonata ako pH urina nije dovoljno bazičan. Brojka zahvaćenih akutnim oštećenjem bubrega ovisi o više faktora, a glavni uzrok je uzimanje visokih doza lijeka u nedovoljno velikim vremenskim intervalima. Akutno oštećenje bubrega može biti uzrok drugim problemima, jer je narušeno oslobađanje metotreksata pa se isti nakuplja unutar stanica. Zbog navedenog nakupljanja metotreksata u tijelu može doći do drugih toksičnih učinaka, odnosno do nastanka mijelosupresije, oralnog mukozitisa ili u težim slučajevima do zatajenja organa. Također, nuspoajve metotreksata uključuju povraćanje, glavobolju, dijareju i razne bolesti središnjeg živčanog sustava. Kod uzimanja visokih doza metotreksata potrebno je strogo kontrolirati druge lijekove koji se uzimaju paralelno uz metotreksat, ne smiju se koristiti lijekovi koji nisu propisani u sklopu terapije jer mogu ometati ekstrakciju metotreksata i

uzrokovati neželjene nuspojave. Uz metotreksat često se koristi Leucovorin, lijek koji povećava razinu folne kiseline u organizmu i tako smanjuje toksičnost metotreksata prema zdravim stanicama. Leucovorin se ne smije uzimati u isto vrijeme kad i metotreksat jer bi poništio njegovo djelovanje, već je vrijeme primjene određeno tako da se ne poništi djelovanje metotreksata ali smanji toksični učinak. Vrijeme primjene Leucovorina ovisi o koncentraciji metotreksata u krvnom serumu, odnosno potrebno je pratiti koncentraciju metotreksata nakon primjene i kad ista dosegne kritičnu koncentraciju potrebno je primijeniti Leucovorin. Leucovorin se kombinira s hidratacijom i alkalizacijom sve dok se ne postigne koncentracija metotreksata u krvnom serumu manja od 0.1 μmol/L U ekstremnim slučajevima kada koncentracija metotreksata u krvnoj plazmi bude veća od 1 μmol/L koristi se enzim za cijepanje metotreksata. Lijek koji se koristi za cijepanje metotreksata sadrži karboksipeptidaze, one cijepaju metotreksat u netoksične metabolite i u roku 15 minuta smanjuju koncentraciju metotreksata u krvnoj plazmi za 97%. Također, za uklanjanje metotreksata može se primijeniti dijaliza [13].

# 6. ZAKLJUČAK

Metotreksat je lijek koji je dobar u liječenju brzorastućih tumora, stoga se često primjenuje u oboljelih od leukemije. Iako je metotreksat pokazao dobre rezultate u liječenju brzorastućih tumora njegova se primjena u zadnje vrijeme ograničava upravo zbog toksičnog djelovanja na sve stanice, a ne samo na maligne. Prilikom terapije metotreksatom posebnu pažnju treba obratiti na doziranje jer nepažnja može dovesti do smrti predoziranjem. Terapija metotreksatom kao jednim lijekom je vrlo rijetka i najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim lijekovima. U sklopu terapije, s ciljem smanjenja toksičnosti metotreksat 24 sata od primjene često se uzimaju lijekovi koji povećavaju razinu folne kiseline u organizmu. Dakle, primjena metotreksata u liječenju malignih oboljenja u nekim slučajevima može načiniti više štete nego koristi. Kako bi se spriječile neželjene nuspojave bitno je da liječenje metotreksatom provodi iskusni onkolog. Ishod liječenja ovisi o više faktora, koji su različiti za svakog oboljelog.

# 7. LITERATURA

[1] Bertram G. Katzung, Susan B. Masters, Anthony J. Trevor, Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill Medical, New York, 2012.

[2] http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality; pristupljeno dana 13.07.2017. godine

[3]https://www.researchgate.net/publication/23441679_A_History_of_Cancer_Chemotherapy; pristupljeno dana 20.09.2017. godine

[4] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[5] Jönsson, P. Aspects on optimisation of High Dose Methotrexate treatment in children with Acute Lymphoblastic Leukaemia Clinical and Experimental Pharmacology, Lund University, 2008.

[6] Laurence Brunton, Bruce A. Chabner, Bjorn Knollman, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Medical, New York, 2011.

[7] Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell, Harper's Illustrated Biochemistry, McGraw-Hill, New York, 2003.

[8] https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2039#tabview=tab0&subtab=; pristupljeno dana 06.08.2017. godine.

[9] Laurent Genestier, Romain Paillot, Laurence Quemeneur, Kamel Izeradjene, Jean-Pierre Revillard, Mechanisms of action of methotrexate. Immunopharmacology, 2000 (40): 247-257.

[10] https://www.caymanchem.com/product/21788; pristupljeno dana 12.08.2017. godine.

[11] Brigitte C. Widemann, Edward Sung, Lawrence Anderson, Wanda L. Salzer, Frank M. Balis, Karen S. Monitjo, Cynthia Mccully, Mary Hawkins, And Peter C. Adamson, Pharmacokinetics and Metabolism of the Methotrexate Metabolite 2,4-Diamino-N-10-methylpteroic Acid, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000, 294(3) 894-901.

[12] J.R. Bertino, E. Göker, R. Gorlick, W.W. LI, D. Banerjee, Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors, The Oncologist, New York, 1996, 223-226.

[13] Scott C. Howard, John McCormick, Ching-Hon Pui, Randall K. Buddington, R. Donald Harvey, Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate, The Oncologist, New York, 2016, 1-12.