

Metotreksat – frakcja wdychalna

Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego¹

Methotrexate – inhalable fraction

Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)

mgr inż. MAŁGORZATA KUPCZEWSKA-DOBECKA
e-mail: dobecka@imp.lodz.pl
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8
90-151 Łódź, ul. J. Muszyńskiego 1

Kwas (S)-2-(4-[(2,4-diaminopterydyn-6-ylo)metylo]metyloamino) benzamido) pentanodiowy

NDS: 0,001 mg/m³

NDSch: nie ustalono

NDSP: nie ustalono

DSB: nie ustalono

Skóra – wchłanianie substancji przez skórę może być podobnie istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową

Ft – substancja działająca szkodliwie na płód

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 25.06.2014 r.

Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 22.10.2014 r.

Słowa kluczowe: metotreksat, cytostatyki, narażenie zawodowe.

Keywords: methotrexate, antineoplastics drugs, occupational exposure.

¹ Wartość NDS metotreksatu została przyjęta dnia 22.10.2014 r. na 76. Posiedzeniu Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy i przedłożona ministrowi pracy i polityki socjalnej (wniosek nr 92) w celu jej wprowadzenia do rozporządzenia w załączniku nr 1 części A wykazu wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy.

Metoda oznaczania stężenia metotreksatu w środowisku pracy jest zaplanowana do opracowania w 2015 r.

Streszczenie

Metotreksat (MTX) jest strukturalnym analogiem kwasu foliowego. Związek jest w temperaturze pokojowej ciałem stałym występującym w formie jasnożółtopomarańczowego kryształicznego proszku o lekkim zapachu, charakterystycznym dla związków aromatycznych. Metotreksat jest stosowany jako lek cytostatyczny podawany w infuzjach lub doustnie, należący do antagonistów kwasu foliowego.

O zawodowym narażeniu na cytostatyki można mówić na dwóch etapach ich zastosowania, tj. podczas procesów wytwarzania chemioterapeutyków oraz podczas ich stosowania w codziennej praktyce leczniczej oddziałów szpitalnych, przede wszystkim tych, na których leczeni są pacjenci chorujący na choroby nowotworowe. W Polsce metotreksat nie jest produkowany i obecnie brak jest danych o liczbie osób narażonych na jego działanie w placówkach służby zdrowia, ponieważ nie zostały ustalone wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń tej substancji w środowisku pracy. W NIOSH w 2004 r. oszacowano, że liczba osób narażonych zawodowo w USA na cytostatyki i inne leki niebezpieczne przekracza 5 mln.

Główne skutki działania metotreksatu po podaniu: dożołądkowym, domięśniowym lub dożylnym, obejmują: zahamowanie czynności szpiku kostnego, działanie hepatotoksyczne oraz zaburzenia płodności. W warunkach narażenia inhalacyjnego metotreksat może podrażniać oczy i błony śluzowe nosa. Substancja została zaklasyfikowana jako drażniąca na skórę i oczy kategorii 2. Kontakt ze skórą uznano za najważniejszy czynnik ryzyka dla personelu medycznego narażonego na cytostatyki. Najczęściej zgłaszane objawy skórne dotyczyły kontaktu z rozlanym roztworem zawierającym metotreksat lub wysypanym z opakowania produktem, w czasie jego usuwania oraz kontaktu z ekskrementami pacjentów poddawanych chemioterapii.

U pracowników, zatrudnionych w zakładzie produkującym metotreksat, związek powodował uszkodzenia genetyczne kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) w testach: mikrojądrowym, kometowym i mutacji genowych *hprt*. Uszkodzenia chromosomów stwierdzono w szpiku kostnym pacjentów leczonych metotreksatem. Genotoksyczność wywoływaną przez metotreksat potwierdzono na podstawie wyników badań na zwierzętach.

Na podstawie dostępnych danych w Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC) stwierdzono, że brak jest dowodów na działanie rakotwórcze metotreksatu u ludzi i zwierząt

(grupa 3.). W grupie chorych leczonych metotreksatem nie uzyskano jednoznacznych dowodów potwierdzających zwiększone ryzyko nowotworów. Metotreksat nie wykazywał działania rakotwórczego w przewlekłych badaniach na zwierzętach po podaniu: dożołądkowym, do otrzewnowym oraz dożylnym.

Metotreksat wpływa na rozrodczość u ludzi zarówno w okresie leczenia, jak i przez krótki czas po jego zakończeniu. Obecnie rekomenduje się zharmonizowaną klasyfikację metotreksatu pod kątem szkodliwego działania na rozrodczość i ze względu na funkcje rozrodcze oraz płodność do kategorii 2., tj. substancji, co do których podejrzewa się, że działają szkodliwie na rozrodczość ludzi i ze względu na rozwój potomstwa do kategorii 1.A, tj. substancji działających szkodliwie na rozrodczość ludzi.

Podstawą ustalenia wartości NDS dla metotreksatu były następujące dane:

1. Metotreksat wykazuje bezprogowe działanie genotoksyczne, które może wystąpić na każdym poziomie narażenia. Na podstawie danych u ludzi ustalenie zależności dawka-odpowiedź nie jest możliwe, jak również nie jest to możliwe przez ekstrapolację wyników z badań na zwierzętach.
2. Producenci metotreksatu ustalili dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego na poziomie $0,0003 \div 0,0025 \text{ mg/m}^3$.
3. Na podstawie przedstawionych klasyfikacji (IPCS, NIOSH, ASHP, IACP) metotreksat powinien mieć wartość dopuszczalnego narażenia zawodowego na poziomie $< 0,01 \text{ mg/m}^3$. Wartość tę przyjęto za podstawę do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) i zastosowano arbitralnie współczynnik niepewności równy 10, uwzględniając skutki odległe, wynikające z działania metotreksatu, tj. działanie genotoksyczne i szkodliwe działanie na rozrodczość u ludzi, zarówno na płodność, jak i rozwój potomstwa.

Zaproponowano przyjęcie wartości NDS dla frakcji wdychalnej metotreksatu na poziomie $0,001 \text{ mg/m}^3$. Ustalenie wartości dopuszczalnej w środowisku pracy dla metotreksatu nałoży na pracodawców obowiązek monitorowania stężenia tego cytostatyku w środowisku pracy i pozwoli na ocenę rzeczywistego narażenia personelu medycznego na tę substancję. Nie ma podstaw merytorycznych do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego

(NDSCh) i wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB) metotreksatu. Należy zastosować także oznakowanie „skóra”, ponieważ wchłanianie substancji przez skórę może

być podobnie istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową, a także oznakowanie literami „Ft” – substancja działająca szkodliwie na płód.

Summary

Methotrexate (MTX) is a structural analogue of folic acid. This compound is solid at room temperature; it is a yellowish-orange, crystalline powder with a slight odor characteristic of aromatic compounds. Methotrexate is a cytostatic drug administered in infusion or orally; it is a folic acid antagonist.

Occupational exposure to cytotoxic drugs takes place at two stages of their application, i.e., during manufacturing processes and during their use in daily practice of medical wards, especially those which treat cancer patients. In Poland, methotrexate is not produced, and there are currently no data on the number of people exposed to its action in health care, because the value of the maximum concentration of the substance in the workplace has not been set. NIOSH in 2004 estimated that the number of persons occupationally exposed to cytotoxic drugs and other dangerous drugs in the USA exceeded 5 million.

The main effects of methotrexate after intragastric, intramuscular or intravenous administration include myelosuppression, hepatotoxicity and impaired fertility. In terms of exposure by inhalation, methotrexate can irritate the eyes and mucous membranes of the nose. This substance is classified as irritating to the skin and eyes, category 2. Contact with the skin was found to be the most important risk factor for medical personnel exposed to cytotoxic drugs. The most frequently reported skin symptoms were associated with removal of methotrexate powder or solutions and in contact with the excrement of patients undergoing chemotherapy.

Methotrexate induced genetic damage of deoxyribonucleic acid (DNA) in micronucleus, comet and hprt gene mutation tests among workers employed in a plant manufacturing methotrexate. Chromosomal damage was found in the bone marrow of patients treated with methotrexate. Animal studies confirmed methotrexate-induced genotoxicity.

On the basis of available data, the International Agency Research on Cancer (IARC) concluded that there was no evidence of a carcinogenic effect of methotrexate in humans and animals (group 3). In a group of patients treated with methotrexate, there was no conclusive evidence

of an increased risk of cancer. Methotrexate was not carcinogenic in chronic animal studies after intragastric, intraperitoneal or intravenous administration.

Methotrexate affects fertility in humans, both during treatment and for a short time afterwards. With respect to the sexual function and fertility, category 2 is the present recommended methotrexate harmonized classification for reproductive toxicity; however, with respect to the development of the offspring, it is category 1A.

The MAC-TWA value for methotrexate was set on the basis of the following:

1. Methotrexate is genotoxic without a threshold, which may occur at any level of exposure. Based on the data in humans, it is not possible to determine the dose-response; this is not possible by extrapolation of results from animal studies, either. It is not possible to propose the MAC value on the basis of the smallest oral therapy dose because in 10% to 37% of patients methotrexate results in adverse effects after low therapeutic doses. Myelosuppression and toxic effects on mucous membranes depend on the dose of methotrexate and the time of exposure; the critical dose is $> 2 \cdot 10^{-8}$ mol/L plasma.
2. Manufacturers of methotrexate established occupational exposure levels at 0.0003 – 0.0025 mg/m³. In 1988, OSHA arbitrarily established a target concentration level of 0.04 mg/m³ (40 µg/m³) for the purposes of air monitoring.
3. On the basis of the classification (IPCS, NIOSH, ASHP, IACP), methotrexate should have a permissible occupational exposure value of < 0.01 mg/m³. This value was taken as a basis for determining the maximum admissible concentration (MAC); the arbitrary uncertainty factor of 10 was used, taking into account long-term consequences, resulting from the action of methotrexate, i.e., genotoxicity and reproductive toxicity in humans: the effect on both the fertility and development of the offspring in humans.

It is proposed to determine the MAC values for the inhalable fraction of methotrexate at the level of 0.001 mg/m³. Determination of the limit value in the working environment for methotrexate imposes on employers an obligation to monitor the concentration of this chemotherapeutic agent in the working environment. It will also make it possible to assess actual exposure of medical per-

sonnel to this substance. The authors found basis for determining short-term (STEL) and permissible concentrations in biological material (DSB) of methotrexate. It is also proposed to use the "skin" label in the list of occupational exposure limit because absorption through the skin may be as important as inhalation. Using the letters " Ft " - toxic to the fetus - is also proposed.

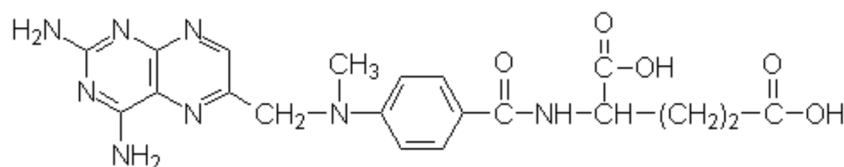
CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

Ogólna charakterystyka substancji

Ogólna charakterystyka metotreksatu (MTX), (ChemIDplus ... 2010; ESIS 2010):

– wzór sumaryczny C₂₀H₂₂N₈O₅

– wzór strukturalny



– nazwa chemiczna

(IUPAC): kwas (S)-2-(4-{{(2,4-diaminopterydyn-6-ylo)metylo}metyloamino}benzamido)pentanodiowy; kwas L-(+)-N-(p-{{[2,4-diaminopterydyn-6-ylo)metylo}metyloamino}benzoylo)glutaminowy

α-metopteryna; metyloaminopteryna

– nazwy handlowe: A-Methopterin; Antifolan; CL-14377; Ledertrexate; Methotrexate specia; MEX-ATE; MTX; NSC-740; R 9985

– nazwa CAS

L-Glutamic acid, N-(4-{{(2,4-diamino-6-pteridyl)methyl}metyloamino}benzoyl-

– preparaty lecznicze na rynku polskim zawierające

metotreksat: Ebetrexat; Metex; Methotrexat-Ebewe; Trexan; Trixilem; Methoblastin; Matrex; Ledertrexate; Nova-trex; Lantarel.

– numer CAS

59-05-2

– numer

indeksowy

brak

– numer WE

200-413-8

– synonimy:

kwas 4-amino-4-deoksy-N₁₀-metylofoliowy; aminopteryna; kwas 4-amino-N-metylopte-roiloglutaminowy;

Metotreksat jest pochodną aminopteryny oraz strukturalnym analogiem kwasu foliowego. Jest słabym kwasem organicznym dwukarboksylowym. W fizjologicznym pH występuje głównie w formie zjonizowanej.


Metotreksat nie został zaklasyfikowany urzędowo w Unii Europejskiej i nie ma ustalonej zharmonizowanej klasyfikacji (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylają-

cego dyrektywy 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie WE nr 1907/2006 ze zm. rozporządzeniem Komisji (WE) nr 790/2009).

Według bazy GESTIS-Stoffdatenbank metotreksat zaklasyfikowano do następujących klas zagrożenia (tab. 1.)

Tabela 1.

Klasa, kategoria zagrożenia, znaki ostrzegawcze metotreksatu

Klasa, kategoria zagrożenia	Znaki ostrzegawcze
Hasło ostrzegawcze: Niebezpieczeństwo Acute Tox. 3 H301 + H311 + H331 Skin Irrit. 2 H315 Eye Irrit. 2 H319 Muta 1B H340 Repr. 1A; H360FD STOT 3; H335	

Objaśnienia:

Acute Tox. 3 – toksyczność ostra kategorii 3.,

Skin Irrit. 2 – działanie drażniące na skórę kategorii 2.,

Eye Irrit. 2 – działanie drażniące na oczy kategorii 2.,

Muta 1B – działanie mutagenne na komórki rozrodcze kategorii 1.B,

Repr. 1A – działanie szkodliwe na rozrodczość kategorii 1.A (klasyfikacja substancji w kategorii 1.A jest w dużej mierze oparta na dowodach z badań ludzi)

STOT 3 – działanie toksyczne na narządy docelowe kategorii 3.,

H301 – działa toksycznie po połknięciu,

H311 – działa toksycznie w kontakcie ze skórą,

H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania,

H315 – działa drażniąco na skórę,

H319 – działa drażniąco na oczy,

H335 – może powodować podrażnienie dróg oddechowych,

H340 – może powodować wady genetyczne,

H360FD – może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.

Obecnie jest przygotowywany raport rekomendujący zharmonizowaną klasyfikację metotreksatu pod kątem jego szkodliwego działania na rozrodczość. W ramach tej klasyfikacji osobno dokonano oceny do odpowiedniej kategorii pod kątem wpływu na funkcje rozrodcze i płodność oraz na rozwój potomstwa. Komitet rekomenduje zaklasyfikowanie metotreksatu, ze względu na funkcje rozrodcze oraz płodność – do kategorii 2., tj. substancji, co do których podejrzewa się, że działają szkodliwie na rozrodczość ludzi i przypisanie zwrotu H361f, oznaczającego „podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność”. Natomiast ze względu na rozwój potomstwa rekomenduje się klasyfikację metotreksatu do kategorii 1.A,

tj. substancji działających szkodliwie na rozrodczość u ludzi i przypisanie zwrotu H360D, tj. „może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki” (Health ... 2011).

Właściwości fizykochemiczne substancji

Metotreksat jest ciałem stałym w temperaturze pokojowej, występującym w formie jasnożółtopomarańczowego krystalicznego proszku o lekkim zapachu, charakterystycznym dla związków aromatycznych.

Właściwości fizykochemiczne metotreksatu (Chamberlin i wsp. 1976; Wade 1977; Windholz 1976; Meditext 2014; Stefanowicz 2011):

<ul style="list-style-type: none"> – masa cząsteczkowa 454,4 – temperatura topnienia 185 ÷ 204 °C (monohydrat) – temperatura zapłonu nie wyznaczono, ale dostępne dane wskazują, że jest palny (NTP 1991) – log współczynnika podziału oktanol-woda (log Kow) -1,85 (wyznaczony eksperymentalnie) -1,28 (obliczony teoretycznie), (Health ... 2011) – prężność pary < 0,0000001 kPa at w temp. 25 °C (Pharmacopeia 2013); 2.1X10⁻¹⁹ mmHg w temp. 25 °C (US EPA 2003) – rozpuszczalność praktycznie nierozpuszczalny w wodzie (< 1 g/l w temp. 19 °C); rozpuszcza się w etanolu (około 750 g/l) i w DMSO (50 ÷ 100 g/l; w temp. 19 °C); łatwo rozpuszcza się w roztworach wodorotlenków, węglanów oraz w rozcieńczonym kwasie solnym; praktycznie nie rozpuszcza się w tłuszczach; jego rozpuszczalność w moczu jest wprost proporcjonalna do pH moczu – współczynniki przeliczeniowe 2,2 mg/l = 1 μmol/l 	<ul style="list-style-type: none"> – stabilność 	<p>rozkłada się pod wpływem czynników utleniających i światła; w kwaśnym środowisku wytrąca się, gdy jego stężenie przekroczy 2 mM; wraz ze wzrostem pH do 7 jego rozpuszczalność zwiększa się 10-krotnie.</p>
<p>Otrzymywanie, zastosowanie i narażenie zawodowe</p>		
<p>Metotreksat (MTX) ma właściwości antyproliferacyjne i jest stosowany jako lek cytostaticzny podawany w infuzjach lub doustnie, należący do antagonistów kwasu foliowego. Efektywne dawki leku zależą od wskazań i są zróżnicowane. Duże dawki metotreksatu 0,5 ÷ 12 g/m² są stosowane w leczeniu: ostrej białaczki limfatycznej, ostrej białaczki szpikowej, nabłoniaka kosmówkowego raka sutka, raka jajnika, raka płuca, nasieniaka, mięsaka kościopochodnego oraz nowotworów litych głowy i szyi. Lecznicza dawka skumulowana metotreksatu wynosi około 300 mg/kg mc. i jest podawana w dziennych dawkach jednorazowych 0,625 ÷ 2,5 mg/kg mc. (Health ... 2011). Duże dawki związku podaje się w terapii skojarzonej (> 100 mg/dzień, we wlewie dożylnym trwającym nie dłużej niż 24 h). Według jednego z producentów metotreksatu, tj. firmy Pfizer (2011) dawkowanie dożylnie związku zmienia się od 1,5 g/m² do 200 mg/m² w zależności od typu leczonego nowotworu. Substancja jest podawana wielokrotnie, według określonych procedur.</p> <p>Mniejsze dawki metotreksatu 10 ÷ 40 mg/m² działają przeciwzapalnie oraz immunosupresyjnie. Związek w dawkach wynoszących zwykle 10 ÷ 25 mg na tydzień (tzw. terapia „low-</p>		

dose”) stosuje się w leczeniu ciężkich postaci łuszczycy oraz takich aktywnych zapalnie postaci chorób reumatoidalnych, jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa. Lek może być podawany: doustnie, we wlewie dożylnym, domięśniowo i dokanałowo. W RZS zaleca się stosowanie doustnej dawki początkowej metotreksatu wynoszącej 7,5 mg raz w tygodniu lub 2,5 mg co 12 h w trzech dawkach raz w tygodniu. Producent leku podkreśla, że po dawkach większych niż 20 mg/tydzień nasilają się niepożądane objawy metotreksatu (Meditext 2014). Preparaty dostępne w sprzedaży aptecznej zawierają metotreksat w dawkach: 2,5; 5; 7,5; 10; 15 oraz 50 mg (tabletki doustne). Roztwór do wstrzykiwań w ampułkostrzykawce zawiera 25 lub 50 mg/ml metotreksatu.

Metotreksat bywa także stosowany jako lek wywołujący poronienie w pojedynczej dawce domięśniowo 1,4 mg/kg mc. lub 50 mg/m² (powierzchnia ciała kobiety wynosi 1,67 m² przy założeniu, że przeciętna kobieta waży 60 kg i ma 168 cm wzrostu), (Polovich, Giesecker 2011).

Antares Pharma, wiodący producent i sprzedawca farmaceutyków stosowanych pozajelitowo, poinformował, że FDA (*The Food and Drug Administration*) dopuściła do stosowania u chorych na RZS oraz na łuszczycę nową formułę metotreksatu (pod nazwą Otrexup) do podania drogą podskórnej iniekcji, z użyciem autostrzykawką, w dawkach 10 lub 25 mg raz w tygodniu.

Od kilku lat są podejmowane próby zastosowania inhalatorów ciśnieniowych z metotreksatem do miejscowego leczenia raka płuc. Ta forma leczenia daje szansę na osiągnięcie stężenia cytotoksycznego w obszarze zajęтым nowotworem, przy jednoczesnym zmniejszeniu działań niepożądanych. Udało się otrzymać frakcję respirabilną (35,3%) metotreksatu w ilości 29 µg/aplikację o średnicy aerodynamicznej cząstek 2,5 µm (GSD 2) z propelentami, np.: 1,1,1,2-tetrafluoroetanem (HFC

134a), 1,1,1,2, 3,3,3-heptafluoropropanem (HFC-227) lub HCFC-22 (difluorochlorometanem). Ocenia się, że dzienna dawka lecznicza metotreksatu w aerozolu mieści się w granicach 1 ÷ 500 µg (Shaik 2002; McGlashan i wsp. 2007; Berner-Strzelczyk 2012).

Narażenie zawodowe na leki przeciwnowotworowe, w tym metotreksat, występuje w: przemyśle farmaceutycznym, aptekach, szpitalach i uniwersytetach medycznych, weterynariach, domach opieki, pralniach oraz firmach przetwarzających odpady. Zawodowe narażenie na metotreksat personelu medycznego, tj.: lekarzy, pielęgniarek, farmaceutów, ekip sprzątających itd., może mieć miejsce drogą inhalacyjną i przez skórę, np.: podczas wdychania aerozolu leku, przenoszenia z pojemnika do pojemnika, otwierania ampulek, pobierania leku strzykawką, mieszania, wkraplania, dozowania, rozkruszania tabletek, ważenia, kapsułkowania, granulowania, kontaktu z materiałem biologicznym pacjenta, kontaktu z zanieczyszczoną powierzchnią oraz kontaktu z zanieczyszczonymi narzędziami (Polovich, Giesecker 2011). Istnieje także możliwość narażenia na metotreksat w domach pacjenta.

O zawodowym narażeniu na cytostatyki można mówić na dwóch etapach ich zastosowania, tj. podczas procesów wytwarzania chemioterapetyków oraz podczas ich stosowania w codziennej praktyce leczniczej oddziałów szpitalnych, przede wszystkim tych, na których są leczeni pacjenci chorujący na choroby nowotworowe.

Brak jest danych o liczbie osób narażonych na metotreksat w Polsce. Metotreksat nie jest w Polsce produkowany. Z kolei liczba leków stosowanych w oddziałach chemioterapii jest znaczna, a ocena narażenia zawodowego na cytostatyki jest trudna, gdyż metody analityczne stosowane w celu bezpośredniego wykrycia cytostatyku często nie są wystarczająco czułe (Walusiak-Skorupa 2009).

W NIOSH (2004) oszacowano, że liczba osób narażonych w placówkach ochrony zdrowia w USA na cytostatyki i inne leki niebezpieczne zdefiniowane w rozdziale „Istniejące wartości NDS” przekracza 5 mln.

W tabeli 2. przedstawiono dostępne ilościowe dane dotyczące narażenia zawodowego na metotreksat.

Tabela 2.
Narażenie zawodowe na metotreksat (MTX)

Miejsce pracy	Narażenie na metotreksat (MTX)	Piśmiennictwo
Holandia – zakład produkujący MTX, łącznie zatrudnionych przy produkcji 11 osób	MTX zidentyfikowano we wszystkich badanych próbkach powietrza w strefie oddychania pracowników napelniających wiarki z substancją o stężeniu $0,8 \div 182 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (mediana $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$); największe stężenia zmierzono w powietrzu w strefie oddychania pracowników odważających MTX: $118 \div 182 \mu\text{g}/\text{m}^3$; MTX zidentyfikowano w próbkach moczu pobranych od wszystkich pracowników (30 osób): $4,9 \div 21 \mu\text{g}$ równoważników MTX; skumulowane wydalanie MTX z moczem wynosiło $13,4 \mu\text{g}$ równoważników MTX w ciągu $72 \div 96 \text{ h}$	<i>Sessink</i> i wsp. 1994
Illinois – pokoje przygotowawcze, pokoje badań, pokoje pielęgniarskie oraz lekarskie w 10 szpitalach wchodzących w skład kliniki onkologicznej przyjmującej do 200 pacjentów/tydzień; zużycie leku w czasie przeprowadzania badań (pobierania próbek powietrza) wynosiło $480 \div 2240 \text{ mg}$ ($24 \div 94$ ampułki)	stężenie MTX w powietrzu było poniżej oznaczalności metody analitycznej we wszystkich badanych przypadkach (granica wykrywalności $1,5 \text{ ng}$); oznaczono cyklofosfamid o stężeniu $< 370 \text{ ng}/\text{m}^3$ i fluorouracil $< 82,26 \text{ ng}/\text{m}^3$	<i>De Werk</i> i wsp. 1983
Holandia – pralnia czyszcząca odzież, ręczniki oraz pościel pacjentów leczonych cytostatykami	na rękawicach lub skórze pracowników pralni, lub w powietrzu w żadnym spośród 4 dni pomiarowych nie oznaczono metotreksatu ani innych badanych cytostatyków (cyklofosfamid, ifosfamid, fluorouracil, etoposyd, cytarabina, gemcitabina, chlorambucil), (granica wykrywalności $0,25 \text{ ng}/\text{ml}$); nie oznaczono również MTX w próbkach pościeli przed praniem (granica wykrywalności $0,05 \text{ ng}/\text{cm}^2$)	<i>Fransman</i> i wsp. 2007
Pralnia czyszcząca odzież, ręczniki i pościel pacjentów leczonych cytostatykami	nie wykryto MTX w powietrzu środowiska pracy; oznaczono cyklofosfamid w powietrzu około $0,39 \div 12,7 \text{ ng}/\text{m}^3$	<i>Meijster</i> i wsp. 2006
Kanada – badania zewnętrznej powierzchni pojemników z lekiem w postaci tabletek (ok. 66 cm^2) oraz tac do odliczania tabletek (pow. 300 cm^2) w 20 aptekach	MTX zidentyfikowano w 60% pobranych prób; maksymalne stężenie MTX wynosiło $15 \text{ ng}/\text{cm}^2$ tacy do odliczania tabletek, mediana $0,08 \text{ ng}/\text{cm}^2$ (granica oznaczalności: $1,35 \text{ ng}/\text{ml}$; granica wykrywalności: $0,068 \text{ ng}/\text{cm}^2$ kontenera; $0,015 \text{ ng}/\text{cm}^2$ tacy do odliczania tabletek; $0,0075 \text{ ng}/\text{cm}^2$ taca do preparatyki)	<i>Merger</i> i wsp. 2013

cd. tab. 2.

Miejsce pracy	Narażenie na metotreksat (MTX)	Piśmiennictwo
Kanada – 6 aptek przyszpitalnych	14 z 23 wytypowanych powierzchni w pomieszczeniach (61%) było skażone MTX; średnie stężenie MTX wynosiło $0,0135 \text{ ng/cm}^2 \div 12,45 \text{ ng/cm}^2$ (największe stężenie na powierzchniach, gdzie lek był przygotowywany)	<i>Chu</i> i wsp. 2011
Wielka Brytania – 2 szpitalne oddziały onkologiczne	nie wykryto MTX w próbkach moczu u pracowników wykonujących infuzję 2,9 g MTX u dwóch różnych pacjentów; w próbkach z powierzchni narzędzi i lodówki, gdzie przechowywano MTX, jego stężenie wynosiło $11 \div 19 \text{ ng/m}^2$; zawartość MTX w zużytych rękawicach wynosiła $11,8 \div 49,3 \text{ ng/rękawicę}$	<i>Ziegler</i> i wsp. 2002
Pln. Włochy – badania 185 pielęgniarek i techników farmacji potencjalnie narażonych na cytostatyki w 3 szpitalach; największe zużycie roczne MTX wynosiło 500 g/oddział	cytostatyki zidentyfikowano w 36% pobranych pod koniec zmiany roboczej próbkach moczu; maksymalne stężenie MTX w moczu pracowników oddziału hematologii wynosiło $1,1 \text{ } \mu\text{g/l}$ moczu, a na oddziale onkologii $2,01 \text{ } \mu\text{g/l}$; próbki z powierzchni narzędzi wykazały zawartość MTX średnio $50,8 \text{ mg/m}^2$ (na 39 prób) oraz 28 mg/m^2 (na 63 próby); maksymalna zawartość MTX $2514,8 \text{ mg/m}^2$	<i>Sabatini</i> i wsp. 2012
Austria – oceniano pracowników przygotowujących infuzje, personel pomocniczy oraz personel bezpośrednio opiekujący się pacjentem i personel apteki 28 szpitali	najwyższe skumulowane stężenie MTX (dobowa ilość) wynoszące $1416 \text{ } \mu\text{g}$ stwierdzono w 112 próbkach moczu u pracowników podłączających oraz przygotowujących wlewy pacjentom; MTX zidentyfikowano w pocie pacjentów poddawanych chemioterapii; wyznaczono czas półtrwania MTX 11,1 h, a średnie stężenie max wynosiło $1,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ($n = 5$); maksymalne stężenie MTX w wymiocinach wynosiło $441,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ i malało do $0,24 \text{ } \mu\text{g/ml}$ po 19,5 h od infuzji	<i>Mader</i> i wsp. 1996
Holandia – technicy farmaceutyczni	nie stwierdzono MTX w powietrzu środowiska pracy podczas przygotowywania leku w maks. ilości 5 g; nie zidentyfikowano MTX w moczu badanych pracowników	<i>Sessink</i> i wsp. 1992
przygotowywanie leku w szpitalu; do badań wytypowano osoby zatrudnione przez 2 ÷ 6 lat we włoskich szpitalach	nie stwierdzono MTX w moczu powyżej granicy oznaczalności metody, tj. 20 ng/l	<i>Turci</i> i wsp. 2002
Mediolan – 8 oddziałów onkologicznych 2 dużych szpitali (przygotowywanie leku)	stężenie MTX na powierzchniach do preparatyki wynosiło $1 \div 645 \text{ } \mu\text{g/m}^2$; na powierzchniach w odległości 1 m od wyciągu $1 \div 69 \text{ } \mu\text{g/m}^2$; na powierzchniach $> 1 \text{ m}$ od wyciągu $1 \div 200 \text{ } \mu\text{g/m}^2$	<i>Rubino</i> i wsp. 1999
Mediolan – oddział szpitalny (przygotowywanie leku)	mikrogramowe ilości MTX oznaczono na powierzchniach podłogi, mebli, sprzętów (34 próbki); maksymalne stężenie MTX wynosiło $645 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ na polietylenowym pokryciu wyciągu wentylacyjnego (co stanowiło 5% masy MTX używanej dziennie, tj. $70 \div 260 \text{ mg/dzień}$); w odległości 1 m od wyciągu maksymalne stężenie MTX wynosiło $53 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ (LOQ wynosiło $50 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ co odpowiadało $1 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ powierzchni)	<i>Florida</i> i wsp. 1999
Holandia – oddział szpitalny (przygotowywanie leku)	dzienne zużycie MTX wynosiło $64 \div 140 \text{ mg}$ (w ciągu 4 dni badawczych 354 mg); oznaczono MTX o stężeniu $0,3 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ (przy granicy wykrywalności metody $60 \text{ } \mu\text{g/l}$ próbki; objętość pobranego powietrza wynosiła $23 \div 92 \text{ m}^3$); oznaczono MTX na rękawicach ochronnych w ilości maks. $156 \text{ } \mu\text{g/lewą rękawicę}$ i $40 \text{ } \mu\text{g/prawą rękawicę}$	<i>Sessink</i> i wsp. 1992
Holandia – oddział szpitalny	w trzech próbkach pobranych po wytarciu dwóch pokoi pacjentów stężenie MTX wynosiło $5,5 \div 5,9 \text{ ng/cm}^2$	<i>Kromhout</i> i wsp. 2000

cd. tab. 2.

Miejsce pracy	Narażenie na metotreksat (MTX)	Piśmiennictwo
Łódź – oddział szpitalny	u 12% pracowników oddziałów stosujących leki przeciwnowotworowe stwierdzono obecność MTX w moczu	<i>Walusiak, Wągrowska-Koski 2008</i>

Działanie toksyczne na ludzi. Obserwacje kliniczne

Metotreksat (MTX) działa głównie na tkanki z krótkim cyklem komórkowym, zwłaszcza: szpik kostny, nabłonek układu pokarmowego, tkanki naskórka, komórki rozrodcze oraz tkanki płodu (*Muller i wsp. 1969; 1980; Trier 1961*). Poniżej przedstawiono działania niepożądane, jakie wg *Shehata i Meyer (1980)* mogą wystąpić bardzo często podczas stosowania metotreksatu jako leku ($> 1/10$) i często ($> 1/100$ do $< 1/10$), (Pfizer 2011; EBEWE 2007):

- obniżona odporność na zakażenia: zapalenie gardła i gorączka
- zmiany we krwi i układzie chłonnym: leukopenia i zahamowanie czynności szpiku kostnego
- zaburzenia układu nerwowego: zawroty głowy, ból głowy (po większych dawkach metotreksatu obserwowano występowanie afazji, niedowładów) oraz senność
- nieostre widzenie
- zapalenie naczyń, może wystąpić krwawienie w różnych okolicach ciała
- przewlekłe śródmiąższowe zapalenie płuc (często związane ze zwiększeniem liczby granulocytów we krwi) mogące prowadzić do zgonu
- zaburzenia żołądka i jelit: ból brzucha, wrzodziejące zapalenie jamy ustnej, nudności, zapalenie śluzówki (najczęściej jamy ustnej, ale także zapalenie dziąseł, a nawet zapalenie jelit, owrzodzenie jelit i krwawienie); nudności, wymioty, zapalenie jamy ustnej, biegunka
- zaburzenia wątroby i dróg żółciowych:

toksyczne działanie na wątrobę powodujące: znaczne zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych, ostry zanik wątroby, stłuszczenie, nadwrażliwość na światło, zmiany pigmentacji, krwotok skórny, wybroczyny, trądzik

- bóle stawów
- niewydolność nerek, krwimocz, neuropatia, mocznica, zapalenie pęcherza moczowego
- dolegliwości ogólne: dreszcze, niewyjaśnione uczucie zmęczenia, złe samopoczucie.

Obserwacje kliniczne. Działanie ostre i przedłużone

Przedawkowanie po podaniu doustnym metotreksatu (MTX) wystąpiło głównie u pacjentów, którzy nieumyślnie przyjęli tygodniową dawkę w ciągu jednego dnia (w całości lub podzieloną na kilka dawek pojedynczych). Objawy przedawkowania po podaniu doustnym leku dotyczyły głównie układu krwiotwórczego i przewodu pokarmowego. Były to przede wszystkim: leukocytopenia, trombocytopenia, niedokrwistość, pancytopenia, neutropenia, zahamowanie czynności szpiku kostnego, zapalenie błony śluzowej, zapalenie jamy ustnej, owrzodzenie jamy ustnej, nudności, wymioty, owrzodzenie oraz krwawienie w obrębie przewodu pokarmowego. U niektórych pacjentów po przedawkowaniu nie wystąpiły objawy toksyczności. Po przedawkowaniu metotreksatu stwierdzono także: posocznicę, wstrząs septyczny, zahamowanie czynności nerek, niedokrwistość plastyczną oraz przypadki zgonu. Uważa się, że stężenie metotreksatu we krwi $< 10^{-7}$ mol/l jest bezpieczne, tzn.

nie wymagające stosowania odtrutki w postaci folinianu wapnia (Pfizer 2011); Medical... 1975).

Według Pfizer (2011) zahamowanie czynności szpiku kostnego i działanie toksyczne na błony śluzowe zależy od dawki metotreksatu i czasu narażenia. Krytyczna dawka działająca metotreksatu wynosi $> 2 \cdot 10^{-8}$ mol MTX/l osocza (0,02 mikromola/l, czyli 0,044 mg/l), a krytyczny czas narażenia – 42 h. Według Meditext (2014) stężenie metotreksatu w osoczu, które działa toksycznie na: płuca, wątrobę i szpik kostny, wynosi $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l (2,2 mg/l). Działanie neurotoksyczne metotreksatu (leukoencefalopatia i zwapnienia spowodowane mikroangiopatią) stwierdzano u osób, którym podano dożylnie dawkę 1 g/m^2 metotreksatu.

Uważa się, że stężenie metotreksatu w osoczu $> 5 \text{ } \mu\text{mol/l}$ po 24 h (11 mg/l) od podania pojedynczej dawki skutkuje działaniem cytotoksycznym dla komórek o krótkim cyklu (Wong i wsp. 2009).

U 49-letniego pacjenta leczonego dożylnie metotreksatem obserwowano: wysypkę na skórze, spływanie oddechu, hipotensję i utratę przytomności po kilku minutach od podania (Luch-Bernal i wsp. 1997).

Wykazano, że 1-procentowy metotreksat stosowany na duże powierzchnie skóry w leczeniu łuszczycy nie powodował istotnych skutków układowych związanych ze stosowaniem, natomiast 70% pacjentów uskarżało się na miejscowe działanie drażniące związku (Sutton i wsp. 2001). Po podaniu dawki 25 mg/ml metotreksatu na skórę przedramienia 6 ochotnikom (68 cm^2) na 30 min nie obserwowano: żadnych zmian morfologicznych we krwi, poziomu homocysteiny, elektrolitów oraz zaburzeń funkcji nerek w ciągu 24 h od podania. U trzech badanych wystąpiło niewielkiego stopnia podrażnienie skóry w miejscu aplikacji (Wong i wsp. 2009; Bleyer 1977).

W nielicznych badaniach (Cohn i wsp. 1993; Luch-Bernal i wsp. 1997; Vega i wsp. 1994)

uzyskano dodatni pozytywny wynik w testach płatkowych z metotreksatem u ludzi.

Działanie przewlekłe

Przeprowadzono badania 140 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (w wieku $16 \div 70$ lat) otrzymujących dawkę 10 mg/tydz. metotreksatu (MTX) przynajmniej przez 3 miesiące. Stężenie metotreksatu w surowicy oznaczano na poziomie $0,01 \div 1,87 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ($0,022 \div 4,1 \text{ mg/l}$) po 2 h od podania. U 27% badanych wystąpiły niekorzystne skutki działania metotreksatu. Niedokrwistość wystąpiła u 5,7% badanych, działanie toksyczne na wątrobę, wyrażone istotnym wzrostem aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT), stwierdzono u 8,6% (w tym ponad dwukrotny wzrost w porównaniu z wartością referencyjną – 5,7%), uszkodzenie nerek u 2,1%, leukopenię u 1,4%, trombocytopenię u 2,1%, pancytopenię u 1,4%, niekorzystne skutki ze strony układu pokarmowego u 3,6% oraz niekorzystne działanie na błony śluzowe u 2,1%. Stężenie metotreksatu w surowicy $0,71 \text{ } \mu\text{mol/l}$ (1,6 mg/l) przyjęto za stężenie graniczne wystąpienia niekorzystnych skutków działania metotreksatu na krew i wątrobę (Gilani i wsp. 2012)

Salliot dokonał przeglądu 2574 raportów dotyczących zastosowania małych dawek metotreksatu u chorych leczonych przewlekłe. Podsumowano, że małe dawki metotreksatu powodowały wystąpienie niekorzystnych skutków działania u $10 \div 37\%$ leczonych (Salliot i wsp. 2009). Przeanalizowano 3463 przypadki. Średnia dawka metotreksatu wynosiła 8,8 mg/tydz. ($4,6 \div 18 \text{ mg/tydz.}$), średni czas terapii wynosił 36,5 miesiąca ($27 \div 132$ miesięcy), liczba wszystkich obserwowanych skutków niepożądanych wynosiła 2524 (72,9%), w tym ze strony układu pokarmowego 1065 (30,8%), wątroby 640 (18,5%), skóry/włosów 309 (8,9%), ośrodkowego układu nerwowego (OUN) 191 (5,5%) oraz płuc 84 (2,45%).

Kremer przeprowadził obserwację pacjentów leczonych dawkami $12,4 \div 14,6$ mg/tydz. metotreksatem przez 104 miesiące; $79 \div 85\%$ badanych uskarżało się na niekorzystne skutki działania leku po 2 latach terapii (*Kremer* i wsp. 1986; 1992; 1997). U pacjentów najbardziej były odczuwane skutki ze strony układu pokarmowego ($52 \div 65\%$). Podwyższone aktywności enzymów wątrobowych obserwowano u $69 \div 88\%$ po 4 latach leczenia. Takie objawy neurologiczne, jak: bóle głowy, mroczenia przed oczami, zmęczenie, zawroty głowy, wystąpiły u $21 \div 38\%$, a leukopenia u $20 \div 25\%$. Takie działanie toksyczne na wątrobę, jak: stłuszczenie, martwica, włóknienie okołowrotne i marskość raportowano u pacjentów z łuszczycą, którym przewlekłe podawano metotreksat (*Epstein, Croft Jr* 1969; *Muller* i wsp. 1969; *Roenigk* i wsp. 1971; *Chabner* i wsp. 1975; *Kroese* 1975; *Hersh* i wsp. 1964; *van Swelm* 2013; *Barker* i wsp. 2011).

Firma Pfizer (2011) wykonała biopsje wątroby, przed terapią i w czasie terapii, u 217 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów leczonych przewlekłe dawką skumulowaną metotreksatu, co najmniej 1500 mg oraz biopsje wątroby u 714 pacjentów podczas terapii. Stwierdzono 64 (7%) przypadki zwłóknienia wątroby oraz 1 (0,1%) przypadek marskości.

Do badania zakwalifikowano 60 chorych (53 kobiety, 7 mężczyzn) w wieku $20 \div 78$ lat. Chorzy zostali podzieleni na dwie grupy – 30 osób otrzymywało metotreksat doustnie (*p.o.*), a 30 osób podskórną (*s.c.*). Przez pierwsze 16 tygodni chorzy byli leczeni dawką 15 mg metotreksatu raz w tygodniu. Jeśli nie uzyskano poprawy i jednocześnie nie było istotnych działań niepożądanych leku, dawkę metotreksatu zwiększano do 20 mg. Przed badaniem oraz po: 4, 8, 16 i 24 tygodniach leczenia, oce-

niano: aktywność choroby, parametry zapalenia we krwi (OB, białko C-reaktywne) oraz występowanie działań niepożądanych. W ciągu 24-tygodniowej obserwacji terapię z powodu działań niepożądanych przerwano u 2 chorych leczonych metotreksatem doustnie i 3 leczonych podskórną. Działania niepożądane wystąpiły ogółem u 71% leczonych metotreksatem doustnie i 66% leczonych metotreksatem podskórną. Najczęstsze działania niepożądane dotyczyły: przewodu pokarmowego, wzrostu aktywności aminotransferaz i wystąpienia zakażeń. Po podaniu metotreksatu podskórną stwierdzono rzadsze występowanie: nudności, dolegliwości dyspeptycznych oraz niespecyficznego bólu brzucha, niż po leku podawanym doustnie (odpowiednio 24 i 47%), (*Świerkot* i wsp. 2008).

Doustnie, w trzech cyklach, podawano 380 pacjentom całkowitą dawkę 150 mg metotreksatu. U chorych obserwowano: zapalenie jamy ustnej u 30,6% badanych, leukopenię u 29,1% i łysienie u 13,4%. U badanych obserwowano ostre zahamowanie czynności szpiku kostnego, które powodowało: leukopenię, niedokrwistość oraz trombocytopenię (*Kroese* 1975).

U pacjentów z łuszczycą, którym podawano metotreksat doustnie lub podskórną, opisano przypadki działania toksycznego związku na płuca (*Mc Kenna, Burrows* 2000; *Collins* i wsp. 2007), które się objawiało: kaszlem, gorączką i dusznością. W badaniu radiologicznym płuc (tab. 3.) stwierdzono nieregularne nacieki, które przypominały obraz zapalenia płuc *Pneumocystis carinii* lub inne śródmiąższowe oraz wewnątrzpęcherzykowe zmiany zapalne (*Clarysse* i wsp. 1969; *Gutin* i wsp. 1976; *Hlaing* 2008; *Saigal* i wsp. 2012). Opisywano także zwłóknienia płuc towarzyszące leczeniu metotreksatem (*Lewis, Walter* 1979).

Tabela. 3.

Dawki metotreksatu wywołujące zmiany w płucach u pacjentów leczonych z powodu łuszczycy (Clarysse i wsp. 1969; Gutin i wsp. 1976; Hlaing 2010; Saigal i wsp. 2012)

Dawka skumulowana	Czas trwania kuracji
4,29 mg/kg doustnie	2,7 lat w odstępach podzielonych
232 mg/doustnie	4 mies.
215 mg/doustnie	16 mies.
100 mg/doustnie	–
9800 mg/doustnie	11 lat
9130 mg/doustnie	6 lat
20000 mg/doustnie	18 lat
24700 mg/doustnie	17 lat
190 mg/doustnie	4 mies.
20 mg/podskórnie (dawka jednorazowa)	6 tyg.

Niektóre źródła podają, że u około 25% otrzymujących metotreksat występowało podrażnienie oczu z powodu zmniejszenia wytwarzania łez (Summary... 2012).

Narażenie zawodowe

Istnieją doniesienia, że narażenie zawodowe na cytostatyki, w tym metotreksat (MTX), drogą inhalacyjną i przez skórę, u pielęgniarek i techników farmaceutycznych powodowało takie ostre objawy narażenia, jak: wypadanie włosów, bóle brzucha, owrzodzenia błony śluzo-

wej nosa, zapalenie kontaktowe skóry, reakcje alergiczne oraz uszkodzenia oczu i skóry (Polovich, Giesecker 2011).

W większości dostępnych prac nie monitorowano stężeń cytostatyków w powietrzu środowiska pracy lub nie oznaczono ilościowo cytostatyków dostępnymi metodami analitycznymi, dlatego badania te nie mogą być wykorzystane do oceny ryzyka zawodowego. Dostępne dane dotyczą narażenia na metotreksat łącznie z innymi lekami cytostaticznymi, dlatego przedstawiono je w rozdziale: Działanie łącznie.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

Toksyczność ostra i przedłużona

Mediany dawek śmiertelnych metotreksatu (MTX) dla zwierząt doświadczalnych zamieszczono w tabeli 4. Metotreksat spełnia kryteria klasyfikacji ustalone w Unii Europejskiej dla toksyczności ostrej po podaniu drogą pokarmową (działa toksycznie po połknięciu).

Podanie metotreksatu u zwierząt powodowało: zahamowanie czynności szpiku kostnego, zwiększenie podatności na infekcję oraz zaburzenia jelit i wątroby (Freeman-Narrood i wsp. 1974; Ferguson i wsp. 1950; Delmonte, Jukes 1962; Custer i wsp. 1977; Scherf, Schmahl 1975).

Ocena szpiku kostnego szczura, któremu podano dootrzewnowo dawkę 50 mg/kg mc. metotreksatu, wykazała zmniejszenie liczby komórek, szczególnie krwinek czerwonych po 15 h od podania. We krwi obwodowej szczura obserwowano retikulocytopenię i panleukopenię. Skutki te nasilały się w ciągu 72 h od podania. W przypadku wielokrotnego podawania substancji stwierdzano: niedokrwistość i limfopenię, zanik śledziony, grasicy i węzłów chłonnych (Ferguson i wsp. 1950; Custer i wsp. 1977). U psów po podaniu dawki 1 mg/kg metotreksatu oraz u szczurów po podaniu dawek 0,1 ÷ 0,4 mg/kg związku obserwowano: zaburzenia

żołądkowo-jelitowe, owrzodzenie jelit oraz krwawienia (*Ferguson i wsp.* 1950).

Szczurom podawano dożołądkowo dawki: 300; 200; 150 lub 100 mg/kg/dzień metotreksatu. Dawka 300 mg/kg/dzień metotreksatu wykazywała działanie ogólnoustrojowe, więc zwierzęta zabijano w krótkim czasie po narażeniu. Mniejsze dawki metotreksatu były tolerowane przez szczury przez dłuższy czas. U wszystkich zwierząt (5/5) otrzymujących dawkę 200 mg/kg/dzień metotreksatu oraz u

4/4 otrzymujących dawkę 100 mg/kg/dzień przez 6 tygodni wystąpiło działanie hepatotoksyczne, polegające na ogniskowej martwicy hepatocytów. Ponadto u 3 szczurów wykazano początki zwłóknienia wątroby (*Custer i wsp.* 1977).

Metotreksat u szczurów po dożołądkowym podaniu powodował: uszkodzenie błony śluzowej, zmniejszenie wchłaniania ¹⁴C-L-leucyny i ¹⁴C-L-fenyloalaniny (*Robinson i wsp.* 1966; *Jolly, Fletcher* 1977).

Tabela 4.

Wartości median dawek śmiertelnych metotreksatu (MTX) u zwierząt doświadczalnych

Droga podania	Gatunek zwierząt	Wartość LD ₅₀	Piśmiennictwo
Dożołądkowa	szczur	180 +/- 45 mg/kg mc.	IARC
	szczur	317 mg/kg	IARC
	szczur	135 mg/kg mc.	Pfizer 2011; GESTIS
	mysz	146 mg/kg mc.	Pfizer 2011
	brak specyfikacji	0,188 mg/m ²	Pfizer 2011
Podskórna	szczur	58 mg/kg	Pfizer 2011
Dootrzewnowa	szczur	6 ÷ 25 mg/kg mc.	IARC
	szczur	80 ÷ 464 mg/kg mc.	<i>Ferguson i wsp.</i> 1950
	mysz	94 +/- 9 mg/kg mc.; większość narażanych zwierząt padała między 3. a 7. dniem od zakończenia narażenia	Pfizer 2011
	mysz	45 ÷ 90 mg/kg	Pfizer 2011
Dożylna	szczur	14 mg/kg mc.	Pfizer 2011
	mysz	65 ÷ 70 mg/kg	Pfizer 2011
Do oka	szczur	6 mg/kg mc.	Pfizer 2011

W badaniu na szczurach Wistar wyznaczono maksymalną dawkę tolerowaną metotreksatu i jego metabolitu 7-OH MTX zdefiniowaną jako dawkę, po podaniu której 90% zwierząt przeżywa w ciągu 8 h. Dawki 1,8 ÷ 11,3 g/kg metotreksatu oraz dawki 0,1 ÷ 1,2 g/kg 7-OH MTX podawano zwierzętom dożylnie w sposób ciągły. Szczury, które otrzymywały dawki 7,3 oraz 11,3 g/kg mc. metotreksatu, padły w ciągu pierwszych 3 h, natomiast w przypadku dawek 0,9 lub 1,2 g/kg mc. 7-OH MTX – w ciągu 6 h. Procent zwierząt narażanych na metotreksat, które przeżyły 8 h, wynosił: 100% po dawkach 1,8 lub 3,0 g/kg; 40% po dawce 5,0 mg/kg mc.; 16% po dawce 7,3 g/kg mc. oraz 0% po dawce

11,3 g/kg mc. Procent zwierząt narażanych na 7-OH MTX, które przeżyły 8 h, wynosił: 80% po dawkach: 0,1; 0,2 lub 0,6 g/kg mc; 20% po dawce 0,8 g/kg mc. oraz 0% po dawce 0,9 g/kg mc. lub 1,2 g/kg mc. Średnie stężenie 7-OH MTX w osoczu w chwili padnięcia zwierząt wynosiło 1,58 +/- 1,52 mM, natomiast stężenie MTX 21,9 +/- 21,4 mM (*Fuskevåg i wsp.* 2000).

Metotreksat w jednorazowej dawce dziennej: 3; 10 lub 15 mg/kg podawano dożołądkowo myszom przez 28 dni. Zwierzęta były zabijane w: 21., 28. i 35. dniu od podania związku. Nie stwierdzono działania toksycznego metotreksatu po najmniejszej dawce. U zwierząt otrzymujących dawki powyżej

10 mg/kg mc. metotreksatu obserwowano zmniejszenie masy ciała. Stwierdzono, zależne od wielkości dawki, działanie toksyczne metotreksatu na krew, manifestujące się istotnym zmniejszeniem liczby: leukocytów, erytrocytów, hemoglobiny oraz hematokrytu. Dawkę 3 mg/kg mc. metotreksatu wyznaczono jako dawkę niedziałającą mielosupresyjnie. Stwierdzono istotny wzrost hydroksyproliny w płucach zwierząt: $143,2 \pm 4,8\%$, $129,2 \pm 5,1\%$, $188,4 \pm 10,3\%$ odpowiednio w dniach: 21., 28. i 35. Poziom ekspresji cytokeratyny zmniejszył się istotnie po dawce metotreksatu 3 mg/kg mc. w 35. dniu. Z drugiej strony wzrósł poziom immunoreaktywnej α -SMA proteiny (aktywności mięśni gładkich alfa), która jest powszechnie stosowanym markerem tworzenia miofibroblastów. Autorzy wnioskują, że metotreksat może powodować zmniejszenie zdolności nabłonka pęcherzyków płucnych do odnowy i proliferację miofibroblastów, co skutkuje zwłóknieniami w płucach (Ohbayashi i wsp. 2010).

Badania przedkliniczne metotreksatu pro-

wadzono w celu zastosowania związku do wziewnego leczenia zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa. Badania przeprowadzono na szczurach w celu oceny zależności dawka-skutek w przypadku miejscowej aplikacji substancji na błonę śluzową nosa. Czterem grupom dorosłych szczurów Albino ($n = 5$) podawano jeden wdech metotreksatu do obu otworów nosowych w dawce $2,5 \mu\text{g}$ dwa razy dziennie (Ercan i wsp. 2006). Grupa I otrzymywała metotreksat raz w tygodniu, grupa II – 3 razy w tygodniu, a grupa III – 5 razy w tygodniu. Grupa IV była grupą kontrolną i otrzymywała 1 wdech aerozolu soli fizjologicznej dwa razy dziennie, 5 razy w tygodniu. Po 28 dniach u zwierząt wykonano: biopsje wątroby oraz błony śluzowej nosa i badanie krwi. Parametry oceniano półilościowo: 0 – brak zmian; 1 – zmiana łagodna; 2 – zmiana umiarkowana; 3 – zmiana ostra.

W tabeli 5. przedstawiono wyniki badania histopatologicznego przedniej i tylnej krawędzi małżowiny nosowej dolnej oraz nosogardzieli u szczurów.

Tabela 5.

Wyniki badania histopatologicznego przedniej i tylnej krawędzi małżowiny nosowej dolnej oraz nosogardzieli u szczurów narażanych inhalacyjnie na metotreksat (MTX)

Wynik badania histopatologicznego	Grupa kontrolna ($n = 25$)		Grupa I ($n = 25$)		Grupa II ($n = 25$)		Grupa III ($n = 25$)	
	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe
Zwłóknienie	0	0	0,04	0,2	0	0	0	0
Zmniejszenie liczby komórek kubkowych	0	0	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2
Utrata rzęsek	0	0	0,12	0,44	0	0	0,08	0,4
Obrzęk	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2
Metaplasja płaskonabłonkowa	0	0	0,04	0,2	0,04	0,2	0	0
Cieńsza błona podstawno-komórkowa	0	0	0	0	0	0	0	0

Na podstawie analizy statystycznej wykazano brak znamienych różnic ($p > 0,05$) w parametrach histopatologicznych między grupami I, II i III a grupą kontrolną. W przypadku badań histopatologicznych wątroby również nie stwierdzono istotnych różnic.

W tabeli 6. przedstawiono wyniki badania aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST) jako wskaźników profilu wątroby oraz stężenia hemoglobiny we krwi.

Tabela 6.

Wyniki badania aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AST) i stężenia hemoglobiny we krwi u szczurów narażonych inhalacyjnie na metotreksat (MTX)

Grupa	AST (U/l)		ALT (U/l)		Hb (g/dl)	
	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe
Grupa kontrolna (n = 5)	30,2	10,85	46	11,14	13,22	0,88
Grupa I (n = 5)	35,6	10,74	49,4	9,68	12,78	1,41
Grupa II (n = 5)	30,4	8,56	47,6	12,1	13,14	0,73
Grupa III (n = 5)	34,6	9,45	56,4	14,83	12,84	1,34

Nie przeprowadzono analizy statystycznej otrzymanych wyników, jakkolwiek stwierdzono, że średnie wielkości mierzonych wskaźników w grupie kontrolnej i w grupach badanych nie różniły się znacznie (Ercan i wsp. 2006).

Toksyczność podprzewlekła i przewlekła

Białym myszom (40, wiek 4 ÷ 6 tyg., masa 23 ÷ 25 g) podawano metotreksat (MTX) domięśniowo, raz w tygodniu, przez 6 miesięcy. Zwierzęta podzielono na 4 grupy po 10 myszy (po 5 zwierząt obu płci). Pierwsza grupa otrzymywała najmniejszą dawkę terapeutyczną, tj. 0,15 mg/kg mc. metotreksatu, druga grupa dawkę 0,3 mg/kg mc., trzecia dawkę 0,45 mg/kg mc., a czwarta grupa była grupą kontrolną i otrzymywała 0,2 ml buforowanego roztworu soli fizjologicznej. Metotreksat we wszystkich grupach powodował, w zależności od dawki, zmiany w kanalikach krętych nerek i kłębuszkach nerkowych (Chelab, Majeed 2009).

Myszom CDF1 (6 samców) implantowano podskórnie kapsułkę infuzyjną, która uwalniała lek w dawce 0,2 µg/h. Kapsułkę wymieniało co dwa tygodnie przez 60 dni. Stężenie metotreksatu w osoczu ustaliło się na poziomie $1 \cdot 10^{-8} \div 5 \cdot 10^{-9}$ M po około 2 tygodniach. U badanych zwierząt nie obserwowano skutków działania toksycznego metotreksatu, z wyjątkiem nieznacznego wypadania sierści. Nie stwierdzono istotnych różnic w masie ciała. Ocena histologiczna tkanek barwionych hematoxyliną i eozyną nie wykazała nieprawidłowości w badanych narządach. Skóra i tkanki podskórne w miejscu implantacji nie były zmienione. Nie stwierdzono istotnych różnic ($p > 0,05$) między zawartością DNA w homogenatach i zawartością białek w ekstrakcie Tris (Zaharko i wsp. 1976).

Działanie mutagenne i genotoksyczne

U 21 pracowników zatrudnionych w zakładzie produkującym metotreksat (MTX) związek

powodował uszkodzenia genetyczne wyznaczone w testach: mikrojądrowym (MN), kometowym, mutacji genowych *hprt* oraz *TCR*. Wykazano, że średnia liczba mikrojąder u pracowników wynosiła $10,1 \pm 0,95\%$ i była istotnie większa niż w grupie kontrolnej ($5,48 \pm 0,82\%$; $p < 0,01$). Średnia długość ogona komety (MTL) istotnie różniła się u pracowników narażonych na metotreksat i w grupie kontrolnej i wynosiła odpowiednio: $1,3 \pm 0,06 \mu\text{m}$ i $0,07 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ($p < 0,01$). Średnia częstość mutacji *Mf-hprt* i *Mfs-TCR* była istotnie większa u pracowników narażonych na metotreksat (odpowiednio $1,0 \pm 0,02\%$ vs. $0,86 \pm 0,01\%$; $p < 0,01$ oraz $6,87 \pm 0,52 \cdot 10^{-4}$ vs. $1,67 \pm 0,14 \cdot 10^{-4}$; $p < 0,01$). W środowisku pracy nie monitorowano stężenia metotreksatu w powietrzu ani w materiale biologicznym. Udowodniono wpływ długości okresu zatrudnienia na wyniki testu mikrojądrowego (*Deng* i wsp. 2005).

Zwiększoną częstość występowania markerów uszkodzeń genetycznych (nie określono jakich) stwierdzono u pracowników narażonych na nieznaną poziomą stężenie metotreksatu w zakładzie produkcyjnym w Chinach (OSHA 2006).

Dawka $1 \div 10 \mu\text{g/ml}$ metotreksatu działała klastogennie na komórki limfocytów ludzkich (*Voorhees* i wsp. 1969). W innym badaniu nie stwierdzono takiego działania po dawkach metotreksatu wynoszących 0,1 lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (*Hampel* i wsp. 1966). Wynik ujemny uzyskano również na komórkach limfocytów krwi obwodowej po dawce skumulowanej metotreksatu wynoszącej $25 \div 9000 \text{ mg/pacjenta}$ (*Voorhees* i wsp. 1969; *Melnyk* i wsp. 1971; *Krogh Jensen, Nyfors* 1979).

Uszkodzenia chromosomów stwierdzono w szpiku kostnym pacjentów leczonych metotreksatem domięśniowo po dawce 25 mg, dostnie po dawkach $25 \div 50 \text{ mg}$ (*Krogh Jensen* 1967; *Krogh Jensen, Nyfors* 1979) oraz po dawkach skumulowanych $2105 \div 2165 \text{ mg}$ (*Melnyk* i wsp. 1971).

Pacjentom z zapaleniem stawów (5 mężczyzn i 15 kobiet) podawano domięśniowo dawkę 10 mg metotreksatu tygodniowo przez 1 miesiąc, a następnie przez kolejne 4 tygodnie taką samą dawkę i dodatkowo 10 mg kwasu foliowego domięśniowo 4 h po podaniu metotreksatu. U ludzi otrzymujących wyłącznie metotreksat stwierdzono istotne uszkodzenia genetyczne: wzrost aberracji chromosomowych w komórkach szpiku i wzrost częstości występowania mikrojąder (*Shahin* i wsp. 2001).

Taki sam rezultat uzyskano u szczurów Wistar albino (40 sztuk obu płci) po podaniu dootrzewnowym metotreksatu raz dziennie przez 8 dni. Zwierzęta podzielono na 3 grupy: I – otrzymującą wodę utlenioną; II – 0,5 mg/kg mc. kwasu foliowego; III – 0,5 mg/kg mc. metotreksatu; IV – 0,5 mg/kg mc. kwasu foliowego oraz 0,5 mg/kg mc. metotreksatu. U zwierząt w grupie III metotreksat powodował wzrost aberracji chromosomowych w komórkach szpiku oraz wzrost częstości występowania mikrojąder (*Shahin* i wsp. 2001).

Genotoksyczność wywołwaną przez metotreksat potwierdzono na podstawie wyników wielu badań prowadzonych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach (*EBEWE* 2007). Metotreksat o stężeniu 1 mg/l wykazywał działanie mutagenne w komórkach chłoniaka myszy L5178Y (*Matheson* i wsp. 1978) oraz w teście dominujących mutacji letalnych u myszy (*Epstein* i wsp. 1972; *Propping* i wsp. 1972). Związek ten wywoływał aberracje chromosomowe w kulturach komórek chomika oraz myszy (*Benedict* i wsp. 1977; *Kasahara* i wsp. 1992; *Keshava* i wsp. 1998) i powodował wzrost częstości wymiany chromatyd siostrzanych *in vitro* w komórkach rozrodczych chomika i myszy (*Banerjee, Benedict* 1979). W badaniu w warunkach *in vivo* uzyskano wynik dodatni w teście mikrojądrowym na komórkach szpiku kostnego myszy i szczura po dawkach metotreksatu wynoszących: 50; 100 lub 250 mg/kg (*Maier, Schmid* 1976; *Kasahara* i

wsp. 1992; *Criswell* i wsp. 2003). Metotreksat o stężeniach 10 lub 100 µg/ml indukował także transformacje morfologiczne w 8 sklonowanych komórkach C3H10T1/2 (*Benedict* i wsp. 1977).

Nie obserwowano natomiast działania mutagennego metotreksatu w teście Ames na bakteriami *Salmonella Typhimurium* szcze-

pów: TA1535, TA1536, TA1537, TA-1538, TA92, TA98, TA100 i G46 (zarówno z aktywnością metaboliczną, jak i bez aktywacji metabolicznej), (*Herbold, Buselmaier* 1976; *Seino* i wsp. 1978) oraz w teście pośredniego gospodarza u *Serratia marcescens* i *Escherichia coli* (*Propping* i wsp. 1972).

DZIAŁANIE RAKOTWÓRCZE

Działanie rakotwórcze na ludzi

Według informacji producenta, w grupie chorych leczonych metotreksatem (MTX) nie uzyskano jednoznacznych dowodów potwierdzających zwiększone ryzyko nowotworów (EBEWE 2007). Przeprowadzane obserwacje wskazują na występowanie większego ryzyka rozwoju nowotworów wtórnych, jednak na sformułowanie ostatecznych wniosków nie ma wystarczających dowodów (EBEWE 2007). W piśmiennictwie opisano 7 przypadków ostrych białaczek nielimfocytarnych (*Kaslow* i wsp. 1972; *Davis* i wsp. 1973; *Penn, Starzl* 1973; *Greenspan, Tung* 1974; *Vogl* 1978), 1 przypadek gwiazdzaka (*Regelson* i wsp. 1965), 1 przypadek raka tarczycy, 1 przypadek raka piersi oraz włókniakomięsaka (*Li* i wsp. 1975); 1 przypadek choroby Hodgkin'sa, 2 przypadki raka szyjki macicy in situ (*Penn, Starzl* 1973); 1 przypadek wątrobiaka (*Ruymann* i wsp. 1977) i 1 przypadek raka trzustki (*Tavassoli, Lynch* 1974). W większości przypadków pacjentom podczas leczenia podano również inne leki cytotoksyczne czy immunosupresyjne, a w niektórych przypadkach stosowano także promieniowanie.

Opisano pojedyncze przypadki nowotworów złośliwych u pacjentów leczonych metotreksatem w przebiegu łuszczyca (*Bailin* i wsp. 1975): 4 przypadki raka podstawnokomórkowego skóry; 3 przypadki raka płaskonabłonkowego skóry (*Harris* 1971; *Bailin* i wsp. 1975); 1 przypadek włókniakomięsaka guzowatego

skóry (*Bailin* i wsp. 1975), 1 przypadek raka szyjki macicy in situ (*Ringrose* 1974); 1 przypadek chłoniaka nieziarnicznego (*Schröter* i wsp. 1971); 1 przypadek ostrej białaczki szpikowej (*Rees* i wsp. 1967); 1 przypadek raka piersi, 2 przypadki nowotworów nerek (*Molin, Larsen* 1972) i 1 przypadek raka jamy nosowo-gardłowej (*Craig, Rosenberg* 1971). W badaniu epidemiologicznym 205 pacjentów z łuszczyką leczonych metotreksatem bez innych leków cytotoksycznych, przez co najmniej 7 lat (*Bailin* i wsp. 1975), obserwowano 3 zgony z powodu raka w porównaniu z 3,39 oczekiwanymi i 1 zgon z powodu białaczki, w porównaniu z 0,13 oczekiwanymi oraz 8 przypadków nowotworów złośliwych, z wyjątkiem nowotworów skóry, w porównaniu z 6,80 oczekiwanymi.

Działanie rakotwórcze na zwierzęta

Metotreksat (MTX) nie wykazywał działania rakotwórczego w długoterminowych badaniach na: szczurach, myszach i chomikach, zarówno po podaniu dożołądkowym, jak i dootrzewnowym oraz dożylnym (*Rustia, Shubik* 1973; *Roschlau, Justus* 1971; *Weisburger* 1977; *Schmal, Osswald* 1970).

Na podstawie dostępnych danych w IARC stwierdzono, że brak jest dowodów na działanie rakotwórcze metotreksatu na ludzi i zwierzęta (grupa 3.).

Działanie na rozrodczość, działanie embriotoksyczne i teratogenne

Działanie na ludzi

Metotreksat (MTX) wpływa na rozrodczość zarówno w okresie leczenia, jak i przez krótki okres później. Związek powoduje u ludzi: zaburzenia płodności, oligospermię, zaburzenia miesiączkowania oraz brak miesiączki. Ponadto, metotreksat: wywiera szkodliwe działanie na zarodki, prowadzi do poronień i występowania wad u płodów (EWEBE 2007; Buckley i wsp. 1997; Lloyd i wsp. 1999; Nguyen i wsp. 2002).

Obecnie rekomenduje się zharmonizowaną klasyfikację metotreksatu pod kątem jego szkodliwego działania na rozrodczość (Health... 2011):

- ze względu na funkcje rozrodcze i płodność do kategorii 2., tj. substancji, co do których podejrzewa się, że działają szkodliwie na rozrodczość u ludzi; oznaczenie zwrotem H361f – podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność
- ze względu na rozwój potomstwa do kategorii 1.A, tj. substancji działających szkodliwie na rozrodczość ludzi; oznaczenie zwrotem H360D – może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.

Działanie teratogenne

Istnieje około 24 doniesień opisujących przypadki występowania wad urodzeniowych u dzieci, których matki były leczone metotreksatem (MTX) w pierwszym trymestrze ciąży.

Martínez Lopez na podstawie przeglądu 6 badań ocenił wpływ metotreksatu na przebieg ciąży u chorych leczonych z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów (Martínez Lopez i wsp. 2009). W badaniach wzięło udział 91 kobiet: 17 z nich dokonało aborcji z wyboru (19%), u 17 nastąpiło poronienie (19% wszystkich ciąż; 23% ciąż, w których aborcja nie została wywołana), 54 kobiety urodziły żywe

dziecko (59 i 73%, odpowiednio). U 4 noworodków (4 i 5%, odpowiednio) wystąpiły wady rozwojowe (jeden przypadek szpotawości śródstopia oraz jeden przypadek naczyniaka powieki; pozostałe trzy nieznanne). Liczba poronień przed 20. tygodniem wynosiła około $12 \div 15\%$ w stosunku do populacji ogólnej, natomiast liczba wad wrodzonych – $3 \div 5\%$.

Feldkamp i Carey (1993) stwierdzili, na podstawie przeglądu 6 starszych raportów, że doustna dawka metotreksatu powodująca wady u potomstwa wynosi co najmniej 10 mg tygodniowo, a okres między 6. a 8. tygodniem od poczęcia jest okresem krytycznym dla powstawania wad wrodzonych. Analiza 22 raportów przez Hyoun i wsp. (2012) potwierdziła, że dawka 10 mg w tygodniu metotreksatu wywołuje embriopatie u ludzi.

Milunsky opisał przypadek kobiety, która przyjmowała doustnie 2,5 mg metotreksatu dziennie przez 5 dni, a około 9. tygodnia ciąży urodziła dziecko: bez kości czołowej, z kraniosynostozą szwów czaszkowych, defektami kończyn, hiperteloryzmem i płaską nasadą nosa (Milunsky i wsp. 1968). Podobny przypadek dotyczył kobiety, która przyjmowała 5 mg metotreksatu dziennie w celu leczenia łuszczycy przez pierwsze dwa miesiące ciąży (Powel, Ekert 1971).

Odnotowano cztery przypadki wad wrodzonych u noworodków kobiet leczonych metotreksatem w trakcie ciąży (Del Campo i wsp. 1999; Corona-Rivera 2010; Krahenmann 2002; Nguyen i wsp. 2002) i jeden przypadek samoistnego poronienia; wady rozwojowe obserwowano w autopsji (Ibsen 1997). Wady obejmowały: twarzoczaszkę, szkielet, układ krążenia, układ pokarmowy i nieprawidłowości narządów płciowych.

U kobiet leczonych metotreksatem w większych dawkach w okresie ciąży z powodu nowotworów trofoblastu odnotowano dwa przypadki wad wrodzonych: czaszki, twarzy i stóp, przerost łątkaczki i opóźnienie wzrostu u noworodków (Diniz i wsp. 1978; Granzow i wsp. 2003).

U kobiet, którym bez powodzenia podawano metotreksat w czasie ciąży w celu wywołania poronienia, odnotowano trzy przypadki noworodków z takimi wadami wrodzonymi, jak: wady rozwojowe czaszki, twarzy i palców oraz opóźnienie wzrostu (*Bawle* i wsp. 1998; *Milunsky* i wsp. 1968).

U kobiet, które leczono metotreksatem przed ciążą, nie stwierdzano zwiększonego ryzyka poronień samoistnych lub występowania wad u potomstwa (*van Thiel* i wsp. 1970; *Ross* 1976; *Walden, Bagshawe* 1976).

Laktacja

Johns opublikował dane dotyczące wydzielania metotreksatu do mleka u 25-letniej kobiety, która otrzymywała doustnie dawkę 22,5 mg dziennie związku z powodu raka kosmówki miesiąc po porodzie (*Johns* i wsp. 1972). Metotreksat był wykrywany w mleku w 2 h po podaniu, osiągając maksimum ($5 \cdot 10^{-9}$ M/l lub około 0,011 mg/l) w ciągu 10 h. Stosunek metotreksatu w mleku do zawartości w osoczu wynosił 0,08: 1.

Płodność

Na podstawie 445 historii położniczych kobiet przewlekłe leczonych chemioterapią z powodu nowotworów trofoblastu (średnio przez cztery miesiące) oceniono przypadki występowania bezpłodności w latach 1958-1978. Spośród 118 kobiet leczonych metotreksatem, 116 (98%) kobiet zaszło w ciążę, a 106 (90%) urodziło, co najmniej jedno żywe dziecko (*Rustin* i wsp. 1984). Podobnie wykazano, na podstawie wyników badań 392 ciężarnych kobiet leczonych metotreksatem w latach 1957-1990, że 365 (93%) kobiet poczęło oraz 327 (83%) urodziło co najmniej jedno żywe dziecko (*Woolas* i wsp. 1998).

Oceniano zaburzenia płodności na podstawie wyników obserwacji 13 kobiet leczonych metotreksatem, które zostały opublikowane w latach 1983-1995 (*Kung* i wsp. 1997). Dziewięć

z tych kobiet (69%) urodziło żywe dzieci bez wad wrodzonych, u jednej wystąpiło poronienie (8%), a trzy kobiety były bezpłodne (23%).

Matsui i wsp. (2003) badał wynik pierwszej ciąży u pacjentek, które osiągnęły remisję po zakończeniu chemioterapii nowotworów trofoblastu metotreksatem. Wśród 39 pacjentek otrzymujących metotreksat w monoterapii: 29 urodziło żywe dziecko (średnia dawka skumulowana: 423 ± 304 mg), u 4 kobiet wystąpiły przypadki powikłanej ciąży (całkowite dawki: 500 ± 216 mg), a u 6 poronienia (dawka nieznana).

Shamberger i wsp. (1981) badali czynności gonad 2 kobiet i 3 mężczyzn leczonych metotreksatem przez 30 ÷ 36 miesięcy, podczas leczenia uzupełniającego po operacji kostniakomięsaka. U kobiet nie stwierdzono wpływu metotreksatu na poziom FSH (hormon folikulotropowy) i LH (hormon luteinizujący) w surowicy. U żadnej z kobiet nie rozwinął się wtórny brak miesiączki lub nieprawidłowości miesiączkowania, nawet w trakcie leczenia. U 2 mężczyzn: liczba plemników w nasieniu, poziom testosteronu w surowicy oraz poziomy FSH i LH, nie zostały istotnie zmienione, natomiast u trzeciego mężczyzny, poziom FSH był podwyższony ($p < 0,01$) i wrócił do normy po zakończeniu leczenia.

Odnutowano 3 przypadki impotencji u mężczyzn z reumatoidalnym zapaleniem stawów leczonych dawką 12,5 mg tygodniowo metotreksatu. Zaburzenia seksualne były odwracalne po odstawieniu leku (*Blackburn, Alarcon* 1989).

Istnieją raporty dotyczące pojedynczych przypadków lub serii przypadków pacjentów z łuszczycą leczonych metotreksatem, u których liczba nasienia i ruchliwość zmniejszyły się, a morfologia plemników pogorszyła się od 10 do ponad 50%, ale w żadnym z raportów nie przedstawiono analizy statystycznej (*Grunnet* i wsp. 1977; *Gunther* 1970; *van Scott, Reinertson* 1959; *Skalko, Gold* 1974).

El Beheiry i wsp. (1979) nie stwierdzili zmian w nasieniu uzyskanym od 26 mężczyzn z łuszczycą (wiek 33 ÷ 52) leczonych doustnie dawką 25 mg metotreksatu tygodniowo przez 10 tygodni. Także biopsja jąder i badania spermatogenezy u 5 z nich nie wykazały zmian w czasie 70 dni po zakończeniu terapii.

Zwierzęta

Metotreksat (MTX) wykazywał działanie teratogenne i embriotoksyczne u różnych gatunków zwierząt (tab. 7.) W dawkach nietoksycznych dla matek metotreksat wykazywał działanie teratogenne oraz prowadził do występowania letalnych wad płodów (tab. 8.).

Tabela 7.

Działanie teratogenne i embriotoksyczne metotreksatu (TX) na różne gatunki zwierząt

Zwierzęta	Droga podania	Dawka	Czas narażenia	Obserwowane skutki	Piśmiennictwo
Mysz	dootrzewnowo	25 mg/kg mc.(tj. LD ₁₀)	w 10. dniu ciąży	27% wad wrodzonych u płodu 43% resorpcji płodów	Skalko, Gold 1974
Mysz	dootrzewnowo	50 mg/kg mc.(tj. LD ₅₀)	w 10. dniu ciąży	92% wad wrodzonych u płodu 91% resorpcji płodów	Skalko, Gold 1974
Mysz C57BL/6J (n = 15)	dootrzewnowo	20 mg/kg mc.	w 9. dniu ciąży	myszki uśmiercono w 18. dniu ciąży; całkowita liczba zagnieżdżeń wynosiła odpowiednio 104 i 79 u zwierząt narażonych i w grupie kontrolnej; u myszy narażonych na MTX liczba żywych płodów zmniejszyła się (39% w porównaniu z 94% w grupie kontrolnej); u 44% żywych płodów wystąpił rozszczep twarzoczaszki z towarzyszącym wtórnym rozszczepem podniebienia, u 24% rozszczep podniebienia, a 5% miało brak nozdrzy; częstość tych wad w grupie kontrolnej wynosiła 0%; wrodzony brak gałek ocznych, małoocze, otwarte powieki obserwowano u 29% żywych płodów w grupie zwierząt narażonych w porównaniu z 4% w grupie kontrolnej	Darab i wsp. 1987
Królik	dootrzewnowo	19,2 mg/kg mc.	w 10. i 11. dniu ciąży lub 12. i 13. dniu ciąży	rozszczep twarzoczaszki, rozszczep podniebienia, wady proksymalnych części kości kończyn przednich u płodu	Jordan 1973
Królik	dootrzewnowo	19,2 mg/kg mc.	w 8. i 9. dniu ciąży	100% resorpcji płodów	Jordan 1973
Szczur	dootrzewnowo	0,2 mg/kg mc.	w 9. dniu ciąży	działanie teratogenne u 35% płodów; działanie embriotoksyczne u 63%	Jordan i wsp. 1977
Szczur	dootrzewnowo	0,3 mg/kg mc.	w 9. dniu ciąży	działanie teratogenne u 75% płodów; działanie embriotoksyczne u 84%	Jordan i wsp. 1977
Szczur	dootrzewnowo	2,5 mg/kg mc.	między 6. ÷ 9. dniem ciąży	działanie embriotoksyczne u 100%	Jordan i wsp. 1977

cd. tab. 7.

Zwierzęta	Droga podania	Dawka	Czas narażenia	Obserwowane skutki	Piśmiennictwo
Królik (n = 10)	dożylnie	19,2 mg/kg mc.	w 12. dniu ciąży	zwierzęta zabijano po 32 h od zakończenia narażenia; stwierdzono 25% resorpcji vs. 13 w grupie kontrolnej, obniżenie masy ciała płodów ($p < 0,005$) i wzrost liczby wad rozwojowych (94% vs. 4%; $p < 0,005$): rozszczep podniebienia, wodogłowie, wady kości kończyn przednich i tylnych u płodu; badanie histologiczne wykazało zmniejszenie aktywności mitotycznej w ekto- i mezodermie 16 h od iniekcji	<i>DeSesso, Jordan 1977</i>
Kot	<i>per os</i>	0,5 mg/kg mc.	między 11. ÷ 14., 14. ÷ 17. lub 17. ÷ 20. dniem ciąży	toksyczność matczyzna odpowiednio u 1/20; 4/7 i 3/18 zwierząt; nieprawidłowości narządów, np. przepuklina pępkowa, rozszczep podniebienia, wodogłowie, rozszczep kręgosłupa i zniekształcenia szkieletowe głównie kończyn obserwowano u płodów narażonych 11. ÷ 14. dniem lub 14. ÷ 17. dniem ciąży	<i>Khera 1976</i>
Małpa Rhesus	dożylnie	2,5 ÷ 4 mg/kg mc.	17. ÷ 45. dniem ciąży, 2 ÷ 4 razy	7/11 – nie obserwowano zmian u płodów, uzyskanych w wyniku hysterotomii w 100. dniu ciąży 3/11 – poronienie między 3. a 30. dniem od narażenia	<i>Wilson 1971</i>
Małpa Rhesus (n = 24)	dożylnie	0,5 ÷ 4 mg/kg mc.	między 7. ÷ 45. dniem ciąży, 1. ÷ 24. dniem	14/24 (58%) – nie obserwowano zmian u płodów, uzyskanych w wyniku hysterotomii w 100. dniu ciąży 8/24 – poronienia 1/24 – opóźnienie wzrostu i kostnienia kości długich, 11 kręgu piersiowego i 8 szyjnego 1/24 – opóźnienie kostnienia 13 kręgu piersiowego i żeber; stężenia MTX zmierzone u embrionów wahały się między 108 ÷ 209 ng/g	<i>Wilson 1974; Wilson i wsp. 1979</i>
Szczur rasy Wistar (n = 10 ÷ 17/ grupę)	dożylnie	0,3 mg/kg mc.	w 11. dniu ciąży	autopsja została przeprowadzona w 20. dniu ciąży; stwierdzono 20% resorpcji vs 5% w grupie kontrolnej oraz takie działanie teratogenne, jak deformacja kręgu ogonowego i opóźnienie wzrostu; stężenia MTX zmierzone u embrionów wahały się od 3,4 ÷ 7,7 ng/g	<i>Wilson i wsp. 1979</i>

Tabela 8.**Wyniki badań płodności u zwierząt otrzymujących dożylnie metotreksat (MTX)**

Zwierzęta	Droga podania	Dawka/Czas narażenia	Obserwowane skutki	Piśmiennictwo
Szczur Sprague-Dawley, samce po okresie dojrzewania, $n = 8$	dożylnie	100; 300; 500; 700 mg/kg mc. jednorazowo	50% szczurów otrzymujących dawkę 300 mg/kg mc. i większą padło w ciągu 5 dni po podaniu MTX; badania przeprowadzone 56 dni po podaniu MTX nie wykazały żadnego wpływu narażenia na masę: ciała, względną i bezwzględną masę nerek, wątroby, płuc, jąder oraz wielkość ww. narządów; nie stwierdzono nieprawidłowości w badaniach histologicznych; obserwowano niezależne od dawki zmniejszenie liczby plemników po dawkach 100 i 300 mg/kg mc.	Johnson i wsp. 1994
Królik, samiec po okresie dojrzewania	dożylnie	6 mg/kg mc., raz w tygodniu przez 14 tygodni w 15. tygodniu, zwierzęta otrzymały 57,5 mg/kg mc. MTX	wskaźnik płodności (TFI: $76,2 \pm 2,58$) i średnia liczba spermatogonii/kanalik nasienny ($2,55 \pm 0,16$) była znamienne mniejsza w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $88,8 \pm 0,75$ i $4,85 \pm 0,29$); spermatogonie charakteryzowały się obrzękiem cytoplazmatycznym i wakuolizacją; stężenia MTX w jądrach były większe niż w surowicy ($37,1 \pm 4,22$ nmol/l lub około 17 ± 2 mg/l w porównaniu z $13,4 \pm 4,95$ nmol/l lub około 6 ± 2 g/l; $p < 0,001$); w porównaniu z grupą kontrolną, poziomy FSH i androstendionu w osoczu były podwyższone, a poziom LH był niezmienny, natomiast poziom testosteronu były statystycznie istotnie niższy	Koehler i wsp. 1988

Metotreksat w dawkach embriotoksycznych był podawany szczurom Wistar w 10. dniu ciąży (0,3 mg/kg mc.) oraz małpom Rhesus między 29. a 32. dniem ciąży (3 mg/kg mc.) w celu zbadania, czy substancja przenika przez łożysko badanych gatunków. W ciągu pierwszych 8 h stężenia metotreksatu w tkance zarodka wynosiły $108 \div 209$ ng/g tkanki u małą oraz $3,4 \div 7,7$ ng/g tkanki u szczura. U szczura mała dawka powodowała umiarkowaną embriotoksyczność i bardzo małe stężenie w tkance zarodka, natomiast u małą duża dawka podana matkom działała słabo embriotoksycznie pomimo dużego stężenia substancji w

tkance zarodka (Scott i wsp. 1987; Wilson i wsp. 1979).

Dootrzewnowo myszom podawano dawki: 5; 10; 20 lub 40 mg/kg mc. metotreksatu raz w tygodniu przez 5 oraz 10 tygodni. Zwierzęta uśmiercono po 1. tygodniu od podania ostatniej dawki. W badaniu oceniano: masę jąder, liczbę plemników, morfologię plemników, badanie nasienia testem kometowym, histologicznym oraz testem tunelowym. Metotreksat w zależności od wielkości dawki znacząco zmniejszał liczbę plemników i zwiększał częstość występowania ich nieprawidłowości (Padmanabhan i wsp. 2008).

TOKSYKOKINETYKA

Wchłanianie i rozmieszczenie

Metotreksat (MTX) jest częściowo wchłaniany z przewodu pokarmowego (Henderson i wsp. 1965). Absorpcja z przewodu pokarmowego zależy od wielkości dawki. Dawki metotreksatu $< 0,8$ mg/kg mc. są dobrze wchłaniane, biodostępność wynosi 60%. Absorpcja dawek > 2 mg/kg mc. jest zdecydowanie słabsza z powodu nasycenia. Największe stężenie w surowicy metotreksat osiągał w ciągu $1 \div 4$ h od podania doustnego (Health... 2011). Według EBEWE (2007), po doustnym podaniu dawki 5 mg produktu (2 tabletki po 2,5 mg) Methotrexat-Ebewe lek był szybko wchłaniany, a czas, po którym osiągał maksymalne stężenie w osoczu (T_{max}), wynosił 0,83 h. Średnie stężenie w surowicy wynosiło 170 ng/ml (EBEWE 2007). Po dawce 30 mg/m² lub mniejszej metotreksat łatwo ulegał absorpcji, a biodostępność wynosiła 60%. W dawkach > 80 mg/m² biodostępność nie przekraczała 40% (Stuart i wsp. 1979; Pfizer 2011). U pacjentów z RZS leczonych dawkami $7,5 \div 15$ mg/tydz. metotreksatu maksymalne stężenie związku w osoczu wynosiło około $0,3 \div 0,8$ μmol/l ($0,66 \div 1,8$ mg/l) i zmniejszało się po 24 h od podania pojedynczej dawki do $< 0,05$ μmol/l ($0,11$ mg/l), (Kremer 2004).

Metotreksat jest całkowicie wchłaniany po podaniu dootrzewnowym oraz domięśniowym, maksymalne stężenie w surowicy osiąga po $30 \div 60$ min (Pfizer 2011). Po podaniu dożylnym metotreksatu początkowa objętość dystrybucji wynosi w przybliżeniu $0,18$ l/kg (18% masy ciała). Po osiągnięciu stanu równowagi wartość ta wynosi $0,4 \div 0,8$ l/kg ($40 \div 80\%$ masy ciała). Metotreksat współzawodniczy z foliniami o pojedynczy nośnik aktywny w czynnym transporcie przez błonę komórkową. Metotreksat biernie dyfunduje do wnętrza komórki, gdy jego stężenie w surowicy wynosi

powyżej 100 mikromoli/l (220 mg/l). W surowicy metotreksat wiąże się z białkami w 50% (EBEWE 2007; Bleyer 1977).

Metotreksat wchłaniał się przez skórę u myszy. Wchłanianie metotreksatu przez skórę zwierząt lub ludzi mieści się w granicach $0 \div 24\%$, a w większości badań w warunkach in vitro – $0,05 \div 4,0\%$ (McCulloch i wsp. 1976; Alvarez-Figueroa i wsp. 2001; Stewart i wsp. 1972). Badania wchłaniania metotreksatu przez skórę ludzi i myszy w warunkach in vitro przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch technik: scyntylacji znaczonego trytem metotreksatu i oznaczania inhibicji reduktazy dihydrofolanowej. Przy stosowaniu techniki scyntylacji nie obserwowano znamienych różnic w wielkości absorpcji metotreksatu przez skórę ludzi w zależności od ilości użytego metotreksatu. Absorbancja wynosiła wówczas $2,74 \div 3,88\%$ po dawkach $0,5 \div 32$ μg/1,24 cm² skóry, przez 20 h. W przypadku myszy większa ilość metotreksatu ulegała absorpcji po mniejszych dawkach: dawka 32 μg/1,5 cm² odpowiadała absorpcji 4,38%, natomiast dawka $0,5$ μg/1,24 cm² – 16,3%. Metoda oznaczania inhibicji reduktazy dihydrofolanowej potwierdziła, że im mniejsza dawka metotreksatu, tym większa absorpcja przez skórę. W stosowanej dawce $0,1$ mg metotreksatu absorpcja wynosiła średnio 5,5%, a po dawce $0,5$ mg – 1,15% (inkubacja próbek przez 20 h), (Newbold, Stoughton 1972). Wartość współczynnika wchłaniania metotreksatu przez skórę u myszy HRS/JR w warunkach in vitro równą 35 μg/cm²/h wyznaczył Chatterjee (Chatterjee i wsp. 1997).

Absorpcję i rozmieszczenie metotreksatu w: osoczu, płynie maziowym (SF), skórze, mięśniach i tkankach, badano po aplikacji miejscowej żelu metotreksatu na skórę królików i szczurów. U królików, stężenie metotreksatu w osoczu wzrastało do osiągnięcia maksimum po około 2 h ($5,9 \pm 2,8$ ng/ml).

Czas połowicznego zaniku wynosił 4,48±1,74 h. W ciągu 1 h od podania stężenie metotreksatu w skórze wynosiło: pod stawem kolanowym 49,0 ±19,8 µg/g, w mięśniach 12,7±3,3 ng/g, a w SF 19,2±10,1 ng/g i było znacząco większe ($p < 0,05$) w porównaniu ze stężeniami w okolicy stawu kolanowego, który nie został poddany leczeniu. Duża frakcja (około 59%) metotreksatu, która znajdowała się w skórze 1 h po podaniu, była obecna w warstwie rogowej naskórka. Stężenie metotreksatu w mięśniach i SF 1 h po podaniu było 1,8 i 2,6 razy większe niż stężenie metotreksatu w stawie łokciowym (Lu i wsp. 1997).

Na podstawie wyników badania wchłaniania metotreksatu o stężeniu 25 mg/ml naniesionego na skórę 6 ochotników na 30 min wykazano, że stężenie metotreksatu w osoczu mierzone po: 0; 2; 4; 8; 12 lub 24 h, nie przekroczyło 0,02 µmola/l (0,044 mg/l) w żadnym momencie, natomiast stężenie metotreksatu w moczu wynosiło odpowiednio: < 0,01; 0,01; < 0,01; < 0,01; 0,02 µmoli/l (< 0,022; 0,022; < 0,022; < 0,022; 0,044 mg/l). Producenci metotreksatu rekomendują stężenie 10 µmoli/l (22 mg/l) w osoczu, czyli 500 razy większe od oznaczonego, jako wartość krytyczną, przy której jest niezbędna suplementacja kwasem foliowym (Wong i wsp. 2009).

Wychwyt metotreksatu przez wątrobę u szczurów jest szybki, a stała wysycenia wynosi K_m 1,3 mM, natomiast V_{max} – 11,1 µmol/h na gram wątroby (Strum, Liem 1977). Udowodniono wiązanie metotreksatu z białkami i zahamowanie aktywności reduktazy dihydrofolanowej, co powoduje wstrzymanie syntezy tymidylanu i puryn koniecznych do syntezy DNA (Strum, Liem 1977; McCormick i wsp. 1979).

Największe stężenia metotreksatu znaleziono w: nerkach, pęcherzyku żółciowym, śledzionie, wątrobie i skórze. Metotreksat przenika także przez łożysko i jest wykrywany w mleku matki (Health... 2011). Rozmieszczenie

metotreksatu w tkankach myszy wyrażone jako współczynnik dystrybucji osocze-tkanka wynosi: mięśnie 0,15:1; nerki 3:1; wątroba 10:1,1 (Bischoff i wsp. 1970).

Metabolizm i wydalanie

Metotreksat (MTX) jest metabolizowany w wątrobie i wewnątrzkomórkowo do koniugatów z poliglutaminianami, przy czym proces ten jest odwracalny (Health... 2011). Koniugaty te są szybko metabolizowane do 7-hydroksymetotreksatu (7-OH-MTX) przez oksydazę aldehydową wątroby (Johns, Loo 1967). Wynikiem poliglutamylacji metotreksatu jest wewnątrzkomórkowa kumulacja leku. Ponieważ metotreksat i naturalne foliany współzawodniczą o dostęp do enzymu syntetazy poliglutamylowej, duże stężenie wewnątrzkomórkowego metotreksatu prowadzi do zwiększonej syntezy poliglutamylometotreksatu, nasilając cytotoksyczne działanie leku.

Na podstawie wyników badań wykazano, że metotreksat jest znacząco metabolizowany w dawkach stosowanych klinicznie, tzn. jest w znacznym stopniu metabolizowany do 7-hydroksymetotreksatu u pacjentów otrzymujących konwencjonalne dawki (< 10 mg/kg mc.) oraz duże dawki (> 10 mg/kg mc.). U pacjentów leczonych dawką 12 g/m² metotreksatu stwierdzono, że stężenie 7-OH-MTX w surowicy nie przekracza 2,7 mM (Erttmann 1985), podczas gdy po dawce 33,6 g MTX/m² wynosiło 3,5 mM pod koniec 24-godzinnej infuzji (Borsi i wsp. 1990).

Opisano farmakokinetykę 7-OH-MTX u szczurów po podaniu dożylnym dawki 0,1 g/kg mc. metotreksatu. Po 10 min 7-OH-MTX był eliminowany trójfazowo z czasem połowicznego zaniku $t_{1/2a}$ -1,6 min±/-1,1, $t_{1/2b}$ - 12,2 min±/-3,3, $t_{1/2c}$ -62,3 min±/-33 h ($n = 4$). Całkowity klirens (CLT) wynosił 13,3 ± 4,8 ml/min/kg. Czas połowicznego zaniku 7-OH-MTX wzrastał wraz ze wzrostem podanej dawki (Smeland i

wsp. 1994; *Fuskevag* i wsp. 2000). U szczurów, którym podano dawkę 100 mg/kg 7-OH-MTX, obserwowano maksymalne stężenie metotreksatu w osoczu wynoszące $0,8 \div 1,0$ mM. Stężenie w osoczu w chwili padnięcia zwierząt wynosiło $1,9 \div 2,0$ mM po infuzji 7-OH-MTX całkowitej dawki 0,38 g/kg (*Smeland* i wsp. 1996). Na podstawie wyników badań wykazano, że metabolit metotreksatu jest bardziej toksyczny niż sam metotreksat (*Smeland* i wsp. 1994; *Bremnes* i wsp. 1991; *Smeland* i wsp. 1996; *Fuskevag* i wsp. 2000).

Kwas 2,4-diamino- N^{10} -metylopterowy o stężeniu 10^{-7} M zidentyfikowano w moczu pacjentów po podaniu dawek $140 \div 350$ mg/kg metotreksatu (Health... 2011). Kwas 2,4-diamino- N -metylopterowy (DAMPA) jest wytwarzany z udziałem karboksypeptydazy bakterii jelitowych. Kwas 2,4-diamino- N -metylopterowy stanowi 6% wśród metabolitów wykrywanych w moczu, po dożylnym podaniu metotreksatu.

Według informacji producenta leku (Pfizer 2011) okres półtrwania metotreksatu w końcowej fazie eliminacji zależy od podanej dawki i wynosi $3 \div 10$ h u pacjentów leczonych z powodu łuszczycy lub reumatoidalnego zapalenia stawów, a także leczonych z powodu nowotworów małymi dawkami metotreksatu ($< 0,8$ mg/kg mc. lub poniżej 30 mg/m²). U pacjentów otrzymujących duże dawki metotrek-

satu okres półtrwania w końcowej fazie eliminacji wynosi $8 \div 15$ h. Po podaniu dożylnym metotreksat jest wydalany trzyfazowo z czasami połowicznego zaniku: $0,75$; $2 \div 6$; i $10 \div 12$ h (*Bleyer* 1977).

Klirens nerkowy metotreksatu wynosił $0,0623 \pm 0,0232$ l/kg/h i stanowił 84% klirensu całkowitego; $70 \div 90\%$ dawki metotreksatu jest odzyskiwane jako metotreksat i $0,4 \div 11\%$ jako 7-OH-MTX (*Breithaupt, Kuenzlen* 1982).

Wydalenie metotreksatu zależy od drogi podania. Główną drogą wydalania metotreksatu i jego metabolitów jest mocz i żółć. Częściowa reabsorpcja ma miejsce w jelitach. Po podaniu dożylnym $80 \div 90\%$ dawki zostaje wydalone w ciągu 24 h w postaci niezmienionej. Nie więcej niż 10% dawki jest wydalane z żółcią. Rozpatruje się także możliwość jelitowo-wątrobowego krążenia leku (*Calvert* i wsp. 1977). Po podaniu dożylnym dawek $0,1 \div 10$ mg/kg mc. metotreksatu i doustnym dawek $0,1$ mg/kg mc. $60 \div 90\%$ zostało wydalone z moczem w ciągu 24 h, a $2 \div 5\%$ i $7 \div 9\%$ odpowiednio z kałem. Po podaniu doustnym dawki 10 mg/kg mc. metotreksatu 15 i 45% zostało wydalone z moczem w ciągu $1 \div 5$ dni, a 39% z kałem (Health... 2011). U psów i małp około $67 \div 91\%$ dawki metotreksatu zostało wydalone z moczem i kałem w ciągu $24 \div 48$ h od podania dożylnego (*Henderson* i wsp. 1965).

MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Metotreksat (MTX) jest pochodną kwasu foliowego, należy do związków cytotoksycznych, zwanych antymetabolitami. Podobieństwo chemiczne powoduje, że metotreksat zastępuje kwas foliowy w reakcjach biochemicznych. Działa głównie w fazie S cyklu komórkowego, przez kompetycyjne hamowanie enzymu reduktazy dihydrofolianowej, odpowiedzialnej za redukcję dihydrofolianu do aktywnej postaci kwasu foliowego – tetrahydrofolianu, co prowadzi do redukcji syntezy tymidylanu i nukleotydów puryny

oraz wpływa na syntezę DNA i RNA (*Jackson, Harrap* 1973).

Takie komórki szybko proliferujące, jak: komórki nowotworowe, szpik kostny, komórki płodu, błona śluzowa jamy ustnej i jelit oraz komórki pęcherza moczowego, są najbardziej wrażliwe na działanie metotreksatu. Jeżeli proliferacja komórek w tkance nowotworowej następuje szybciej niż w tkankach prawidłowych, to metotreksat może wywierać działanie przeciwnowotworowe bez szkodliwego działania

na tkanki prawidłowe. Mechanizm działania metotreksatu w reumatoidalnym zapaleniu stawów nie jest jednoznacznie wyjaśniony i najprawdopodobniej jest on związany z immunosupresyjnym działaniem leku. Wyjaśnienie wpływu metotreksatu na układ immunologiczny i jego korzystnego działania w grupie schorzeń autoimmunologicznych wymaga dalszych badań. W łuszczycy odnowa komórek naskórka jest znacznie szybsza niż w skórze prawidłowej. Ta właśnie różnica aktywności proliferacyjnej komórek prawidłowych naskórka i pobudzonych w płytce łuszczykowej stanowi podstawę do stosowania metotreksatu w terapii (Pfizer 2011).

Takie zmiany w układzie moczowym, jak: krwiomocz, zapalenie pęcherza moczowego, azotemia i niewydolność nerek, występują prawdopodobnie w wyniku wytrącania się leku lub metabolitu metotreksatu (7-hydroksy-MTX) w kanalikach nerkowych (Jacobs i wsp. 1977). U 62-letniego pacjenta obserwowano ostre uszkodzenie nerek (*acute kidney injury* AKI) po 48 h od podania metotreksatu. Stężenie metotreksatu w osoczu wynosiło 2,61 i 0,25 $\mu\text{mol/l}$ (5,74 mg/l i 0,55 mg/l) odpowiednio po 24 i 72 h. W badaniu mikroskopowym moczu obserwowano brązowy osad. Stężenie metotreksatu w moczu wynosiło 4,9 $\mu\text{mol/l}$ (10,8 mg/l), (Mallipattu i wsp. 2011).

DZIAŁANIE ŁĄCZNE

Pucci ocenił, że jednym z pierwszych objawów narażenia na cytostatyki wśród personelu medycznego przygotowującego i podającego leki są bóle głowy (Pucci i wsp. 2005). Badano grupę 12 pracowników (9 kobiet i 3 mężczyzn) przygotowujących takie leki, jak: ACNU, MTX, Novantron, Vincristin, Cyklofosfamid, Carboplatinum, Mytoxantron, w pokojach do przygotowywania leków. Na bóle głowy uskarżało się 66,6% badanych. Za pomocą monitoringu powietrza w pomieszczeniu przygotowawczym metodą HPLC/MS nie stwierdzono stężeń badanych leków powyżej oznaczalności metody analitycznej.

Wpływ narażenia zawodowego na leki przeciwnowotworowe badano za pomocą kwestionariusza, określając występowanie ostrych objawów narażenia u: 8566 farmaceutów, techników farmacji, pielęgniarek i pielęgniarzy (Valanis i wsp. 1993; Valanis i wsp. 1993b). Badaniami objęto 57 instytucji biorących udział w projekcie National Surgical Adjuvant Breast and Bowel. Zebrano dane na temat czterech wykonywanych czynności w zakresie obróbki cytostatyków: mieszanie leków przeciwnowotworowych, podawa-

nie tych leków, sprzątanie wycieków leków i zajmowanie się wydaliniami pacjenta. W pierwszym etapie do badań wytypowano 738 techników farmacji i farmaceutów (Valanis i wsp. 1993). Uzyskano informacje na temat: dawki, czasu trwania czynności, stosowania środków ochrony i kontaktu ze skórą. Objawy ostre pogrupowano następująco: ze strony układu pokarmowego (utrata apetytu, nudności, wymioty, biegunka, kolka jelitowa, obstrukcje), neurologiczne (ból głowy, zawroty głowy, zasłabnięcie, bezsenność), alergiczne (reakcje alergiczne, podrażnienie oczu, wysypka), infekcje (przewlekły kaszel, przewlekły ból gardła, kaszel w pozycji leżącej, gorączka), kardiologiczne (płytki oddech, arytmia, obrzęk dłoni i stóp, ucisk w klatce piersiowej, podwyższone ciśnienie krwi) oraz ogólne układowe (wypadanie włosów, przebarwienia paznokci, ból w trakcie oddawania moczu, obniżone libido, złe samopoczucie). Spośród wymienionych w kwestionariuszach 27 ostrych objawów, respondenci zaznaczyli te, których doświadczyli w ciągu ostatnich trzech miesięcy. W tabeli 9. przedstawiono wyniki ankiety.

Tabela 9.

Ostre objawy narażenia zawodowego na leki przeciwnowotworowe u techników farmacji i farmaceutów

Obserwowane objawy	Procent raportowanych objawów	
	grupa narażona na cytostatyki (n = 533)	grupa kontrolna (n = 205)
Układ pokarmowy		
Utrata apetytu	11	10
Nudności	35	36
Wymioty	9	10
Biegunka	35 ^{(p,0,05)^a}	25
Kolka jelitowa	22	28
Obstrukcje	7	6
Objawy neurologiczne		
Ból głowy	64	65
Zawroty głowy	27	25
Zasłabnięcie	1	1
Bezsennność	24	24
Objawy alergiczne		
Reakcje alergiczne	34	40
Podrażnienie oczu	29	28
Wysypka	13	10
Infekcje		
Przewlekły kaszel	6	5
Przewlekły ból gardła	6 ^{(p,0,05)^a}	2
Kaszel w pozycji leżącej	8	8
Gorączka	16	18
Objawy kardiologiczne		
Płytki oddech	17	13
Arytmia	7	6
Obrzęk dłoni i stóp	12	16
Ucisk w klatce piersiowej	6	7
Podwyższone ciśnienie krwi	5	8
Objawy ogólne układowe		
Wypadanie włosów	4	3
Przebarwienia paznokci	< 1	< 1
Ból w trakcie oddawania mocz	2	1
Obniżone libido	6	7
Złe samopoczucie	34	36

Objaśnienia:

^a Istotnie statystycznie (test Fischera).

Postępowanie z cytostatykami wiązało się z małym, lecz znaczącym wzrostem liczby takich objawów ostrych w porównaniu z grupą kontrolną, jak biegunka i przewlekły ból gardła. Liczba obserwowanych objawów różniła się istotnie w zależności od płci, a kontakt ze skórą uznano za najważniejszy czynnik ryzyka. Objawy ostre u kobiet istot-

nie zależały od tego czy były one narażone na anestetyk przez skórę, czy nie ($p < 0,01$), a ich liczba wzrastała wraz z liczbą obsługiwanych przypadków (w przypadku wzajemnego oddziaływania kontaktu ze skórą i dawki, $p = 0,06$). Kontakt ze skórą był także czynnikiem prognozującym u mężczyzn ($p = 0,02$), (Valanis i wsp. 1993), (tab. 10.).

Tabela 10.**Ostre objawy narażenia zawodowego na leki przeciwnowotworowe u techników farmacji i farmaceutów w wyniku kontaktu ze skórą**

Badane objawy	Procent mężczyzn			Procent kobiet		
	grupa narażona na cytostatyki		grupa kontrolna (n = 61)	grupa narażona na cytostatyki		grupa kontrolna (n = 144)
	kontakt ze skórą (n = 68)	brak kontaktu ze skórą (n = 178)		kontakt ze skórą (n = 78)	brak kontaktu ze skórą (n = 209)	
Ogólne układowe	44 ^a	29	31	54	39	46
Kardiologiczne	43 ^a	20 ^b	30 ^c	42	33	38
Układ pokarmowy	31	21	25	52 ^a	38	38
Neurologiczne	34	23	26	45	37	40
Alergiczne	18	16	20	37 ^a	24	23

Objaśnienia:

^a Istotne statystycznie w porównaniu z pracownikami niemającymi kontaktu ze skórą ($p < 0,05$).^b Istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$).^c Istotne statystycznie w porównaniu z pracownikami niemającymi kontaktu ze skórą oraz z grupą kontrolną ($p < 0,05$).

W badaniu 2048 pielęgniarek, w ramach no (tab. 11.) następujące wyniki (*Valanis* i wsp. 1993b).

Tabela 11.**Ostre objawy narażenia zawodowego na leki przeciwnowotworowe u pielęgniarek w wyniku kontaktu ze skórą**

Objawy	Grupa kontrolna (n = 748), %	Narażeni (brak kontaktu ze skórą) (n = 283), %	Narażeni (różny stopień kontaktu ze skórą) (n = 1063), %
Ogólne układowe	51	45	58 ^a
Kardiologiczne	42	37	44 ^a
Układ pokarmowy	39	39	48 ^a
Neurologiczne	40	36	46
Alergiczne	19	17	24 ^a
Infekcje	25	31	31

Objaśnienie:

^a Istotne statystycznie w porównaniu z pracownikami niemającymi kontaktu ze skórą ($p < 0,05$).

Najczęściej zgłaszane objawy skórne były związane z usuwaniem wycieków metotreksatu oraz w wyniku kontaktu z ekskrementami pacjentów poddawanych chemioterapii. Znacząco więcej ostrych objawów wystąpiło u pielęgniarek mających kontakt z substancją przez skórę.

Przeprowadzono badanie kwestionariuszowe 1339 pielęgniarek onkologicznych zatrudnionych poza jednostkami szpitalnymi. Pielęgniarki onkologiczne w ambulatoriach zgłaszały przypadki znacznego, nieumyślnego narażenia skóry i oczu na chemioterapeutyki (Friese i wsp. 2012). Oceniono wpływ: jakości praktyki środowiskowej, obciążenia pielęgniarek oraz standardów bezpieczeństwa podczas podawania chemioterapii, na prawdopodobieństwo przypadkowego narażenia na cytostatyki. Oszacowano, że prawdopodobieństwo przypadkowego narażenia wynosi 16,9%, przy minimalnych różnicach demograficznych. Wieloczynnikowa logistyczna analiza regresji wykazała, że prawdopodobieństwo narażenia zmniejsza się, gdy opieka pielęgniarska wykorzystuje odpowiednią liczbę personelu i środków ochrony.

W 13 projektach badawczych, spośród 20 prowadzonych, wykazano, że 6 różnych cytostatyków (cyklofosfamid, metotreksat, ifosfamid, epirubicin i cisplatyna/ karboplatyna) zidentyfikowano w moczu pracowników opieki medycznej (Harrison 2001). W 2 projektach udokumentowano obecność leków przeciwnowotworowych w moczu farmaceutów i personelu pielęgniarskiego (Pethran i wsp. 2003; Wick i wsp. 2003). Badania Pethrana objęły 14 niemieckich szpitali w okresie ponad 3 lat. Cytostatyki zostały również zidentyfikowane w moczu pracowników służby zdrowia, którzy byli narażeni na aerozole leków, lub w wyniku wtórnego zanieczyszczenia powierzchni roboczych, odzieży, leków czy pojemników (Sessink i wsp. 1994; Mader i wsp. 1996; Pethran i wsp. 2003).

Badaniem ankietowym objęto 104 osoby narażone zawodowo na cytostatyki (nie podano jakie), w tym 20 lekarzy, 59 pielęgniarek, 25 salowych zatrudnionych w 4 oddziałach chemioterapii w Łodzi oraz 103 osoby z grupy kontrolnej nienarażone na cytostatyki, w tym

19 lekarzy, 60 pielęgniarek i 24 salowe zatrudnione w oddziałach chorób wewnętrznych na terenie Łodzi. Większość badanych w obydwu grupach stanowiły kobiety (96,2 i 95,1%), przeważnie w okresie rozrodczym. W grupie kontrolnej mniej był rozpowszechniony nałóg palenia tytoniu (36,9%) niż w grupie osób narażonych (45,2%). Badanie przeprowadzono na podstawie analizy odpowiedzi kwestionariusza zawierającego pytania o dane: demograficzne, przebieg pracy zawodowej, ze szczególnym uwzględnieniem okresu narażenia na leki przeciwnowotworowe obecnie i w przeszłości, a także obserwowanych objawów: wzmożonego wypadania włosów, zmian w obrębie paznokci (łamliwość, kruchość, pobrudzenie), zmian skórnych (w tym wzmożonej podatności na występowanie podbiegnięć krwawych), krwawień do przewodu pokarmowego, patologicznych odchyłeń morfologii krwi obwodowej i nieprawidłowych wyników badań laboratoryjnych wątroby i nerek, rozpoznanych chorób i przyjmowanych leków. Kwestionariusz obejmował szczegółowy wywiad położniczy (przebyte ciążę, porody, poronienia oraz stan zdrowia urodzonych dzieci), a także dotyczył partnerek mężczyzn zatrudnionych w narażeniu na cytostatyki. Ponadto uwzględniono również nałóg palenia tytoniu oraz wywiad rodzinny w kierunku choroby nowotworowej. Badania laboratoryjne obejmowały: morfologię krwi obwodowej ze wzorem odsetkowym krwinek białych, OB, określenie poziomów mocznika, kreatyniny, bilirubiny, aminotrasferaz (asparaginowej AST i alaninowej ALT), γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP), czasu i wskaźnika protrombinowego (oznaczenia w surowicy) i badanie ogólne moczu. Najczęstszymi dolegliwościami zgłaszanymi w grupie narażonej były zmiany w przydatkach skóry: wzmożone wypadanie włosów (60% vs. 10,7% w grupie kontrolnej), zmiany w obrębie paznokci (47,1% vs. 44,7%). W uzyskanym

osobniczym i rodzinnym wywiadzie dotyczącym chorób nowotworowych żaden z uczestników badania nie zgłosił przebytej czy też obecnej choroby nowotworowej, a 42 osoby z grupy narażonej i 44 osoby z grupy kontrolnej (40% vs. 42,7%) w wywiadzie rodzinnym podało informację o chorobie onkologicznej w rodzinie (w tym chorobę nowotworową u krewnych pierwszego stopnia podało odpowiednio 20 i 26 osób). Analiza danych uzyskanych ze szczegółowego wywiadu położniczego ujawniła znaczny odsetek ciężkich wad wrodzonych u potomstwa osób narażonych na cytostatyki w porównaniu z grupą kontrolną (4,8% ogólnej liczby odnotowanych ciąż w okresie pracy w narażeniu vs. 0,6% wszystkich ciąż osób z grupy kontrolnej). Wskaźnik stwierdzony w grupie narażonej był wysoki, zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i do populacji generalnej, w której dla ciężkich wad nie przekracza kilku promili. W grupie narażonej także poronienia samoistne były częstsze (8,3% vs. 5,3%) niż w grupie kontrolnej, jednakże nie osiągnęły one znamienności statystycznej. Analiza statystyczna (Mann-Whitneya) ujawniła ponadto, że spośród wszystkich uzyskanych danych, jedynie skargi na wzmożone wypadanie włosów były znamienne częstsze w grupie osób narażonych na cytostatyki w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie narażonej częściej stwierdzano obniżoną liczbę erytrocytów (3,8% vs. 0%) oraz leukocytozę bez cech infekcji (6,7% vs. 2,9%), aczkolwiek różnice te nie były znamienne statystycznie. Częstość występowania zmian w pozostałych oznaczanych parametrach w zakresie wartości patologicznych była podobna w obu grupach lub większa w grupie kontrolnej. W każdej z grup u 14 osób stwierdzono m.wsp. odchylenia w wynikach badań laboratoryjnych czynności wątroby. Ponadto u 9 osób z grupy narażonej i u 47 osób z grupy kontrolnej stwierdzono cechy infekcji układu moczowego. Nie stwierdzono odchyień w wynikach badań poziomów

mocznika i kreatyniny w surowicy (*Walusiak-Skorupa i wsp.* 2003).

Otrzymane dane z duńskiego rejestru nowotworów w latach 1970-1990, obejmującego 8499 obowiązkowych członków zidentyfikowanych w archiwach Związku Techników Duńskich i Aptekarzy, pakujących i przygotowujących farmaceutyki, w tym także cytostatyki, porównano z liczbą oczekiwanych nowotworów na podstawie częstości występowania raka w Danii. Standaryzowany wskaźnik zapadalności na raka (*SIR*) wynosił 1,0 ($N = 219$), (95-procentowy CI: 0,8 ÷ 1,1). Stwierdzono 1,5 raza ($N = 34$; 95-procentowy CI: 1,1 ÷ 2,1) podwyższone ryzyko raka skóry, zwłaszcza u asystentów aptecznych zatrudnionych przez dłuższy okres ($N = 15$, *SIR* 2,8; 95-procentowy CI: 1,6 ÷ 4,6). Stwierdzono zwiększone ryzyko chłoniaka nieziarniczego u techników aptecznych zatrudnionych długoterminowo ($N = 5$, *SIR* 3,7; 95-procentowy CI: 1,2 ÷ 8,9). Oceniono, że nowotwory te mogły być związane z narażeniem na działanie rozpuszczalników organicznych (*Hansen, Olsen* 1994).

W piśmiennictwie znaleziono opis raka pęcherza moczowego u 39-letniej farmaceutki, jako następstwo zawodowego narażenia na cytostatyki. Ustalono, że osoba ta nie była narażona na inne znane kancerogeny zawodowe i środowiskowe, a 12 lat przed rozpoznaniem choroby pracowała w szpitalnym dziale leków pozajelitowych przez 20 miesięcy i 7 h dziennie. Farmaceutka przygotowywała po 2 ÷ 3 roztwory dziennie z takimi lekami, jak: cyklofosfamid, fluorouracyl, metotreksat, doksorubicyna i cisplatyna. W tym celu korzystała z łoży z poziomym nawiewem jałowego powietrza. Konstrukcja tego typu łoży sprawia, że powietrze z wnętrza łoży jest wypychane na zewnątrz przez komorę roboczą w kierunku operatora, przez co ma on bezpośredni kontakt ze środowiskiem skażonym cytostatykiem (*Levin i wsp.* 1993).

Dostępne są także wyniki badań cytogenetycznych personelu medycznego narażonego na różne leki przeciwnowotworowe. W niektórych pracach nie wskazano na jakie leki cytostatyczne był narażony personel. Można podsumować, że w badaniach tych stwierdzano wzrost ryzyka działania genotoksycznego u pracowników, lecz ryzyko to może być zmniejszone przez lepsze zarządzanie i stosowanie środków prewencji. Pozytywne wyniki uzyskano w następujących testach: aberracji chromosomowych, wymiany chromatyd siostrzanych, teście mikrojądrowym, teście kometyowym i teście mutacji genowych (Rombaldi i wsp. 2009).

Wzrost częstości aberracji chromosomowych w komórkach limfocytów krwi obwodowej stwierdzono w badaniach 20 pielęgniarek pracujących z chemioterapeutykami, w tym metotreksatem (głównie CIS, 5-FU, CP, EP). Częstość aberracji w komórkach wynosiła $1,15\% \pm 0,65$ i $2,55\% \pm 1,63$, odpowiednio z uwzględnieniem pęknięć chromatyd i pęknięć chromatyd z przemieszczeniem fragmentu oraz z wyłączeniem tych uszkodzeń. W grupie kontrolnej wyznaczono częstość aberracji odpowiednio $0,49\% \pm 0,56$ oraz $1,01 \pm 0,97$. Analiza wariancji wykazała, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za uszkodzenia w komórkach jest narażenie na leki przeciwnowotworowe ($p = 0,021$ i $p = 0,002$). Wiek oraz palenie papierosów nie były istotnymi czynnikami dla częstości aberracji (Burgaz i wsp. 2002).

W innym badaniu przeprowadzonym z 10 pielęgniarkami zatrudnionymi przy pracy z cytostatykami (CIS, CP, IP, vincristin, doxorubicin, dactinomycin, cytosine i metotreksat) wykazano istotny wzrost częstości aberracji chromosomowych oraz wzrost liczby mikrojąder. Wszystkie badane pielęgniarki były wyposażone w: rękawice ochronne, maski chirurgiczne, fartuchy ochronne i czepki (Kevekor-

des i wsp. 1998). Na podstawie kolejnego badania, które obejmowało 17 pielęgniarek z oddziału onkologicznego, wykazano nieistotny wzrost częstości wymiany chromatyd siostrzanych w przypadku kobiet stosujących ochrony osobiste, natomiast wzrost ten był istotny w przypadku zarówno pielęgniarek niestosujących ochron osobistych w stosunku do pielęgniarek z grupy kontrolnej ($p < 0,001$), jak i w stosunku do pielęgniarek z grupy niestosującej ochron ($p < 0,001$), (Brumen, Horvat 1996). W żadnej z prac nie znaleziono danych dotyczących wielkości stężeń metotreksatu w powietrzu środowiska pracy lub w materiale biologicznym.

U 17 fińskich pielęgniarek w szpitalach onkologicznych, w badaniu kliniczno-kontrolnym badano zależność między występowaniem poronień a narażeniem na leki przeciwnowotworowe. Wykorzystano dane o liczbie ciąży w latach 1973-1980 ze źródeł krajowych i centralnych rejestrów personelu opieki zdrowotnej. Dane dotyczące stanu zdrowia i narażenia uzyskano na podstawie wysyłanych ankiet; wskaźnik odpowiedzi wynosił 87%. Statystycznie istotny związek zaobserwowano między liczbą poronień a narażeniem na leki przeciwnowotworowe w pierwszym tryestrze ciąży: iloraz szans = 2,30 (95-procentowy CI: $1,20 \div 4,39$). Niezależne działanie poszczególnych leków przeciwnowotworowych nie może być w odpowiedni sposób zidentyfikowane, ponieważ wiele doniesień wskazywało, że pielęgniarki miały kontakt z więcej niż jednym z tych czynników (Selevan i wsp. 1985).

W podobnym badaniu duńskim nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu: liczby poronień, wad wrodzonych u potomstwa, dzieci z niską wagą urodzeniową oraz liczby przedwczesnych urodzeń, wśród pielęgniarek narażonych na leki przeciwnowotworowe (Skov i wsp. 1992). Valanis i wsp. (1997)

w badaniu kwestionariuszowym obserwowali wzrost przypadków bezpłodności wśród 4659 pielęgniarek i personelu aptek 200 zakładów

opieki medycznej narażonych na cytostatyki (OR = 1,5; CI: 1,1 ÷ 2,0).

ZALEŻNOŚĆ SKUTKU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI NARAŻENIA

Dostępne dane w piśmiennictwie nie pozwalają na ustalenie dla metotreksatu (MTX) zależności dawka-skutek u ludzi, niezależnie od drogi podania. Podsumowano, że już małe dawki terapeutyczne metotreksatu powodowały wystąpienie niekorzystnych skutków działania u 10 ÷ 37% leczonych. Średnia dawka metotreksatu wynosiła 8,8 mg w tygodniu (4,6 ÷ 18 mg/tydz.), średni czas terapii wynosił 36,5 miesiąca (27 ÷ 132 mies.), (Salliot i wsp. 2009).

Kremer przeprowadził obserwację pacjentów leczonych przez 104 miesiące dawkami 12,4 ÷ 14,6 mg/tydz. metotreksatu; 79 ÷ 85% badanych uskarżało się na niekorzystne skutki działania leku po 2 latach terapii (Kremer i wsp. 1986; 1992; 1997). Uważa się, że stężenie metotreksatu w osoczu > 5 μmoli/l po 24 h (11 mg/l) od podania pojedynczej dawki skutkuje działaniem cytotoksycznym na komórki o krótkim cyklu (Wong i wsp. 2009). Stężenie metotreksatu w osoczu, działające toksycznie na płuca oraz wątrobę wynosi $1 \cdot 10^{-6}$ mola/l (2,2 mg/l), (Meditext... 2014).

Gilani i wsp. (2012) za graniczne stężenie wystąpienia niekorzystnych skutków działania na krew i wątrobę przyjęli stężenie metotreksatu w osoczu wynoszące 0,71 μmol/l (1,6 mg/l). Według Pfizer (2011) zahamowanie czynności szpiku kostnego, a także działanie toksyczne

na błony śluzowe metotreksatu zależą od wielkości dawki i czasu narażenia, a krytyczna dawka działająca wynosi $> 2 \cdot 10^{-8}$ mol MTX/l osocza (0,02 mikromola/l, tj. 0,044 mg/l), natomiast krytyczny czas narażenia 42 h. Ocenia się, że dzienna dawka lecznicza metotreksatu w aerozolu mieści się w granicach 1 ÷ 500 μg (Shaik i wsp. 2002; Mc Glashan i wsp. 2007; Berner-Strzelczyk 2012) podczas stosowania leku o średnicy aerodynamicznej cząstek 2,5 μm (GSD 2) w inhalatorach ciśnieniowych. Zawartość metotreksatu wynosiła 29 μg/aplikację.

Na podstawie wyników badań na zwierzętach wykazano, że metotreksat podawany myszom podskórnie, w kapsułce infuzyjnej, w dawce 0,2 μg/h, która odpowiadała stężeniu $1 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-9}$ M w osoczu, przez 60 dni nie powodował działania toksycznego, z wyjątkiem nieznacznego wypadania sierści. Nie stwierdzono istotnych różnic w masie ciała i w badaniach histologicznych tkanek (Zaharko i wsp. 1976). W przypadku aplikacji metotreksatu w dawce 2,5 μg do obu otworów nosowych szczura, dwa razy dziennie, jeden do 5 razy w tygodniu przez 28 dni, nie stwierdzono znamienych różnic ($p > 0,05$) w badaniach histopatologicznych błony śluzowej nosa i wątroby oraz w badaniach krwi między narażanymi grupami a grupą kontrolną (Ercan i wsp. 2006).

NAJWYŻSZE DOPUSZCZALNE STĘŻENIE (NDS) W POWIETRZU I NA STANOWISKACH PRACY

Istniejące wartości NDS

W Polsce dotychczas nie zostały ustalone wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń

(NDS) metotreksatu (MTX) w środowisku pracy. Dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego metotreksatu (tab. 12) ustalili niektórzy jego producenci na poziomie 0,0003 ÷

0,0025 mg/m³ (Summary... 2012). W American Pharmaceutical Partners (2005) podano, że podstawą do ustalenia normatywu była dawka terapeutyczna, natomiast podstawy pozostałych normatywów nie są znane. Za narządy krytyczne uznano: szpik kostny, krew, układ immunologiczny, wątrobę, nerki, układ pokar-

mowy, skórę, płuca i układ rozrodczy. Ustalony normatyw ma zabezpieczyć pracowników przed takimi skutkami działania metotreksatu, jak: zaburzeniami pracy wątroby, zwłóknieniami w płucach, niedokrwistością, neutropenią, ryzykiem występowania zasinień oraz nudnościami (Summary... 2012).

Tabela. 12.

Dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego na metotreksat (MTX) ustalone przez producentów

Producent	Produkt	Dopuszczalny poziom narażenia zawodowego, mg/m ³
Fermion Oy, Finlandia (2013)	Methotrexate, disodium salt	0,0025
Pfizer Inc. (2012)	Methotrexate Tablets	0,002
American Cyanamide (Summary... 2012)	Methotrexate	0,0007
American Pharmaceutical Partners (2005)	Methotrexate Injection, USP (25 mg/l)	0,0005
Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2010)	Methotrexate	0,001 (pułapowe)
Bedford Laboratories; Ben Venue Laboratories, INC. (2007)	Methotrexate Injection, USP (25 mg/ml; 2ml, 4ml, 8ml, 10ml)	0,0005
US Pharmacopeia (2013)	Methotrexate	0,0003

W 1988 r. w OSHA arbitralnie ustalono, tzw. stężenie docelowe („*target concentration*”) dla metotreksatu na poziomie 0,04 mg/m³ (40 µg/m³) do celów monitoringu powietrza.

Należy podkreślić, że metotreksat z racji jego zastosowania jako leku jest rozpatrywany przez różne organizacje międzynarodowe w świetle prawa farmaceutycznego. Metotreksat jest zaliczony do kategorii leków niebezpiecznych wg: NIOSH, Międzynarodowego Stowarzyszenia Farmaceutów Producentów IACP (The International Academy of Compounding Pharmacists), Amerykańskiego Stowarzyszenia Farmaceutów (ASHP – American Society of Health-System Pharmacists), dla których przemysł farmaceutyczny powinien stosować normatyw higieniczny w miejscu pracy mniejszy niż 10 µg/m³.

W 2012 r. w NIOSH opracowano listę leków wykorzystywanych w chemioterapii raka i innych niebezpiecznych leków obejmujących

leki: przeciwwirusowe, hormony, a także różne inne leki stosowane w placówkach opieki zdrowotnej. Definicja leków niebezpiecznych obejmuje takie leki, które zawierają substancje wykazujące przynajmniej jedną z następujących sześciu cech u ludzi lub zwierząt: działa rakotwórczo, działa teratogennie lub powoduje toksyczność rozwojową, działa szkodliwe na rozrodczość, działa toksycznie na narządy w małych dawkach (na przykład, kilka miligramów lub mniej), działa genotoksycznie lub jest lekiem nowym, którego profil toksyczności jest podobny do istniejącego leku, uznanego za lek niebezpieczny wg powyższych kryteriów.

W 1990 r. w Amerykańskim Stowarzyszeniu Farmaceutów (ASHP, American Society of Health-System Pharmacists) oraz w 2003 r. w Międzynarodowym Stowarzyszeniu Farmaceutów Producentów (IACP, The International Academy of Compounding Pharmacists) określono szczególnie niebezpieczne farmaceutyki jako substancje, które spełniają przynajmniej

jeden z warunków: są farmakologicznie czynne po dawce równej lub mniejszej niż 150 µg/kg mc. dla dorosłych (dawka terapeutyczna 10 mg lub mniejsza), mają wyznaczone dopuszczalne poziomy stężenie poniżej 10 µg/m³ dla średniego stężenia ważonego dla 8 h pracy, są wysoce selektywne (mają zdolność łączenia się ze specyficznym receptorem lub hamowania specyficznego enzymu) lub/i są rakotwórcze, mutagenne, toksyczne w małych dawkach, zbliżonych lub

mniejszych od dawek terapeutycznych, są substancjami nowymi o nieznanym potencjale oraz toksyczności. Według klasyfikacji proponowanej przez IACP substancje farmaceutyczne w zależności od ich szkodliwych skutków dzieli się na cztery kategorie i przypisuje, tzw. wartości ECL (*exposure control limits*), tj. wielkości narażenia, które nie powodują wystąpienia żadnych szkodliwych skutków w czasie 8-godzinnego narażenia zawodowego (tab. 13.).

Tabela 13.

Klasyfikacja substancji farmaceutycznych wg Międzynarodowego Stowarzyszenia Farmaceutów Producentów (IACP), (Naumann i wsp. 1996; Galwas, Pośniak 2006)

Kategoria	Toksyczność	Opis kategorii	Wartość kontroli poziomu narażenia (ECL)
1.	mała	relatywnie nietoksyczne i niewywołujące negatywnych systemowych skutków zdrowotnych	> 0,5 mg/m ³
2.	średnia	mają mały potencjał farmakologiczny i wykazują małą toksyczność układową a przekroczenie kontrolowanej wielkości narażenia może wymagać jedynie udzielenia poszkodowanej osobie pierwszej pomocy	10 µg/m ³ ÷ 0,5 mg/m ³
3.	niebezpieczna	po krótkotrwałym narażeniu wywołują zazwyczaj odwracalne zmiany w stanie zdrowia, jednak długotrwałe narażenie na ich działanie może prowadzić do nieodwracalnych zmian	30 ng/m ³ ÷ 10 µg/m ³
4.	szczególnie niebezpieczna	krótkotrwałe oraz przewlekłe narażenie może prowadzić do skutków zagrażających życiu pracowników	≤ 30 ng/m ³

Inna klasyfikacja, zaproponowana przez grupę działającą w ramach „Globalnej strategii zarządzania ryzykiem” („*Global implementation strategy occupational risk management toolbox*”) – International Program on Chemical Safety (IPCS, Międzynarodowa Grupa Techniczna), dzieli czynne substancje farmaceu-

tyczne na 5 kategorii, uwzględniając ich właściwości: uczulające, mutagenne, rakotwórcze oraz wpływ na rozrodczość, a także poziom aktywności farmakologicznej. W tabeli 14. podano kryteria klasyfikacji oraz dopuszczalne wielkości narażenia zawodowego dla poszczególnych kategorii.

Tabela 14.

Relatywna toksyczność substancji farmakologicznie czynnych (Eherts 2004)

Kategoria	Zakres zalecanych dopuszczalnych stężeń, µg/m ³	Opis substancji
1.	> 1000	nieszkodliwe, niedrażniące i/lub o małej aktywności farmakologicznej
2.	100 ÷ 1000	szkodliwe, mogą działać drażniąco i/lub mają średnią aktywność farmakologiczną
3.	10 ÷ 100	średnio toksyczne i/lub o dużej aktywności farmakologicznej

cd. tab. 14.

Kategoria	Zakres zalecanych dopuszczalnych stężeń, $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Opis substancji
4.	$1 \div 10$	toksyczne, mogą działać żrąco, uczulająco lub genotoksycznie i/lub mają bardzo dużą aktywność farmakologiczną
5.	< 1	szczególnie toksyczne, mogą działać żrąco, uczulająco lub genotoksycznie i/lub mają wyjątkowo dużą aktywność farmakologiczną

Na podstawie przedstawionych klasyfikacji wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) metotreksatu powinna mieścić się w granicach $1 \div 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, a wartość ECL – $30 \text{ ng}/\text{m}^3 \div 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Podstawy proponowanych wartości NDS i DSB

Dostępne dane w piśmiennictwie nie pozwalają na ustalenie zależności dawka-skutek dla metotreksatu (MTX) u ludzi. Nie ma możliwości zaproponowania wartości NDS na podstawie najmniejszej doustnej dawki terapeutycznej, ponieważ metotreksat u $10 \div 37\%$ leczonych powodował wystąpienie niekorzystnych skutków działania już po małych dawkach terapeutycznych. Według Pfizer (2011) zahamowanie czynności szpiku kostnego i działanie toksyczne na błony śluzowe zależy od dawki metotreksatu i czasu narażenia, a krytyczna dawka działająca wynosi $> 2 \cdot 10^{-8}$ mol MTX/l osocza (0,02 mikromola/l, tj. 0,044 mg/l). Absorpcja metotreksatu z przewodu pokarmowego wynosi około 60%, jednak nie znaleziono danych dotyczących wchłaniania leku z dróg oddechowych, dlatego nie można ocenić, jakiemu stężeniu w powietrzu odpowiada krytyczne stężenie metotreksatu w osoczu.

Przy ustaleniu wartości NDS dla metotreksatu wzięto pod uwagę następujące dane:

- metotreksat wykazuje bezprogowe działanie genotoksyczne, które może wystąpić na każdym poziomie narażenia. Ustalenie zależności dawka-odpowiedź nie jest możliwe na podstawie danych u ludzi, jak również przez ekstrakcję wyników badań na zwierzętach

- producenci metotreksatu ustalili dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego na poziomie $0,0003 \div 0,0025 \text{ mg}/\text{m}^3$
- analiza dostępnych klasyfikacji (IPCS, NIOSH, ASHP, IACP) wykazała, że metotreksat powinien mieć wartość dopuszczalnego narażenia zawodowego na poziomie $< 0,01 \text{ mg}/\text{m}^3$. Tę wartość przyjęto za podstawę ustalenia wartości NDS metotreksatu i zastosowano arbitralnie współczynnik niepewności równy 10, uwzględniając skutki odległe wynikające z działania metotreksatu, tj. działanie genotoksyczne i szkodliwe na rozrodczość ludzi, zarówno na płodność, jak i rozwój potomstwa.

Proponuje się przyjęcie wartości NDS dla frakcji wdychalnej metotreksatu na poziomie $0,001 \text{ mg}/\text{m}^3$. Ustalenie wartości dopuszczalnej w środowisku pracy dla metotreksatu nałoży na pracodawców obowiązek monitorowania stężenia tego cytostatyku w środowisku pracy i pozwoli na ocenę rzeczywistego narażenia personelu medycznego na tę substancję. Brak jest podstaw merytorycznych do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) i dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB) metotreksatu. Zaproponowano oznakowanie metotreksatu literami „Ft” – substancja działająca szkodliwie na płód, a także „skóra” – wchłanianie substancji przez skórę może być podobnie istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową.

ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA

dr hab. n. med. MARTA WISZNIEWSKA

Instytut Medycyny Pracy

im. prof. dr. med. J. Nofera

91-348 Łódź

ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Zakres badania wstępnego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: układ oddechowy, układ nerwowy, błony śluzowe nosa, spojówki i skórę, a w zależności od wskazań – badanie dermatologiczne oraz laryngologiczne.

Badania pomocnicze: morfologia krwi, a w zależności od wskazań spirometria.

Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: układ oddechowy, układ nerwowy, błony śluzowe nosa, spojówki i skórę, a w zależności od wskazań – badanie dermatologiczne oraz laryngologiczne.

Badania pomocnicze: morfologia krwi, a w zależności od wskazań – spirometria

Częstotliwość badań okresowych: corocznie lub co 2 lata.

U w a g a

Lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne może poszerzyć jego zakres o dodatkowe specjalistyczne badania lekarskie oraz badania pomocnicze, a także wyznaczyć krótszy termin następnego badania, jeżeli stwierdzi, że jest to niezbędne do prawidłowej oceny stanu zdrowia pracownika lub osoby przyjmowanej do pracy.

Zakres ostatniego badania okresowego przed zakończeniem aktywności zawodowej

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: układ oddechowy, układ nerwowy,

błony śluzowe nosa, spojówki i skórę, a w zależności od wskazań – badanie dermatologiczne oraz laryngologiczne.

Badania pomocnicze: morfologia krwi, a w zależności od wskazań – spirometria.

Narządy (układy) krytyczne

Szpiczek kostny, nabłonek układu pokarmowego i komórki rozrodcze.

Przeciwwskazania lekarskie

Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia:

- choroby przebiegające z zaburzeniami czynności szpiku kostnego
- nawrotowe zapalenie skóry o charakterze wyprysku kontaktowego i atopowego zapalenia skóry
- przewlekłe przerostowe i zanikowe zapalenie błon śluzowych nosa
- przewlekłe stany zapalne błon śluzowych oczu.

U w a g a

Wymienione przeciwwskazania dotyczą kandydatów do pracy.

O przeciwwskazaniach w przebiegu zatrudnienia powinien decydować lekarz sprawujący opiekę profilaktyczną, biorąc pod uwagę wielkość i okres trwania narażenia zawodowego oraz ocenę stopnia zaawansowania i dynamikę zmian chorobowych.

Ze względu na działanie szkodliwie na rozrodczość ludzi oraz działanie mutagenne, w narażeniu na metotretsat nie wolno zatrudniać kobiet w ciąży i pracowników młodocianych.

Pracownicy powinni być informowani o wpływie metotreksatu na rozrodczość. Ze względu na powodowanie zaburzeń płodności i zaburzeń miesiączkowania w narażeniu na metotreksat nie powinny być zatrudniane kobiety, u których

występują trudności z zajściem w ciążę. Ze względu na potencjalne działanie uczulające, w badaniu podmiotowym należy uwzględnić wywiad w kierunku chorób alergicznych skóry i układu oddechowego.

PIŚMIENNICTWO

- Alvarez-Figueroa M.J., Delgado-Charro M.B., Blanco-Mendez J.* (2001) Passive and ionophoretic transdermal penetration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 212, 101–7.
- American Pharmaceutical Partners. INC Safety Data Sheet (2005) [<https://secure.mypss.com/cat-MaintDataServlet?existingFileId=2473>].
- ASHP, American Society of Health-System Pharmacists (Amerykańskie Stowarzyszenie Farmaceutów), (1990) Technical assistance bulletin on handling cytotoxic and hazardous drugs, drug distribution and control. Preparation and Handling-Technical Assistance Bulletin 49–64.
- Bailin P.L., Tindall J.P., Roenigk H.H., Jr., Hogan M.D.* (1975) Is methotrexate therapy for psoriasis carcinogenic? A modified retrospective-prospective analysis. *J. Am. Med. Assoc.* 232, 359–362.
- Banerjee A., Benedict W.F.* (1979) Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 39, 797–799.
- Barker J., Horn E.J., Lebwohl M., Warren R.B., Nast A., Rosenberg W., Smith C.* (2011) Assessment and management of methotrexate hepatotoxicity in psoriasis patients. Report from a consensus conference to evaluate current practice and identify key questions toward optimizing methotrexate use in the clinic. *J. European Academy of Dermatol. and Venerol.* 25, 758–764.
- Bawle E.V., Conard J.V., Weiss L.* (1998) Adult and two children with fetal methotrexate syndrome. *Teratology* 57(2), 51–55.
- Benedict W.F., Banerjee A., Gardner A., Jones P.A.* (1977) Induction of morphological transformation in mouse C3H/10T% clone 8 cells and chromosomal damage in hamster A (T1)Cl-3 cells by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 37, 2202–2208.
- BEN VENUE LABORATORIES, INC. Safety Data Sheet. [http://www.bedfordlabs.com/content/dam/internet/opu/bedfordlabs/com_EN/documents/products/Methotrexate/MethotrxateRev307].
- Berner-Strzelczyk A.* (2012) Leki wziewne – zalety i wady. *Aptekarz Polski* 75/53 [online].
- Bischoff K.B., Dedrick R.L., Zaharko O.S.* (1970) Preliminary model for methotrexate pharmacokinetics. *J. Pharm. Sei.* 59, 149–154.
- Blackburn W.K., Alarcon G.S.* (1989) Impotence in three rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 32, 13412.
- Bleyer W.A.* (1977) Methotrexate: clinical pharmacology, current status and therapeutic guidelines. *Cancer Treat Rev.* 4, 87–101.
- Borsi J.D., Sagen E., Romslo I., Moe P.J.* (1990) Comparative study of the pharmacokinetics of 7-hydroxymethotrexate after administration of methotrexate in the dose range of 0.5 g to 33.5 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med. Pediatr. Oncol.* 18, 217.
- Breithaupt H., Kuenzlen E.* (1982) Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate following infusions of high-dose methotrexate. *Cancer Treat Rep.* 66(9), 1733–41.
- Bremnes R.M., Smeland E., Huseby N.E., Eide T.J., Aarbakke J.* (1991) Acute hepatotoxicity after high-dose methotrexate administration to rats. *Pharmacol. Toxicol.* 69, 132.
- Brumen V., Horvat D.* (1996) Work environment influence on cytostatics-induced genotoxicity in oncologic nurses. *Am. J. Ind. Med.* 30, 67–71.
- Buckley L.M., Bullaboy C.A., Leichtman L., Marquez M.* (1997) Multiple congenital anomalies associated with weekly lowdose methotrexate treatment of the mother. *Arthritis Rheum* 40(5), 971–973.
- Burgaz S., Karahalil B., Canh Z., Ancel G., Anzion R.B.M., Bos R.P., Huttner E.* (2002) Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. *Human & Experimental Toxicology* 21, 129–135.
- Calvert A.H., Bondy P.K., Harrap K.R.* (1977) Some observations on the human pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat. Rep.* 61, 1647–1656.

- Chabner B.A., Myers C.E., Coleman C.N., Johns D.G. (1975) The clinical pharmacology of antineoplastic agents (first of two parts.) *New Eng. J. Med.* 292, 1107–1113.
- Chamberlin A.A., Cheung A.P.K., Lim P. (1976) Methotrexate [W:] Analytical profiles of drug substances. New York, Academic Press vol. 5, 283–306.
- Chatterjee D.J., Li W.Y., Koda R.T. (1997) Effects of vehicles and penetration enhancers on the in vitro and in vivo percutaneous absorption of methotrexate and edatrexate through hairless mouse skwsp. *Pharm. Res.* 14(8) 1058–65.
- Chelab K.G., Majeed S. Kh. (2009) Methotrexate-induced histopathological changes in the kidneys of mice. *Iraqi J. Vet. Sci.* 23 suppl. II, 219–222.
- Chu W.C., Hon C.Y., Danyluk Q., Chua P.P.S., Astrakianakis G. (2011) Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. *J. Oncol. Pharm. Practice* 18(1) 46–51.
- Clarysse A.M., Cathey W.J., Cartwright G.E., Wintrobe M.M. (1969) Pulmonary disease complicating intermittent therapy with methotrexate. *J. Am. Me. Assoc.* 209, 1861–1864.
- Cohn J.R., Cohn J.B., Fellin F., Cantor R. (1993) Systemic anaphylaxis from low dose methotrexate. *Ann. Alergy* 70, 384–5.
- Collins K., Aspey H., Todd A., Satavanan V., Rynne M., Kelly C. (2008) Methotrexate pneumonitis precipitated by switching from oral to parenteral administration. *Rheumatology* 47, 109–110.
- Corona-Rivera J.R., Rea-Rosas A., Santana-Ramirez A., Costa-Leon J., Hernandez-Rocha J., Miguel-Jimenez K. (2010) Holoprosencephaly and genitourinary anomalies in fetal methotrexate syndrome. *Am. J. Med. Genet A.* 152A(7), 1741–1746.
- Craig S.A., Rosenberg E.W. (1971) Methotrexate-induced carcinoma? *Arch. Dermatol.* 103, 505–506.
- Criswell K.A., Krishna G., Zielinski D., Urda G.A., Juneau P., Bulera S., Bleavins M.R. (2003) Validation of a flow cytometric acridine orange micronuclei methodology in rats. *Mutat. Res.* 25, 528(1–2), 1–18.
- Custer A.P., Freeman-Narrod M., Narrod S.A. (1977) Hepatotoxicity in Wistar rats following chronic methotrexate administration. A model of human reaction. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1011–1017.
- Davis H.L. Jr, Prout M.N., McKenna P.J., Cole D.R., Korbitz B.C. (1973) Acute leukemia complicating metastatic breast cancer. *Cancer* 31, 543–546.
- Del Campo M., Kosaki K., Bennett F.C., Jones K.L. (1999) Developmental delay in fetal aminopterin/methotrexate syndrome. *Teratology* 60(1), 10–12.
- Delmonte L., Jukes T.H. (1962) Folic acid antagonists in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Rev.* 14, 91–135.
- Deng H., Zhang M., He J., Wu W., Jin L., Zheng W., Lou J., Wang B. (2005) Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points. *Mutagenesis* 20(5), 351–357.
- DeSesso J.M., Jordan R.L. (1977) Drug-induced limb dysplasias in fetal rabbits. *Teratology* 15, 199–212.
- De Werk Neal A., Wadden R.A., Chiou W.I. (1983) Exposure of hospital workers to airborne antineoplastic agents. *Am. J. Hosp. Pharm.* 40, 597–601.
- Diniz E.M., Corradini H.B., Ramos J.L., Brock R. (1978) Efeitos sobre o conceito do metotrexato (ametopterina) administrado a mae. Apresentacao de caso. [Effect, on the fetus, of methotrexate (amethopterin) administered to the mother. Presentation of a case]. *Rev. Hosp. Ciwsp. Fac. Med. Sao Paulo* 33(6), 286–290.
- EBEWE (2007) Charakterystyka produktu leczniczego Methotrexat-Ebewe. 7.12.2007.
- Eherts D. (2004) Control banding from the pharma perspective. Staying ahead of the regulation, society of chemical hazard communication. SCHC FALL 2004 Meeting, October 26–27, Arlington, VA.
- El-Beheiry A., El-Mansy E., Kamel N., Salama N. (1979) Methotrexate and fertility in men. *Arch. Androl.* 3(2), 177–179.
- Epstein E.H., Jr. Croft J.O. (1969) Cirrhosis following methotrexate administration for psoriasis. *Arch. Dermatol.* 100, 531–534.
- Epstein S.S., Arnold E., Andrea J., Bass W., Bishop Y. (1972) Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 288–325.
- Ercan I., Cakir B.O., Basak T., Ozbal E.A., Sahin A., Balci G., Turgut S. (2006) Effects of topical application of methotrexate on nasal mucosa in rats. A preclinical assessment study. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 13, 751–755.
- Erttmann R., Bielack S., Landbeck G. (1985) Kinetics of 7-hydroxymethotrexate after high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 15, 101.
- Feldkamp M., Care J.C. (1993) Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology* 47, 533–539.

- Ferguson F.C., Jr. Thiersch J.B., Philips F.S. (1950) The action of 4-amino-N10-methylpteroylglutamic acid in mice, rats, and dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 98, 293–299.
- Fermion Oy, Safety Data Sheet (2013) Finlandia [<http://www.fermion.fi/Global/Fermion/Ferminon%20uusi%20verkkosivu/MSDS/Methotrexate%20diNa>].pdf.
- Flament-Durand J., Ketelbant-Balasse P., Maurus R., Regnier A., Spehl M. (1975) Intracerebral calcifications appearing during the course of acute lymphocytic leukemia treated with methotrexate and X rays. *Cancer* 35, 319–325.
- Fransman W., Huizer D., Tuerk J., Kromhout H. (2007) Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80, 396–403.
- Florida L., Pietropaolo A.M., Tavazzani M., Rubino F.M., Colombi A. (1999) High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure. *J. Chromatography B* 726, 95–103.
- Freeman-Narrod M., Narrod S., Custer A.P. (1974) Toxicity of methotrexate in C57/BI mice. In fluence of tolerance and age (abstract 2093). *Fed. Proc.* 33, 582.
- Friese C.R., Himes-Ferris L., Frasier M.N., McCullagh M., Griggs J. (2012) Structures and processes of care in ambulatory oncology settings and nurse-reported exposure to chemotherapy. *BMJ Qual. Sa.* 21, 753–759.
- Fuskevåg O.M., Kristiansen C., Lindal S., Aarbakke J. (2000) Maximum tolerated doses of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in a model of acute toxicity in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46, 69–73.
- Galwas M., Pośniak M. (2006) Kryteria oceny narażenia zawodowego na niebezpieczne substancje farmaceutyczne. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 2(52), 5–16.
- GESTIS-Stoffdatenbank.: 4-Amino-N10-methylpteroylglutamic acid. IFA [[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/490067.xml?f=templates\\$fn=document-frameset.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/490067.xml?f=templates$fn=document-frameset.htm$3.0)].
- Gilani S.T.A., Khan D.A., Khan F.A., Ahmed M. (2012) Adverse effects of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J. of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 22(2) 101–104.
- Granzow J.W., Thaller S.R., Panthaki Z. (2003) Cleft palate and toe malformations in a child with fetal methotrexate exposure. *J. Craniofac. Surg.* 14(5), 747–748.
- Greenspan E.M., Tung B.G. (1974) Acute myeloblastic leukemia after cure of ovarian cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 230, 418–420.
- Grunnet E., Nyfors A., Hansen K.B. (1977) Studies of human semen in topical corticosteroid-treated and in methotrexate-treated psoriatics. *Dermatologica* 154(2), 78–84.
- Gunther Ev. (1970) Andrologische Untersuchungen bei der Antimetabolietherapie der Psoriasis. *Dermatol. Monatsschrift.* 156, 498–502.
- Gutin P.H., Green M.R., Bleyer W.A., Bauer V.L., Wiernik P.H., Walker M.D. (1976) Methotrexate pneumonitis induced by intrathecal methotrexate therapy. A case report with pharmacokinetic data. *Cancer* 38, 1529–1534.
- Jackson Re., Harrap K.R. (1973) Studies with a mathematical model of folate metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 827–841.
- Johns D.G., Loo T.L. (1967) Metabolite of 4-amino-4-deoxy-N10-methylpteroylglutamic acid (methotrexate). *J. Pharm. Sci.* 56, 356–359.
- Hampel K.E., Kober B., Rösch O., Gerhartz H., Meinig K.H. (1966) The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro (preliminary communication). *Blood* 27(6), 816–823.
- Hansen J., Olsen J.H. (1994) Cancer morbidity among Danish female pharmacy technicians. *Scand. J. Work Environ. Health* 20(1) 22–6A.
- Harris C.C. (1971) Malignancy during methotrexate and steroid therapy for psoriasis. *Arch. Dermatol.* 103, 501–504.
- Harrison B.R. (2001) Risks of handling cytotoxic drugs [W:] The chemotherapy source book [Red.] M.C. Perry. 3rd ed. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams and Wilkins 566–582.
- Health Council of the Netherlands (2011) Methotrexate. Evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. Subcommittee on the classification of reproduction toxic substances, a committee of the health council of the Netherlands. Publication nr 2011/24. ISBN 978-90-5549-856-7. Haga, The State Secretary of Social Affairs and Employment.
- Henderson E.S., Adamson R.H., Denham C., Oliverio V.T. (1965) The metabolic fate of tritiated methotrexate. I absorption, excretion, and distribution in mice, rats, dogs and monkeys. *Cancer Res.* 25(7), 1008–1017.
- Herbold B., Buselmaier W. (1976) Induction of point mutations by different chemical mechanisms in the liver microsomal assay. *Mutat. Res.* 40, 73–84.

- Hersh E.M., Wong V., Henderson E.S., Rubin R. (1964) The acute hepatotoxic effects of methotrexate (MTX) therapy (abstract 101). Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 5, 26.
- Hlaing M., Malik U.F., Powell D. (2010) Methotrexate induced hypersensitivity pneumonitis. Review of literature with case report. Revista Romana de Reumatologie 19(1), 57–59.
- HSDB, Hazardous Substance Data Bank (2010).
- Hyoun S.C., Obican S.G., Scialli A.R. (2012) Teratogen update. Methotrexate. Birth defects research (part A) 94, 187–207.
- IARC, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (1981) Lyon, Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, vol. 26.
- Ibsen H.H. (1997) Methotrexat og graviditet. Ugeskr. Laeger 159(41), 6081–6083.
- Jacobs S.A., Stoller R.G., Chabner B.A., Johns D.G. (1917) Dose-dependent metabolism of methotrexate in man and rhesus monkeys. Cancer Treat. Rep. 61, 651–656.
- Johns D.G., Rutherford L.D., Leighton P.C., Vogel C.L. (1972) Secretion of methotrexate into human milk. Am. J. Obstet. Gynecol. 112(7), 978–980.
- Jolly L.E., Jr. Fletcher H.P. (1917) The effect of repeated oral dosing of methotrexate on its intestinal absorption in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 39, 23–32.
- Johnson F.E., Farr S.A., Mawad M., Woo Y.C. (1994) Testicular cytotoxicity of intravenous methotrexate in rats. J. Surg. Oncol. 55(3), 175–178.
- Jordan R.L. (1973) Response of the rabbit embryo to methotrexate (abstract). Teratology 7, A–19.
- Jordan R.L., Wilson J.G., Schumacher H.J. (1977) Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. Teratology 15, 73–80.
- Kasahara Y., Nakai Y., Miura D., Yagi K., Hirabayashi K., Makita T. (1992) Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatments of methotrexate. Mutat. Res. 280(2), 117–28.
- Kaslow R.A., Wisch N., Glass J.L. (1972) Acute leukemia following cytotoxic chemotherapy. J. Am. Med. Assoc. 219, 75–76.
- Keshava C., Keshava N., Whong W.Z., Nath J., Ong T.M. (1998) Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by folic acid in V79 cells. Mutat. Res. 2, 397(2), 221–228.
- Kevekordes S., Gebel T.W., Hellwig M., Dames W., Dunkelberg H. (1998) Human effect monitoring in cases of occupational exposure to antineoplastic drugs. A method comparison. Occup. Environ. Med. 55, 145–149.
- Koehler M., Koehler B. (1988) The effects of long term methotrexate therapy on the gonadal function and morphology. Endokrynol. Pol. 39(1), 33–40.
- Kremer J.M., Lee J.K. (1986) The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 29, 822–831.
- Kremer J.M., Phelps C.T. (1992) Long-term prospective study of the use of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Update after a mean of 90 months. Arthritis Rheum 35, 138–145.
- Kremer J.M. (2004) Toward a better understanding of methotrexate. Arthritis Rheum 50, 1370–82.
- Kremer J.M. (1997) Safety, efficacy, and mortality in a long-term cohort of patients with rheumatoid arthritis taking methotrexate: followup after a mean of 13.3 years. Arthritis Rheum 40, 984–985.
- Khera K.S. (1976) Teratogenicity studies with methotrexate, aminopterin, and acetylsalicylic acid in domestic cats. Teratology 14, 21–28.
- Krahenmann F., Ostensen M., Stallmach T., Huch A., Chaoui R. (2002) In utero first trimester exposure to lowdose methotrexate with increased fetal nuchal translucency and associated malformations. Prenat. Diagn. 22(6), 489–490.
- Kroese W.F.S. (1975) Cytostatic drugs [W:] Meyler's side effects of drugs. A survey of unwanted effects of drugs reported in 1972-1975 [Red.] M.N.G. Dukes. Amsterdam, Excerpta Medica vol. 8, 939–999.
- Krogh Jensen M. (1967) Chromosome studies in patients treated with azathioprine and amethoptersp. Acta Med. Scand. 182, 445–455.
- Krogh Jensen M., Nyfors A. (1979) Cytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo. Comparison between results obtained by chromosome studies on bone-marrow cells and blood lymphocytes and by the micronucleus test. Mutat. Res. 64, 339–343.
- Kromhout H., Hoek F., Uitterhoeve R., Huijbers R. (2000) Postulating a dermal pathway for exposure to antineoplastic drugs among hospital workers. Applying a conceptual model to the results of three workplace surveys. Ann. Occup. Hyg. vol. 44, 7, 551–560.
- Kung F.T., Chang S.Y., Tsai Y.C., Hwang F.R., Hsu T.Y., Soong Y.K. (1997) Subsequent reproduction and obstetric outcome after methotrexate treatment of cervical pregnancy. A review of original literature and international collaborative follow-up. Hum. Reprod. 12(3), 591–595.
- Lewis W.J., Walter J.F. (1979) Methotrexate-induced pulmonary fibrosis. Arch. Dermatol. 115, 1169–1170.

- Levin L.I., Holly E.A., Seward J.P. (1993) Bladder cancer in a 39-year-old female pharmacist. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85(13), 1089–1091.
- Li F.P., Cassady J.R., Jaffe N. (1975) Risk of second tumors in survivors of childhood cancer. *Cancer* 35, 1230–1235.
- Lloyd M.E., Carr M., McElhatton P., Hall G.M., Hughes R.A. (1999) The effects of methotrexate on pregnancy, fertility and lactation. *QJM* 92, 55163.
- Lu G., Jun H.W., Suh H. (1997) Percutaneous absorption and disposition studies of methotrexate in rabbits and rats. *Biopharm Drug Dispos.* 18(5) 409–22.
- Luch-Bernal M.L., Cuesta-Herranz J., De Las Heras M., De Figueredo E., Umpierrez A., Fernandez M., Novalbos A., Casimiro C., Sastre J. (1997) Anaphylactic reaction to methotrexate. *Allergy* 52, 1150–1151.
- Mader R.M., Rizovski B., Steger G.G., Wachter A., Kotz R., Rainer H. (1996) Exposure of oncologic nurses to methotrexate in the treatment of osteosarcoma. *Arch. Environ. Health* 51(4), 310–314.
- Maier P., Schmid W. (1976) Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 40, 325–388.
- Mallipattu S.K., Ross M.J. (2011) Methotrexate in urine. *Kidney International* 80, 226, 2 [].
- Martindale, The extra pharmacopoeia (1977) [Red.] A. Wade. 27th ed., London, The Pharmaceutical Press 156–161.
- Martinez Lopez J.A., Loza E., Carmona L. (2009) Systematic review on the safety of methotrexate in rheumatoid arthritis regarding the reproductive system (fertility, pregnancy, and breastfeeding). *Clwsp. Exp. Rheumatol.* 27(4), 678–684.
- Matheson O., Brusick D., Carrano R. (1978) Comparison of the relative mutagenic activity for eight antineoplastic drugs in the Ames Salmonella/microsome and TK[±] mouse lymphoma assays. *Drug Chem. Toxicol.* 1, 277–304.
- Matsui H., Iitsuka Y., Suzuka K., Yamazawa K., Tanaka N., Seki K. (2003) Risk of abnormal pregnancy completing chemotherapy for gestational trophoblastic tumor. *Gynecol. Oncol.* 88(2), 104–107.
- McCormick J., Susten S.S., Rader J., Freisheim J.H. (1979) Studies of a methotrexate binding protein fraction from L1210 lymphocyte plasma membranes. *Eur. J. Cancer*, 15, 1377–1386.
- McCulloch J.L., Snyder D.S., Weinstein G.D., Friedland A., Stein B. (1976) Factor affecting human percutaneous penetration of methotrexate and its analogues in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 66, 103–107.
- McKenna K.E., Burrows D. (2000) Pulmonary toxicity in a patient with psoriasis receiving methotrexate therapy. *Clwsp. Experimental. Dermatol.* 25, 24–27.
- Mcglashan A.J., Strong R.S., Middlemiss D., Hayes A.G., David A., Vodden M. (2007) Patent WO2007057714A2. Pharmaceutical compositions comprising methotrexate. *Maj* 2007[<http://www.google.com/patents/WO2007057714A2?cl=en>].
- Medical research council working party on leukaemia in childhood (1975) Analysis of treatment in childhood leukaemia. 1. Predisposition to methotrexate-induced neutropenia after craniospinal irradiation. *Br. Med. J.* 11, 563–566.
- Meditext – medical management (2014). Methotrexate and related agents. Thomson Reuters Inc. All Rights Reserved Data Base. 1987–2014.
- Meijster T., Fransman W., Veldhof R., Kromhout H. (2006) Exposure to antineoplastic drugs outside the hospital environment. *Ann. Occup. Hyg.* 50(7) 657–664.
- Melnyk J., Duffy D.M., Sparkes R.S. (1971) Human mitotic and meiotic chromosome damage following in vivo exposure to methotrexate. *Clwsp. Genet.* 2, 28–31.
- Merger D., Tanguay C., Langlois E., Lefebvre M., Bussièrès J.-F. (2013) Environmental contamination with methotrexate in Canadian community pharmacies. *J. Am. Pharm. Assoc.* 53, 423–426.
- Międzynarodowe Stowarzyszenie Farmaceutów Producentów, IACP-The International Academy of Compounding Pharmacists (2003) Hazard Alert. Compounding with Hazardous and/or Potent Pharmaceuticals, International Academy of Compounding Pharmacists.
- Milunsky A., Graef J.W., Gaynor M.F. Jr. (1968) Methotrexate-induced congenital malformations. With a review of the literature. *J. Pediatr.* 72, 790–795.
- Molin L., Larse T.E. (1972) Psoriasis, methotrexate, and cancer. *Arch. Dermatol.* 105, 292.
- Muller S.A., Farrow G.M., Martalock D.L. (1969) Cirrhosis caused by methotrexate in the treatment of psoriasis. *Arch. Dermatol.* 100, 523–530.
- Naumann B.D., Sargent E.V., Starkman B.S., Fraser W.J., Becker G.T., Kirk G.D. (1996) Performance-based exposure control limits for pharmaceutical active ingredients. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 57(1), 33–42.
- Newbold P.C.H., Stoughton R.B. (1972) Percutaneous absorption of methotrexate. *J. Invest. Dermatol.* 58, 319–322.
- Nguyen C., Duhl A.J., Escallon C.S., Blakemore K.J. (2002) Multiple anomalies in a fetus exposed

- to low-dose methotrexate in the first trimester. *Obstet. Gynecol.* 99(4), 599–602.
- NIOSH Alert (2004) Preventing occupational exposures to antineoplastics and other hazardous drugs in health care settings. Department of health and human services. Center for disease control and prevention NIOSH. Cincinnati, OH 45226–1998. Publication Number 2004–165. September 2004 [NIOSH Web site at www.cdc.gov/niosh].
- NIOSH List of Antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings (2012). Department of health and human services. Center for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health.
- NTP, Chemical repository methotrexate (1991) Radian Corporation, August 29.
- Ohbayashi M., Suzuki M., Yashiro Y., Fukuwaka S., Yasuda M., Kohyama N., Kobayashi Y., Yamamoto T.* (2010) Induction of pulmonary fibrosis by methotrexate treatment in mice lung in vivo and in vitro. *J. Toxicol. Sci.* 35 (5), 653–661.
- OSHA (1988) Methotrexate [<https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/partial/pv2146/pv2146>] (pdf).
- OSHA(2006) (Occupational Safety and Health Administration). United States Department of Labour. Methotrexate Health Factors. [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_250840.html].
- Padmanabhan S., Tripathi D.N., Vikram A., Ramarao P., Jena G.B.* (2008) Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat. Res.* 655(1–2), 59–67.
- Penn L., Starzl T.E.* (1973) The effect of immunosuppression on cancer [W:] Proceedings of the 7th National Cancer Conference. Philadelphia, Lippincott 943–947.
- Pethran A., Schierl R., Hauff K., Grimm C.-H., Boos K.-S., Nowak D.* (2003) Uptake of anti-neoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part 1. Monitoring of urinary concentrations. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76, 5–10.
- Pfizer (2012) Material safety data sheet methotrexate. United Kingdom Ver. 2.0 13.03.2012 [http://www.pfizer.com/sites/default/files/products/material_safety_data/PZ00130] pdf.
- Pfizer (2011) Product monograph. Methotrexate. Pfizer, Canada Inc. Quebec.
- Polovich M., Giesecker E.* (2011) Occupational hazardous drug exposure among non-oncology nurses. *Medsurg. Nursing* 20(2), 79–86.
- Powell H.R., Ekert H.* (1971) Methotrexate-induced congenital malformations. *Med. J. Aust.* 2, 1076–1077.
- Propping P., Röhrbor G., Buselmaier W.* (1972) Comparative investigations on the chemical induction of point mutations and dominant lethal mutations in mice. *Mol. Gen. Genet.* 117, 197–209.
- Pucci E., Matozzo F., Luppi P., Micoli G., Sottani C., Minoia C., Sandrini G., Nappi G.* (2005) La Cefalea sintomo „sentinella” nel personale addetto alla preparazione e somministrazione di chemioterapici antitumorali [Headache as “sentinel” symptom in personnel involved in the preparation and administration of antineoplastic drugs.]. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 27(4) 412–416.
- Robinson J.W.L., Antonioli J.-A., Vannotti A.* (1966) The effect of oral methotrexate on the rat intestine. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1479–1489.
- Rees R.B., Bennett J.H., Maibach H.L., Arnold H.L.* (1967) Methotrexate for psoriasis. *Arch. Dermatol.* 95, 2–11.
- Regelson W., Bross L.O., Hananian J., Nigogosya G.* (1965) Incidence of second primary tumors in children with cancer and leukemia. A seven-year survey of 150 consecutive autopsied cases. *Cancer* 18, 58–72.
- Ringrose C.A.D.* (1974) Carcinoma in situ of the cervix after amethopterin therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 119, 1132–1133.
- Roenigk H.H., Jr. Bergfeld W.F., St Jacques R., Owens F.J., Hawk W.A.* (1971) Hepatotoxicity of methotrexate in the treatment of psoriasis. *Arch. Dermatol.* 103, 250–261.
- Rombaldi F., Cassini C., Salvador M., Saffi J., Erdtmann B.* (2009) Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis* 24(2), 143–148.
- Roschlau G., Justus J.* (1971) Carcinogenic action of methotrexate and cyclophosphamide in animal experiments (Ger.) *Dtsch. Gesundheitswes.* 26, 219–222.
- Ross G.T.* (1976) Congenital anomalies among children born to mothers receiving chemotherapy for gestational trophoblastic neoplasm. *Cancer* 37, 1043–1047.
- RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (2010).
- Rubino F.M., Florida L., Pietropaolo A.M., Tavazani M., Colombi A.* (1999) Measurement of surface contamination by certain antineoplastic drugs using high-performance liquid chromatography. Applications in occupational hygiene investigations in hospital environment. *Med. Lav.* 90(4), 572–583.
- Rustia M., Shubik P.* (1973) Life-span carcinogenicity tests with 4-amino-N10-methylpteroylglutamic acid (methotrexate) in Swiss mice and Syrian

- golden hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 329–338.
- Rustin G.J., Booth M., Dent J., Salt S., Rustin F., Bagshawe K.D.* (1984) Pregnancy after cytotoxic chemotherapy for gestational trophoblastic tumours. *Br. Med. J. (Clin Res Ed)* 288(6411), 103–106.
- Ruymann F.B., Mosijczuk A.D., Sayers R.J.* (1977) Hepatoma in a child with methotrexate-induced hepatic fibrosis. *J. Am. Med. Assoc.* 238, 2631–2633.
- Sabatini L., Barbieri A., Lodi V., Violante F.S.* (2012) Biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs in hospital settings. *Med. Lav.* 103(5), 394–401.
- Saigal S., Singh R.K., Podda B.* (2012) Acute methotrexate toxicity presenting as multiorgan failure and acute pneumonitis. A rare case report. *Ind. J. Crittical. Care Medicine* 16(4) 225–227.
- Salliot C., van der Heijde D.* (2009) Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis. A systematic literature research. *Ann. Rheum Dis.* 68, 1100–1104.
- Santa Cruz Biotechnology, Inc. Safety Data Sheet [<http://datasheets.scbt.com/sc-3507>] (pdf).
- Scherf H.R., Schmähl D.* (1975) Experimental investigations on immunodepressive properties of carcinogenic substances in male Sprague-Dawley rats. *Recent Results Cancer Res.* 52, 76–87.
- Selevan S.G., Lindbohm M.L., Hornung R.W., Hemminki K.* (1985) A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. *N. Engl. J. Med.* 313, 1173–1178.
- Schmähl D., Habs M.* (1976) Life-span investigations for carcinogenicity of some immune-stimulating, immunodepressive and neurotropic substances in Sprague-Dawley rats. *Z. Krebsforsch.* 86, 77–84.
- Schmahl D., Osswald H.* (1970) Experimental studies on carcinogenic effects of anticancer chemotherapeutics and immunosuppressives (Ger.). *Arzneimittel-Forsch./Drug Res.* 20, 1461–1467.
- Schröter R., Kelleter R., Kuhn D.* (1971) Reticulosis as a long-term side-effect of methotrexate therapy in a patient with generalized psoriasis and psoriatic arthritis. *Dermatologica* 143, 131–136.
- Schöning FW.* (1967) Teratospermie nach Verabreichung von Methotrexat. (Teratospermia after administration of methotrexate). *Z Haut Geschlechtskr* 42(8), 271–275.
- Scott W.J., Wilson J.G., Ritter E.J., Fradkin R.* (1978) Further studies on distribution of teratogenic drugs in pregnant rats and rhesus monkeys. [W:] Role of pharmacokinetics in prenatal and perinatal toxicology. [Red.] O. Neubert, H.-J. Merker, H. Nau, J. Langman. Stuttgart, Georg Thieme 499–505.
- Seino Y., Nagao M., Yahag T., Hoshi A., Kawachi T., Sugimura T.* (1978) Mutagenicity of several classes of antitumor agents to *Salmonella typhimurium* T A98, TA 100, and T A92. *Cancer Res.* 38, 2148–2156.
- Sessink P., Anzion R.B., van der Broek P., Bos R.P.* (1992) Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific ed.* 14(1) 16–22.
- Sessink P.J.M., Friemel N.S.S., Anzion R.B.M., Bos R.P.* (1994) Biological and environmental monitoring of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to methotrexate. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 401–403.
- Sessink P.J.M., Wittenhorst B.C.J., Anzion R.B.M., Bos R.P.* (1997) Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents. Reevaluation after additional protective measures. *Arch. Environ. Health* 52(3) 240–245.
- Shaik M.S., Haynes A., McSween J., Ikediobi O., Kanikkannan N., Singh M.* (2002) Inhalation delivery of anticancer agents via HFA-based metered dose inhaler using methotrexate as a model drug. *J. Aerosol. Med.* Fall 15(3), 261–70.
- Shahin A.A., Ismail M., Saleh A.M., Moustafa H.A., Aboul-Ella A.A., Gabr H.M.* (2001) Protective effect of folinic acid on low-dose methotrexate genotoxicity. *Z Rheumatol.* 60(2), 63–8.
- Shamberger R.C., Rosenberg S.A., Seipp C.A., Sherins R.J.* (1981) Effects of high-dose methotrexate and vincristine on ovarian and testicular functions in patients undergoing postoperative adjuvant treatment of osteosarcoma. *Cancer Treat. Rep.* 65, 739–746.
- Shehata W.M., Meyer R.L.* (1980) The enhancement effect of irradiation by methotrexate. Report of three complications. *Cancer* 46, 1349–1352.
- Skalko R.G., Gold M.P.* (1974) Teratogenicity of methotrexate in mice. *Teratology* 9, 159 The Hague 164.
- Skov T., Maarup B., Olsen J., Rorth M., Winthereik H., Lynge E.* (1992) Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Brit. J. Ind. Med.* 49 855 The Hague 861.
- Smeland E., Bremnes R.M., Andersen A., Jaeger R., Eide T.J., Huseby N.E., Aarbakke J.* (1994) Renal and hepatic toxicity after high-dose 7-hydroxymethotrexate in the rat. *Cancer. Chemother Pharmacol* 34, 119.
- Smeland E., FuskevaĖg O.M., Nymann K., Svendsen J.S., Olsen R., Lindal S., Bremnes R.M., Aarbakke J.* (1996) High-dose 7-hydroxymethotrexate. Acute toxicity and lethality in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol* 37, 415–422.

- Stefanowicz J., Rückemann-Dziurdzińska K., Owczuk R., Maciejka-Kapuścińska L., Balcerska A. (2011) Co wiemy o nefrotoksyczności metotreksatu u dzieci? *Forum Nefrologiczne* 4(1), 20–25.
- Stewart W.D., Wallace S.M., Runikis J.O. (1972) Absorption and local action of methotrexate in human and mouse skwsp. *Arch. Dermatol.* 106, 357–361.
- Strum W.B., Liem H.H. (1977) Hepatic uptake, intracellular protein binding and biliary excretion of amethopterswsp. *Biochem. Pharmacol.* 26, 1235–1240.
- Stuart J.F.B., Calman K.C., Watters J., Paxton J., Whiting B., Lawrence J.R., Steele W.H., McVie J.G. (1979) Bioavailability of methotrexate: implications for clinical use. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 3, 239–241.
- Summary of internal OEL for cytotoxic drugs (2012) [W:] Safety and health handbook for cytotoxic drugs. Murff SJ. Government Institutes 2012.
- Sutton L., Swinehart J.W., Allen C., Kaplan A.S. (2001) A clinical study to determine the efficacy and safety of 1% methotrexate/Azone (MAZ) gel applied topically once daily with patients with psoriasis vulgaris. *Int. J. Dermatol.* 40, 464–7.
- Świerkot J., Sokolik R., Gruszecka-Marczyńska K., Międzybrodzki R., Szechiński J. (2008) Skuteczność leczenia i występowanie działań niepożądanych w trakcie terapii metotreksatem podawanym doustnie i podskórnie chorym na reumatoidalne zapalenie stawów. *Reumatologia* 46(6), 322–329.
- Tavassoli F.A., Lynch R.G. (1974) Occult adenocarcinoma of the pancreas in a 17-year-old patient with immunosuppressed leukemia. *Gastroenterology* 66, 1054–1057
- The Merck Index (1976) [Red.] M. Windholz. 9th ed., Rahway, NJ, Merck & Co. 782.
- Trier J.S. (1961) Morphologic changes in human small intestinal mucosa induced by methotrexate (abstract 282). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 273.
- Turci R., Sottani C., Ronchi A., Minoia C. (2002) Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicol. Letters* 134 57–64.
- U.S. Pharmacopeia. Safety Data Sheet [<http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1414003.pdf>].
- U.S. EPA, Estimation Programs Interface (EPI), ver. 3.11. U.S. EPA version for Windows. Washington, DC: U.S. EPA (2003). Available from, as of Dec. 15, 2004 [<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.html>].
- Valanis B.G., Vollmer W.M., Labuhn K.T., Glass A.G. (1993) Association of antineoplastic drug handling with acute adverse effects in pharmacy personnel. *American Journal of Health-System Pharmacy* March 1, 50(3) 455–462.
- Valanis B.G., Vollmer W.M., Labuhn K.T., Glass A.G. (1993b) Acute symptoms associated with antineoplastic drug handling among nurses. *Cancer Nursing* 16(4) 288–295.
- Valanis B., Vollmer W., Labuhn K., Glass A. (1997) Occupational exposure to antineoplastic agents and self-reported infertility among nurses and pharmacists. *J. Occup. Environ. Med.* 39(6), 574–580.
- Vogl S.E. (1978) Acute leukemia complicating treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer* 41, 333–336.
- van Scott E.J., Reinertson R.P. (1959) Morphologic and physiologic effects of chemotherapeutic agents in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 33, 357–369.
- van Swelm R., Laarakkers C., Kooijmans-Otero M., de Jong E., Masereeuw R., Russel F. (2013) Biomarkers for methotrexate-induced liver injury. Urinary protein profiling of psoriasis patients. *Toxicol. Letters* 221 219–224.
- van Thiel D.H., Ross G.T., Lipsett M.B. (1970) Pregnancies after chemotherapy of trophoblastic neoplasms. *Science* 169, 1326–1327.
- Vega A., Cabanas R., Contreras J. (1994) Anaphylaxis to methotrexate. A possible IgE-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94, 268–70.
- Voorhees J.J., Janzen M.K., Harrell E.R., Chakrabarti S.G. (1969) Cytogenetic evaluation of methotrexate-treated psoriatic patients. *Arch. Dermatol.* 100, 269–274.
- Walden P.A.M., Bagshawe K.O. (1976) Reproductive performance of women successfully treated for gestational trophoblastic tumors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125, 1108–1114.
- Walusiak-Skorupa J., Wągrowaska-Koski E., Pałczyński C. (2003) Ocena skutków zdrowotnych zawodowej ekspozycji na cytotatyki u personelu medycznego w świetle obowiązującej profilaktyki. Badanie przekrojowe. *Medycyna Pracy* 53(3) 229–236.
- Walusiak-Skorupa J., Wągrowaska-Koski E., Pałczyński C. (2009) Cytostatyki. Narażenie zawodowe. Skutki zdrowotne. Profilaktyka. Orzecznictwo. Łódź, IMP wyd. III.
- Walusiak-Skorupa J., Wągrowaska-Koski E. (2008) Zasady postępowania przy stosowaniu leków cytotatycznych. *Praca i Zdrowie* 3, 38–40.

- Weisburger E.K.* (1977) Bioassay program for carcinogenic hazards of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer* 40, 1935–1949.
- Wick C., Slawson M.H., Jorgenson J.A., Tyler L.S.* (2003) Using a closed-system protective device to reduce personnel exposure to antineoplastic agents. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 60, 2314–2320.
- Wilson J.G.* (1971) Use of rhesus monkeys in teratological studies. *Fed. Proc.* 30, 104–109.
- Wilson J.G.* (1974) Teratologie causation in man and its evaluation in non-human primates. *Excerpta Medica Int. Congr. Ser.* 310, 191.
- Wilson J.G., Scott W.J., Ritter E.J., Fradkin R.* (1979) Comparative distribution and embryotoxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology* 19, 71–80.
- Wong L.S., Tymms K.E., Buckley N.A.* (2009) Potential for methotrexate exposure through contamination during parenteral use as an immunosupresant. *Int. Med. J.* 39, 379–383.
- Woolas R.P., Bower M., Newlands E.S., Seckl M., Short D., Holden L.* (1998) Influence of chemotherapy for gestational trophoblastic disease on subsequent pregnancy outcome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105(9), 1032–1035.
- Zaharko O.S., Dedrick R.L., Young D.M., Peale A.L.* (1976) Tolerance of long-term methotrexate infusions by mice. *Biochem. Pharmacol.* 25, 1317–1321.
- Ziegler E., Mason H.J., Baxter P.J.* (2002) Occupational exposure to cytotoxic drugs in two UK oncology wards. *Occup. Environ. Med.* 59, 608–612.