Agnieszka Mołoń[1], Marek Cieśla[2]

Mechanizmy działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych z uwzględnieniem zmian epigenetycznych

1. Wstęp

Metotreksat (MTX) pozostaje jednym z podstawowych leków modyfikujących przebieg choroby w reumatoidalnym zapaleniu stawów oraz innych chorobach autoimmunologicznych i zapalnych, mimo szerokiej dostępności leków biologicznych i syntetycznych leków celowanych. Jego utrwalona pozycja kliniczna wynika z potwierdzonej skuteczności, dobrze scharakteryzowanego profilu bezpieczeństwa, relatywnie niskiego kosztu terapii oraz zdolności do wzmacniania działania wielu terapii skojarzonych. W nowoczesnym ujęciu MTX nie jest już traktowany wyłącznie jako klasyczny antyfolian. Lek ten jest uznawany za środek o wielopoziomowym działaniu metabolicznym, immunomodulacyjnym oraz częściowo epigenetycznym, co wyjaśnia jego trwałe znaczenie w leczeniu chorób autoimmunologicznych i zapalnych [1, 2].

Pierwotnie metotreksat został opracowany jako lek przeciwnowotworowy, a jego klasyczne działanie wiązano z hamowaniem reduktazy dihydrofolianowej i wtórnym ograniczeniem syntezy puryn oraz tymidylanu [3]. Jednak mechanizm odpowiedzialny za skuteczność niskodawkowego MTX w chorobach autoimmunologicznych nie może być wyjaśniony wyłącznie przez efekt antyproliferacyjny. Wcześniejsze analizy mechanistyczne wykazały, że działanie przeciwzapalne MTX nie ogranicza się jedynie do wpływu na metabolizm folianów. Lek zwiększa także dostępność adenozyny i moduluje sygnalizację cytokinową. Dodatkowo wpływa na adhezję i migrację leukocytów oraz na funkcjonowanie komórek efektorowych i regulatorowych układu odpornościowego [2, 4]. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na udział mechanizmów epigenetycznych w patogenezie RZS i w odpowiedzi na leczenie. Współczesne przeglądy epigenetyki RZS podkreślają znaczenie zaburzeń metylacji DNA, modyfikacji histonów oraz regulacji przez niekodujące RNA w utrzymywaniu przewlekłego zapalenia, aktywacji fibroblastopodobnych synowiocytów, deregulacji limfocytów T i B oraz utracie tolerancji immunologicznej. W tym kontekście MTX coraz częściej rozpatrywany jest jako lek zdolny nie tylko do tłumienia zapalenia, ale również do częściowej reprogramacji patologicznych programów ekspresji genów, choć siła dowodów dla tej części mechanizmu nadal jest mniejsza niż dla osi adenozynowej [5, 6].

Celem niniejszego opracowania jest krytyczne omówienie aktualnej wiedzy dotyczącej działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli epigenetyki. Zasadniczym pytaniem nie jest już bowiem to, czy MTX działa, lecz w jaki sposób stosunkowo prosty chemicznie lek uzyskuje trwały

[1] agmolon@ur.edu.pl, Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej i Epigenetyki Klinicznej, Wydział Medyczy, Uniwersytet Rzeszowski, www.ur.edu.pl.
[2] mciesla@ur.edu.pl, Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej i Epigenetyki Klinicznej, Wydział Medyczy, Uniwersytet Rzeszowski, www.ur.edu.pl.

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

efekt kliniczny w złożonych chorobach immunozapalnych. Odpowiedź na to pytanie wymaga połączenia farmakologii wewnątrzkomórkowej, immunobiologii tkanek objętych zapaleniem, danych z modeli komórkowych i tkanek pierwotnych oraz obserwacji z badań klinicznych i epigenomowych.

2. Metodyka przeglądu piśmiennictwa

Niniejsze opracowanie przygotowano w formie narracyjnego przeglądu literatury z elementami uporządkowanego wyszukiwania publikacji. Strategię identyfikacji źródeł opracowano zgodnie z zasadami przejrzystego raportowania, odwołując się do wytycznych PRISMA 2020 jako standardu opisu metod przeglądów literaturowych [7]. Wyszukiwanie literatury przeprowadzono w bazach PubMed/MEDLINE, Scopus oraz Web of Science Core Collection, a uzupełniająco wykorzystano Google Scholar do identyfikacji dodatkowych publikacji istotnych dla tematu. Analizie poddano publikacje opublikowane do 7 kwietnia 2026 r. Zastosowano kombinacje słów kluczowych i operatorów logicznych obejmujące terminy: „methotrexate", „rheumatoid arthritis", „psoriasis", „psoriatic arthritis", „juvenile idiopathic arthritis", „inflammatory bowel disease", „epigenetic", „epigenetics", „DNA methylation", „histone modification", „microRNA", „miRNA", „lncRNA", „regulatory T cells", „FOXP3", „adenosine" oraz „one-carbon metabolism". Do analizy włączano prace oryginalne, badania translacyjne, prace na materiale klinicznym i komórkach pierwotnych, liniach komórkowych oraz artykuły przeglądowe, jeżeli wnosiły istotne dane mechanistyczne lub syntetyzowały aktualny stan wiedzy. Wykluczono streszczenia konferencyjne bez pełnej publikacji, duplikaty, opisy przypadków bez wartości mechanistycznej oraz prace niezwiązane bezpośrednio z mechanizmem działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych. Przegląd obejmuje 48 unikatowych publikacji: 7 artykułów przeglądowych, 28 prac oryginalnych oraz 13 publikacji o charakterze ogólnobiochemicznym, metodologicznym lub translacyjnym, wspierających interpretację metabolizmu folianów, szlaków jednowęglowych i mechanizmów epigenetycznych. Wśród analizowanych publikacji 8 dotyczyło bezpośrednio zagadnień epigenetycznych, a 6 koncentrowało się na klasycznych mechanizmach farmakologicznych i immunologicznych działania metotreksatu.

3. Farmakologia metotreksatu: transport komórkowy, poliglutamylacja i dystrybucja wewnątrzkomórkowa

Skuteczność MTX zależy od kilku następujących po sobie etapów farmakologicznych, obejmujących transport do komórki, retencję wewnątrzkomórkową oraz konwersję do aktywnych form poliglutamylowanych [8]. Metotreksat jest hydrofilnym analogiem folianu i przedostaje się do komórek głównie z udziałem transportera zredukowanych folianów, a także innych układów transportowych uczestniczących w wychwycie folianów. Po wniknięciu do komórki ulega poliglutamylacji, która ma zasadnicze znaczenie dla jego farmakodynamiki, ponieważ zwiększa czas pozostawania leku w komórce oraz jego powinowactwo do enzymów docelowych. W praktyce oznacza to, że aktywność biologiczna MTX w chorobach zapalnych zależy bardziej od jego metabolitów wewnątrzkomórkowych niż od chwilowego stężenia leku w osoczu [1, 2]. Poliglutamylowane pochodne MTX hamują nie tylko reduktazę dihydrofolianową, ale również inne enzymy zależne od folianów, w tym syntazę tymidylanową oraz AICAR transformylazę. Szerszy profil enzymatyczny MTX tłumaczy, dlaczego niskie dawki leku są przeciwzapalne

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

mimo suplementacji kwasem foliowym, która zmniejsza toksyczność, ale nie znosi działania klinicznego. Oznacza to, że w immunologii klinicznej nie można redukować działania MTX do prostego modelu blokady DHFR, ponieważ jego aktywność ma charakter sieciowy i obejmuje powiązane szlaki metabolizmu jednowęglowego i purynowego [1, 9].

Z translacyjnego punktu widzenia szczególnie istotny jest fakt, że stopień poliglutamylacji oraz zdolność poszczególnych typów komórek do akumulacji aktywnych metabolitów mogą wpływać na heterogeniczność odpowiedzi terapeutycznej. To częściowo tłumaczy, dlaczego wyniki uzyskiwane w prostych modelach *in vitro* nie zawsze odpowiadają obserwacjom klinicznym u pacjentów. Krótkotrwałe hodowle komórkowe, zwłaszcza oparte na pojedynczym typie komórek, nie odtwarzają w pełni dynamiki poliglutamylacji, lokalnej produkcji adenozyny ani złożonych interakcji między komórkami immunologicznymi i zrębem zapalnym. Ta rozbieżność jest dziś istotnym argumentem za korzystaniem z modeli współhodowli, materiału pochodzącego od pacjentów i analiz single-cell [10-12].

Warto podkreślić, że ten farmakologiczny poziom działania leku nie jest jedynie technicznym wstępem do dalszych rozważań. To właśnie tutaj powstaje biologiczny fundament dla późniejszych efektów immunologicznych i epigenetycznych. Bez odpowiednio długiej retencji wewnątrzkomórkowej, bez skutecznego hamowania ATIC i bez przebudowy przepływu metabolitów w cyklu jednowęglowym trudno zrozumieć zarówno klasyczny efekt adenozynowy, jak i bardziej subtelne, długotrwałe zmiany transkrypcyjne obserwowane w limfocytach regulatorowych czy w sygnaturach metylacyjnych pacjentów odpowiadających na leczenie.

4. Klasyczne mechanizmy działania metotreksatu

4.1. Hamowanie szlaku folianowego

Klasyczne ujęcie działania MTX wywodzi się z jego strukturalnego podobieństwa do kwasu foliowego. Metotreksat konkurencyjnie hamuje reduktazę dihydrofolianową, prowadząc do zmniejszenia dostępności tetrahydrofolianu, a w konsekwencji do ograniczenia syntezy puryn i tymidylanu [13]. Mechanizm ten ma zasadnicze znaczenie w onkologii, gdzie wysokie dawki MTX prowadzą do zahamowania proliferacji szybko dzielących się komórek. Jednak w chorobach autoimmunologicznych sytuacja jest bardziej złożona. MTX, stosowany w małych dawkach i podawany co tydzień, nie powoduje wysokiej cytotoksyczności, a jego efekt terapeutyczny zwykle utrzymuje się mimo suplementacji folianów. Wskazuje to, że hamowanie DHFR jest elementem ważnym, ale niewystarczającym do pełnego wyjaśnienia mechanizmu przeciwzapalnego [2, 4]. Współczesne interpretacje sugerują, że znaczenie antyfolianowe MTX w immunologii klinicznej należy rozumieć raczej jako zaburzenie szerszego systemu metabolizmu jednowęglowego niż jako prostą blokadę jednego enzymu. Zmiana dostępności pochodnych folianów wpływa na syntezę nukleotydów, transmethylację, metabolizm aminokwasów siarkowych oraz wtórnie na stan funkcjonalny komórek immunologicznych [14]. Tym samym klasyczny mechanizm antyfolianowy staje się punktem wyjścia dla kolejnych, bardziej złożonych następstw metabolicznych i regulacyjnych, które ujawniają się w środowisku przewlekłego zapalenia [1, 9].

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

4.2. Oś ATIC-AICAR-adenozyna

Za najlepiej udokumentowany mechanizm przeciwzapalny niskodawkowego MTX uważa się obecnie wpływ na oś ATIC–AICAR–adenozyna (5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleotyd transformylaza-5-aminoimidazol-4-karboksamidrybonukleotyd-adenozyna). Hamowanie AICAR transformylazy prowadzi do akumulacji AICAR, który wtórnie zaburza rozkład adenozyny i sprzyja wzrostowi jej stężenia w przestrzeni pozakomórkowej. Adenozyna działa następnie jako silny endogenny mediator przeciwzapalny, oddziałując na receptory adenozynowe obecne na neutrofilach, monocytach, makrofagach, komórkach śródbłonka i limfocytach [15]. Ten model mechanistyczny został ugruntowany zarówno przez badania eksperymentalne, jak i późniejsze prace przeglądowe, które konsekwentnie wskazują, że wzrost sygnalizacji adenozynowej jest centralnym elementem działania MTX w zapalnych chorobach stawów [2, 16]. Znaczenie adenozyny polega nie tylko na bezpośrednim tłumieniu produkcji cytokin prozapalnych, ale również na modulacji zachowania komórek efektorowych w miejscu zapalenia. Aktywacja receptorów A2A i A3 wiąże się z hamowaniem aktywacji neutrofili, ograniczeniem ekspresji cząsteczek adhezyjnych, spadkiem produkcji TNF, IL-1β i IL-6 oraz przesunięciem profilu odpowiedzi w stronę bardziej przeciwzapalną. W konsekwencji MTX działa nie tyle jako klasyczny supresor odpomości, ile jako lek przywracający bardziej fizjologiczną kontrolę nad nasileniem odpowiedzi zapalnej. Ten sposób działania dobrze tłumaczy, dlaczego MTX może prowadzić do klinicznej poprawy bez wywoływania głębokiej immunoablacji charakterystycznej dla niektórych terapii silnie cytotoksycznych [15, 17].

4.3. Wpływ na transmetylację i gospodarkę jednowęglową

Kolejnym istotnym wymiarem klasycznego działania MTX jest wpływ na gospodarkę jednowęglową. Obejmuje ona reakcje metaboliczne przenoszące pojedyncze atomy węgla, niezbędne do syntezy nukleotydów, aminokwasów oraz metylacji DNA, RNA i białek, co reguluje funkcje komórkowe i ekspresję genów. Poprzez zaburzenie metabolizmu folianów MTX może zmieniać dostępność S-adenozylometioniny (SAM), głównego donora grup metylowych, oraz stosunek SAM do S-adenozylhomocysteiny (SAH), kluczowy dla sprawności reakcji metylacji.

Już wcześniejsze koncepcje mechanistyczne wskazywały, że ten aspekt działania MTX ma znaczenie nie tylko metaboliczne, lecz także regulacyjne. Zaburzenia transmetylacji wpływają na syntezę poliamin, aktywność enzymów oraz wzorce ekspresji genów [18, 19]. W świetle nowszych badań związek między metabolizmem jednowęglowym a działaniem epigenetycznym MTX staje się szczególnie interesujący. Zmiany w potencjale metylacyjnym komórki mogą przekładać się na metylację DNA, modyfikacje histonów i stabilność programów transkrypcyjnych w komórkach odpornościowych. Dlatego nawet klasyczny, metaboliczny efekt MTX należy obecnie traktować jako punkt wyjścia dla wtórnych zmian epigenetycznych, które mogą współdecydować o trwałości odpowiedzi klinicznej. Ten pomost między antyfolianowym działaniem leku a epigenetyką stanowi jeden z głównych kierunków współczesnej reinterpretacji mechanizmu działania MTX [5, 20-22].

4.4. Modulacja cytokin, adhezji komórkowej i odpowiedzi immunologicznej

Poza wpływem na foliany i adenozynę MTX moduluje także zachowanie wielu populacji komórek odpornościowych. W przeglądach mechanistycznych podkreśla się jego zdolność do ograniczania aktywacji limfocytów T, hamowania wytwarzania media-

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

torów prozapalnych przez monocyty i makrofagi, zmniejszania ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz wpływu na funkcję komórek śródbłonka. W efekcie dochodzi do osłabienia rekrutacji leukocytów do ogniska zapalenia i zmniejszenia nasilenia lokalnej odpowiedzi zapalnej. Jest to szczególnie istotne w RZS, gdzie przewlekły stan zapalny jest podtrzymywany przez współdziałanie komórek immunologicznych, synowiocytów i śródbłonka naczyń [2, 23, 24]. Jednocześnie badania translacyjne sugerują, że nie wszystkie efekty obserwowane u pacjentów dają się łatwo odtworzyć w prostych modelach komórkowych. Prace nad limfocytami T regulatorowymi pokazały jednak, że istnieją mechanizmy, w których obserwacja *in vitro*, *ex vivo* i kliniczna układają się w spójną sekwencję biologiczną. Najlepszym przykładem jest przywracanie funkcji Treg przez demetylację regionu regulatorowego FOXP3 u pacjentów z RZS leczonych MTX. Odkrycie to nie zastępuje klasycznych mechanizmów działania leku, lecz je uzupełnia, pokazując, że modulacja odpowiedzi immunologicznej może być utrwalana przez zmiany epigenetyczne w populacjach regulatorowych [24-26].

5. Działanie metotreksatu w wybranych chorobach autoimmunologicznych i zapalnych

Zrozumienie działania metotreksatu w kontekście poszczególnych jednostek chorobowych wymaga uwzględnienia różnic w architekturze odpowiedzi immunologicznej, dominujących szlakach cytokinowych oraz charakterystyce mikrośrodowiska zapalnego. Chociaż podstawowe mechanizmy działania MTX, takie jak modulacja osi adenozynowej i wpływ na metabolizm jednowęglowy, pozostają wspólne, ich znaczenie funkcjonalne różni się w zależności od choroby. To właśnie ta zależność od kontekstu tkankowego i komórkowego jest jedną z przyczyn, dla których MTX bywa bardzo skuteczny w jednych wskazaniach, a umiarkowanie skuteczny lub mniej przewidywalny w innych.

W reumatoidalnym zapaleniu stawów metotreksat wykazuje najlepiej udokumentowaną skuteczność kliniczną, co wynika z jego zdolności do jednoczesnego oddziaływania na wiele elementów patogenezy choroby. RZS charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem błony maziowej, w którym uczestniczą zarówno komórki układu odpornościowego, jak i fibroblastopodobne synowiocyty o cechach agresywnego, utrwalonego fenotypu prozapalnego. Metotreksat prowadzi do zmniejszenia liczby komórek zapalnych w tkance maziowej oraz ograniczenia ekspresji mediatorów zapalnych, co zostało wykazane w badaniach histologicznych i molekularnych [27]. Jednocześnie klasyczne modele *in vitro* wskazują, że bezpośredni wpływ MTX na synowiocyty jest ograniczony, co sugeruje, że główny efekt terapeutyczny wynika z modulacji układu odpornościowego i środowiska zapalnego, a nie z bezpośredniego działania cytotoksycznego na zrąb maziowy [2, 28]. Istotnym elementem działania MTX w RZS jest także przywracanie równowagi między limfocytami efektorowymi a regulatorowymi. Wykazano, że leczenie MTX zwiększa funkcję limfocytów T regulatorowych poprzez mechanizmy epigenetyczne, co może mieć znaczenie dla trwałości odpowiedzi terapeutycznej. Z perspektywy translacyjnej RZS pozostaje zatem nie tylko głównym wskazaniem klinicznym dla MTX, ale również najważniejszym modelem biologicznym do badania tego, jak klasyczny lek przeciwzapalny może wpływać na długoterminową architekturę odpowiedzi immunologicznej [24, 26].

W łuszczycy i łuszczycowym zapaleniu stawów znaczenie MTX wynika z jego wpływu zarówno na proliferację keratynocytów, jak i na szlaki immunologiczne związane

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

z osią IL-23/Th17. Choroby te różnią się od RZS dominacją odpowiedzi typu Th17 oraz silnym komponentem skórnym. Metotreksat ogranicza proliferację komórek naskórka oraz zmniejsza aktywność limfocytów T produkujących IL-17, co przekłada się na redukcję zmian skórnych i objawów stawowych. Jednak skuteczność MTX w łuszczycowym zapaleniu stawów jest bardziej zmienna niż w klasycznym RZS, co może wynikać z większej heterogeniczności patogenezy tej choroby i odmiennego znaczenia poszczególnych szlaków cytokinowych [29].

W młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów MTX pozostaje standardem terapii, choć jego działanie jest modulowane przez czynniki rozwojowe oraz odmienną dynamikę układu odpornościowego u dzieci. Różnice farmakokinetyczne oraz czynniki genetyczne i epigenetyczne mogą wpływać na poziom aktywnych metabolitów MTX oraz odpowiedź terapeutyczną, co podkreśla znaczenie badań farmakogenetycznych i farmakoepigenetycznych w tej grupie pacjentów. Z tego punktu widzenia pediatryczne zastosowania MTX są szczególnie interesujące, ponieważ pozwalają analizować działanie leku w organizmie o innej immunologicznej trajektorii rozwojowej niż u dorosłych z RZS [30].

W chorobach zapalnych jelit metotreksat wykazuje skuteczność głównie w chorobie Leśniowskiego-Crohna, jednak jego rola jest ograniczona w porównaniu do RZS. Odmienność patogenezy, obejmująca silny wpływ mikrobioty oraz interakcje z nabłonkiem jelitowym, sprawia, że efekty MTX są mniej przewidywalne. Niemniej jednak jego działanie immunomodulacyjne, w tym wpływ na cytokiny i limfocyty T, pozostaje istotne. To porównanie między RZS a IBD uwidacznia ważną zasadę ogólną: skuteczność MTX zależy nie tylko od jego własnej farmakologii, ale także od tego, czy dominujące w danej chorobie sieci zapalne są podatne na wygaszanie przez osie adenozynowe, antyfolianowe i regulatorowe uruchamiane przez lek [31, 32].

6. Podstawy epigenetyki w zapaleniu i autoimmunizacji

Epigenetyka stanowi kluczowy poziom regulacji ekspresji genów w komórkach układu odpornościowego i odgrywa fundamentalną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Mechanizmy epigenetyczne umożliwiają komórkom dynamiczną adaptację do bodźców środowiskowych bez zmiany sekwencji DNA, co jest szczególnie istotne w kontekście przewlekłego zapalenia, gdzie utrwalone zmiany ekspresji genów mogą podtrzymywać proces chorobowy przez długi czas, nawet przy zmiennej sile bodźca inicjującego. Właśnie dlatego epigenetyka stanowi tak atrakcyjny pomost między wpływem środowiska, metabolizmem i utrwalonym fenotypem komórek immunologicznych [5, 33]. Metylacja DNA pozostaje jednym z najważniejszych mechanizmów epigenetycznych. Polega ona na przyłączaniu grup metylowych do cytozyn w regionach CpG i prowadzi zazwyczaj do represji transkrypcji lub do zmiany dostępności określonych loci dla czynników transkrypcyjnych. W RZS obserwuje się hipometylację promotorów genów prozapalnych, co skutkuje ich nadekspresją i utrzymaniem aktywnego fenotypu zapalnego. Zmiany te obejmują geny kodujące cytokiny, czynniki transkrypcyjne oraz białka związane z migracją komórek, różnicowaniem efektorowym i utrzymywaniem przewlekłego zapalenia w błonie maziowej i krwi obwodowej [32].

Modyfikacje histonów, takie jak acetylacja i metylacja, regulują dostępność chromatyny i wpływają na ekspresję genów. W chorobach autoimmunologicznych obserwuje się zwiększoną acetylację histonów w regionach genów prozapalnych, co sprzyja ich

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

aktywacji. Zaburzenia aktywności enzymów epigenetycznych, takich jak deacetylazy histonowe czy metylotransferazy histonowe, prowadzą do utrwalenia stanu zapalnego i wzmacniają długofalową aktywację komórek. W praktyce oznacza to, że przewlekłe zapalenie nie jest jedynie stanem funkcjonalnym, lecz może prowadzić do częściowego „przeprogramowania" komórek układu odpornościowego i tkanek docelowych [34, 35].

Istotną rolę odgrywają także mikroRNA i inne niekodujące RNA. MikroRNA regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym i uczestniczą w kontroli odpowiedzi immunologicznej. Deregulacja miR-146a i miR-155 została szeroko opisana w RZS i wiąże się z nadmierną aktywacją szlaków zapalnych. Z kolei lncRNA, w tym lincRNA-p21, okazują się nie tylko markerami choroby, lecz także aktywnymi regulatorami osi NF-κB i odpowiedzi stresowej komórki. Właśnie ten ostatni element ma szczególne znaczenie dla zrozumienia działania MTX, ponieważ dostarcza mechanistycznego połączenia między lekiem a epigenetyczną regulacją transkrypcji w komórkach pacjentów z RZS [36, 37].

7. Metotreksat a epigenetyka

Coraz więcej danych wskazuje, że metotreksat wywiera istotny wpływ na epigenom komórek układu odpornościowego, co stanowi potencjalne wyjaśnienie jego długotrwałego działania przeciwzapalnego oraz heterogenicznej odpowiedzi klinicznej. W przeciwieństwie do efektów metabolicznych, które są szybkie i odwracalne, zmiany epigenetyczne mogą prowadzić do trwałej przebudowy funkcji komórkowych. W tym kontekście MTX można postrzegać jako lek, który integruje krótkoterminowe efekty metaboliczne z długoterminową regulacją epigenetyczną, choć należy zachować ostrożność i nie utożsamiać jeszcze tego modelu z pełnym, definitywnie udowodnionym mechanizmem dominującym [2, 5, 38].

Kluczowym elementem łączącym działanie MTX z epigenetyką jest jego wpływ na metabolizm jednowęglowy, który odpowiada za produkcję S-adenozylometioniny, głównego donora grup metylowych w komórce. Poprzez hamowanie enzymów zależnych od folianów metotreksat prowadzi do zmniejszenia dostępności SAM oraz zwiększenia poziomu S-adenozylhomocysteiny, która działa jako inhibitor reakcji metylacji. Zmiana stosunku SAM do SAH wpływa bezpośrednio na aktywność DNA metylotransferaz i enzymów modyfikujących histony, co może prowadzić do globalnych oraz lokalnych zmian metylacji DNA. W konsekwencji dochodzi do modulacji ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź zapalną, proliferację oraz przeżycie komórek. Co istotne, efekt ten nie jest jedynie konsekwencją metaboliczną, lecz potencjalnym mechanizmem regulacyjnym, który może prowadzić do częściowego resetowania patologicznych wzorców ekspresji genów obserwowanych w chorobach autoimmunologicznych [5, 39, 40]. Badania epigenomowe wykazały, że leczenie MTX wiąże się ze zmianami metylacji DNA w komórkach krwi obwodowej oraz w specyficznych populacjach limfocytów. Nair i in. wykazali, że różnice w metylacji DNA korelują z odpowiedzią na leczenie u pacjentów z RZS, co sugeruje, że epigenom może odzwierciedlać zarówno stan choroby, jak i skuteczność terapii [21]. Adams i in. rozszerzyli te obserwacje, wskazując na komórkowo specyficzny charakter tych zmian. Oznacza to, że globalna analiza metylacji w całej krwi może maskować istotne zmiany zachodzące w konkretnych subpopulacjach komórek, takich jak limfocyty T CD4+ czy monocyty. Istotne jest również to, że zmiany metylacji mogą pojawiać się stosunkowo wcześnie po rozpoczęciu terapii i potencjalnie

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

poprzedzać poprawę kliniczną, co czyni je obiecującymi biomarkerami odpowiedzi [41]. Jednym z najlepiej udokumentowanych mechanizmów epigenetycznych działania MTX jest jego wpływ na limfocyty T regulatorowe. W pracy Cribbs i in. wykazano, że metotreksat przywraca funkcję Treg u pacjentów z RZS poprzez demetylację regionu regulatorowego genu FOXP3, co prowadzi do zwiększenia jego ekspresji oraz stabilizacji fenotypu komórek regulatorowych. FOXP3 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym determinującym funkcję Treg, a jego ekspresja zależy od stanu metylacji DNA. Demetylacja regionów regulatorowych FOXP3 prowadzi do trwałej aktywacji genu i zwiększenia zdolności supresyjnych tych komórek. Mechanizm ten ma fundamentalne znaczenie dla przywracania tolerancji immunologicznej i ograniczania przewlekłego zapalenia. Co istotne, efekt ten został potwierdzony zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *ex vivo* u pacjentów, co stanowi jeden z najlepiej udokumentowanych przykładów translacyjnego działania epigenetycznego MTX [25].

Drugim bardzo interesującym epigenetyczno-transkrypcyjnym wątkiem jest wpływ MTX na lincRNA-p21. Spurlock i in. wykazali, że u chorych na RZS obniżone poziomy lincRNA-p21 są powiązane ze zwiększoną aktywnością NF-κB, natomiast MTX obniża podstawową aktywność tego szlaku właśnie poprzez indukcję lincRNA-p21 zależną od DNA-PKcs. Oznacza to, że MTX oddziałuje nie tylko na poziomie metabolitów i metylacji DNA, lecz także na poziomie niekodującego RNA regulującego kluczowy czynnik zapalny [37]. Z punktu widzenia biologii choroby ten mechanizm jest szczególnie atrakcyjny, ponieważ łączy obserwowaną klinicznie skuteczność leku z centralnym szlakiem transkrypcyjnym RZS oraz z warstwą regulacji epigenetyczno-transkrypcyjnej.

Na poziomie szerszego tła choroby współczesne przeglądy epigenetyki RZS podkreślają, że w patogenezie uczestniczą zmiany metylacji DNA, acetylacji i metylacji histonów oraz regulacja przez miRNA i lncRNA. W związku z tym działanie MTX na potencjał metylacyjny komórki, szlaki zapalne oraz populacje regulatorowe może przekładać się na wielowarstwowy efekt epigenetyczny. Nadal jednak liczba badań mechanistycznych jest mniejsza niż w przypadku klasycznej osi adenozynowej, a wyniki są częściowo heterogeniczne z powodu różnic w materiale biologicznym, czasie pobrania próbek, stadium choroby i stosowanych metodach analizy. Dlatego obecny stan wiedzy bardziej uzasadnia model istotnego udziału epigenetyki w działaniu MTX niż stwierdzenie, że jest to przede wszystkim lek epigenetyczny [5].

8. Farmakoepigenetyka metotreksatu: predykcja odpowiedzi i toksyczności

Zmienność odpowiedzi na metotreksat pozostaje jednym z największych wyzwań klinicznych, ponieważ znaczna część pacjentów nie osiąga pełnej remisji lub nie uzyskuje optymalnej odpowiedzi w przewidywanym czasie. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie wykorzystaniem epigenetyki w przewidywaniu skuteczności terapii. Badania wskazują, że różnice w metylacji DNA oraz profilach miRNA mogą odzwierciedlać zarówno aktywność choroby, jak i odpowiedź na leczenie. Wzorce epigenetyczne mogą być wykorzystywane do identyfikacji pacjentów, którzy odniosą największą korzyść z terapii MTX, zanim jeszcze ujawni się pełny efekt kliniczny [21].

Farmakoepigenetyka MTX jest szczególnie atrakcyjna dlatego, że może łączyć trzy poziomy informacji. Po pierwsze, może odzwierciedlać wyjściowy stan biologiczny chorego, czyli czy jego układ immunologiczny znajduje się w konstelacji zmian bardziej podatnych na działanie MTX. Po drugie, może wychwytywać wczesne skutki działania

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

leku, zanim zmniejszenie DAS28 czy poprawa w obrazowaniu staną się oczywiste. Po trzecie, może umożliwiać stratifikację toksyczności, o ile uda się zidentyfikować stabilne sygnatury metylacyjne lub profile ncRNA związane z hepatotoksycznością, mielosupresją czy nietolerancją leczenia. Na obecnym etapie ten trzeci obszar jest słabiej rozwinięty niż predykcja skuteczności, ale kierunek badań jest wyraźny i zgodny z szerszym trendem medycyny precyzyjnej [21, 42, 43].

Szczególne znaczenie ma obserwacja, że odpowiedź na MTX wydaje się być silniej związana z komórkowo swoistymi zmianami epigenetycznymi niż z uśrednionym sygnałem całej krwi. To przesuwa ciężar badań z prostych modeli biomarkerowych w stronę bardziej złożonych strategii obejmujących dekonwolucję sygnału, sortowanie komórek, analizy single-cell oraz integrację epigenomu z transkryptomem i metabolomem. W praktyce oznacza to, że użyteczny klinicznie biomarker odpowiedzi na MTX może w przyszłości nie być pojedynczym locus metylacyjnym, lecz wielowymiarowym modelem predykcyjnym integrującym kilka warstw danych biologicznych [44, 45].

9. Ograniczenia obecnych badań i kierunki przyszłych prac

Pomimo znacznego postępu badania nad epigenetycznym działaniem metotreksatu napotykają liczne ograniczenia. Heterogeniczność populacji pacjentów, różnice w stadium choroby, wcześniejszym leczeniu, aktywności zapalnej, czasie pobrania materiału i metodologii analitycznej utrudniają porównywanie wyników między badaniami. Dodatkowo większość analiz opiera się na materiale z krwi pełnej lub niesortowanych PBMC, co może maskować zmiany zachodzące w specyficznych populacjach komórek. To szczególnie istotne w przypadku RZS, gdzie różne populacje, takie jak Treg, Th17, monocyty czy FLS, pełnią odmienne role patogenetyczne i mogą różnie odpowiadać na leczenie [45, 47].

Drugim ograniczeniem jest rozbieżność między modelami *in vitro* a danymi klinicznymi. W klasycznych badaniach na fibroblastopodobnych synowiocytach wykazano, że MTX nie wywiera silnego bezpośredniego wpływu na ekspresję genów degradujących macierz, mimo wyraźnej poprawy klinicznej u pacjentów, co sugerowało, że lek działa przede wszystkim pośrednio przez układ odpornościowy i środowisko zapalne. Z kolei nowsze modele współhodowli synowiocytów z aktywowanymi komórkami PBMC pokazały, że MTX samodzielnie ma jedynie umiarkowany efekt hamujący produkcję cytokin w porównaniu z glikokortykosteroidami, a jego działanie w pełni ujawnia się dopiero w bardziej złożonym kontekście komórkowym. Oznacza to, że przyszłość badań nad MTX wymaga odchodzenia od uproszczonych systemów monocelularnych na rzecz modeli lepiej odtwarzających rzeczywiste mikrośrodowisko zapalne [10, 37, 47].

W przyszłości kluczowe znaczenie będą miały badania wykorzystujące technologie single-cell oraz integrację danych multi-omics, które pozwolą na dokładniejsze zrozumienie działania MTX na poziomie komórkowym i molekularnym. Szczególnie potrzebne są badania łączące metylom, chromatynę, ncRNA i transkryptom z dokładnie scharakteryzowanymi danymi klinicznymi oraz oceną farmakokinetyki i poliglutamylacji leku. Równie istotne będzie rozwijanie modeli translacyjnych opartych na tkankach pacjentów, współhodowlach wielokomórkowych, organoidach maziowych i podejściach *in situ*. Tylko takie strategie pozwolą odpowiedzieć na pytanie, które zmiany epigenetyczne są przyczynowo związane z działaniem MTX, a które stanowią jedynie wtórny ślad wygaszania zapalenia.

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

10. Dyskusja

Obecnie najbardziej produktywnym podejściem do analizy działania metotreksatu nie jest traktowanie mechanizmów klasycznych i epigenetycznych jako odrębnych lub konkurencyjnych, lecz rozpatrywanie ich jako kolejne, hierarchicznie powiązane poziomy tego samego zjawiska biologicznego. MTX zaczyna działać jako lek metaboliczny. Zmienia przepływ przez szlaki folianowe i purynowe, prowadzi do akumulacji adenozyny, zmniejsza natężenie sygnalizacji zapalnej i osłabia rekrutację komórek efektorowych. Jednak jeśli poprawa kliniczna ma być trwała, musi dojść do czegoś więcej niż tylko przejściowej zmiany stężenia mediatorów. Właśnie tutaj pojawia się epigenetyka jako potencjalny mechanizm utrwalający nowy stan układu immunologicznego. W tej perspektywie MTX nie jest alternatywnie lekiem antyfolianowym albo epigenetycznym, lecz lekiem metaboliczno-epigenetycznym, w którym pierwszy poziom działania toruje drogę drugiemu.

Na tym tle szczególne znaczenie mają badania translacyjne, które wykraczają poza proste hodowle komórkowe. Klasyczne modele FLS odegrały ważną rolę, ale pokazały też ograniczenia: nie tłumaczą pełnej skali poprawy klinicznej, ponieważ nie odtwarzają całego układu interakcji immunologiczno-zrębowych. Dopiero badania na tkankach maziowych pacjentów, modele współhodowli z PBMC oraz analizy *ex vivo* komórek od chorych ujawniły, że MTX zmienia nie tyle jeden typ komórki, ile całą architekturę odpowiedzi zapalnej. To tłumaczy, dlaczego wyniki z prostych modeli *in vitro* bywają „zbyt słabe" względem efektu klinicznego. Lek działa w sieci biologicznej, a nie w izolacji.

Najsilniejszym argumentem za rzeczywistym, a nie wyłącznie hipotetycznym znaczeniem epigenetyki w mechanizmie MTX pozostaje oś FOXP3-Treg. Praca Cribbs i in. jest tutaj szczególnie ważna, ponieważ pokazuje ciągłość od poziomu molekularnego, przez funkcję komórkową, po zjawisko kliniczne. Demetylacja regionu regulatorowego FOXP3 i odzyskanie funkcji supresyjnej Treg stanowią przykład, w którym zmiana epigenetyczna nie jest tylko biernym markerem, lecz ma wyraźny sens biologiczny i immunologiczny. To właśnie tego typu dowody powinny stać się wzorem dla kolejnych badań nad metylacją DNA, histonami czy ncRNA w odpowiedzi na MTX.

Równie interesujący jest wątek lincRNA-p21 i NF-κB, ponieważ pokazuje, że MTX może wpływać na aparat transkrypcyjny zapalenia przez niekodujące RNA. O ile oś adenozynowa tłumaczy dobrze szybkie efekty przeciwzapalne, o tyle mechanizmy związane z lncRNA i metylacją DNA mogą lepiej tłumaczyć trwałość odpowiedzi, przywracanie równowagi między efektorami i regulatorami oraz obserwowaną heterogeniczność odpowiedzi. W praktyce klinicznej pacjenci nie różnią się tylko „ilością zapalenia", ale także architekturą molekularną swojej odpowiedzi immunologicznej. To właśnie tutaj farmakoepigenetyka może w przyszłości zmienić MTX z leku podawanego sekwencyjnie metodą prób i błędów w lek wdrażany bardziej precyzyjnie u tych chorych, których profil biologiczny zapowiada skuteczność i akceptowalne ryzyko działań niepożądanych.

Najnowsze przeglądy z 2025 roku wzmacniają tę interpretację, ale jednocześnie nakazują metodologiczną ostrożność. Huang i in. oraz Cai i in. pokazują, jak szeroki jest krajobraz epigenetyczny RZS i jak wiele mechanizmów może potencjalnie współuczestniczyć w odpowiedzi na leczenie. Z drugiej strony te same prace wyraźnie podkreślają, że pole to jest nadal na etapie intensywnego mapowania, a nie zamkniętej syntezy przyczynowej. Najbardziej przekonujące będą zatem te przyszłe badania, które połączą

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

projekt prospektywny, dobrze scharakteryzowaną kohortę pacjentów, materiał komórkowo swoisty, dane o poliglutamylacji i farmakokinetyce oraz analizę wielowarstwową obejmującą metylację DNA, chromatynę i ekspresję ncRNA. Dopiero wtedy będzie można z większą pewnością rozdzielić epigenetyczne przyczyny odpowiedzi od jej wtórnych śladów.

W tym sensie metotreksat pozostaje lekiem „starym" tylko z punktu widzenia daty wprowadzenia do terapii. Z perspektywy biologii układu odpornościowego jest nadal lekiem nowym, ponieważ jego pełny mechanizm działania nie został jeszcze w całości domknięty. Co więcej, może on stanowić wzorcowy przykład tego, jak klasyczny lek małocząsteczkowy modyfikuje nie tylko biochemię komórki, ale też jej pamięć regulacyjną. To sprawia, że MTX pozostaje nie tylko filarem terapii, ale też jednym z najciekawszych modeli do badania tego, jak metabolizm, zapalenie i epigenetyka splatają się w chorobach autoimmunologicznych.

11. Wnioski końcowe

Metotreksat jest lekiem o złożonym i wielopoziomowym mechanizmie działania, który obejmuje integrację procesów metabolicznych, immunologicznych i epigenetycznych. Jego skuteczność kliniczna wynika nie tylko z tłumienia odpowiedzi zapalnej, ale także z jej długotrwałej reprogramacji. Najlepiej udokumentowany pozostaje wpływ na oś ATIC–AICAR–adenozyna, jednak rosnąca liczba danych wskazuje, że efekt MTX obejmuje również zmiany metylacji DNA, regulację FOXP3 w limfocytach T regulatorowych oraz wpływ na niekodujące RNA, w tym lincRNA-p21. Współczesne dane sugerują zatem, że epigenetyka stanowi kluczowy pomost między efektem metabolicznym a trwałą odpowiedzią terapeutyczną, co otwiera nowe możliwości w zakresie personalizacji leczenia chorób autoimmunologicznych.

Literatura

1. Friedman B., Cronstein B., *Methotrexate Mechanism in Treatment of Rheumatoid Arthritis*, Jt Bone Spine Rev Rhum, 86, 2019, s. 301-307, doi:10.1016/j.jbspin.2018.07.004.
2. Cronstein B.N., Aune T.M., *Methotrexate and Its Mechanisms of Action in Inflammatory Arthritis*, Nat Rev Rheumatol, 16, 2020, s. 145-154, doi:10.1038/s41584-020-0373-9.
3. Jolivet J., Cowan K.H., Curt G.A., Clendeninn N.J., Chabner B.A., *The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate*, N Engl J Med, 309, 1983, s. 1094-1104, doi:10.1056/NEJM198311033091805.
4. Chan E.S., Cronstein B.N., *Molecular Action of Methotrexate in Inflammatory Diseases*, Arthritis Res Ther, 4, 2002, 266, doi:10.1186/ar419.
5. Huang C., Liang Y., Li, Y., Wei Q., Ouyang L., Zhang J., *The Epigenetic Landscape of Rheumatoid Arthritis: Pathogenesis and Drug Therapeutic Potentials*, Acta Pharm, Sin B, 15, 2025, s. 5601-5631, doi:10.1016/j.apsb.2025.08.022.
6. Cai Y., Qiu R., Huang Q., Lai W., Han Y., Lu X., Qin J., Ouyang Q., Yang M., *Circ_0088200 Acts as a Sponge for miR-127-5p to Promote the Migration and Invasion of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes*, Rheumatol Immunol Res, 6, 2025, s. 7-20, doi:10.1515/rir-2025-0002.
7. Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M., Boutron I., Hoffmann, T.C., Mulrow C.D., Shamseer L., Tetzlaff J.M., Akl E.A., Brennan S.E. i in., *The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews*, Syst Rev, 10, 2021, 89, doi:10.1186/s13643-021-01626-4.

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

8. Świerkot J., Ślęzak R., Znaczenie badań farmakogenetycznych w efektywności leczenia metotreksatem chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (część 1). Postepy Hig Med Dosw, 65, 2011, s. 195-206.
9. Zhao J., Guo S., Schrodi S.J., He D., *Cuproptosis and Cuproptosis-Related Genes in Rheumatoid Arthritis: Implication, Prospects, and Perspectives*, Front Immunol, 13, 2022, 930278, doi:10.3389/fimmu.2022.930278.
10. Noack M., Miossec P., *Effects of Methotrexate Alone or Combined With Arthritis-Related Biotherapies in an in Vitro Co-Culture Model With Immune Cells and Synoviocytes*, Front Immunol, 10, 2019, doi:10.3389/fimmu.2019.02992.
11. Muller I.B., Lin M., de Jonge R., Will N., López-Navarro B., van der Laken C., Struys E.A., Oudejans C.B.M., Assaraf Y.G., Cloos J. i in., *Methotrexate Provokes Disparate Folate Metabolism Gene Expression and Alternative Splicing in Ex Vivo Monocytes and GM-CSF- and M-CSF-Polarized Macrophages*, Int J Mol Sci, 24, 2023, 9641, doi:10.3390/ijms24119641.
12. Yang Z., Mo J., Li W., Zhao Z., Mei S., *Methotrexate Polyglutamates*, Expert Rev Clin Pharmacol, 17, 2024, s. 1025-1037, doi:10.1080/17512433.2024.2416674.
13. Hanoodi M., Mittal M., *Methotrexate*, In StatPearls, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2026.
14. Mikkelsen T.S., Thorn C.F., Yang J.J., Ulrich C.M., French D., Zaza G., Dunnenberger H.M., Marsh S., McLeod H.L., Giacomini K. i in., *PharmGKB Summary: Methotrexate Pathway*, Pharmacogenet Genomics, 21, 2011, 679, doi:10.1097/FPC.0b013e328343dd93.
15. Friedman B., Cronstein B., *Methotrexate Mechanism in Treatment of Rheumatoid Arthritis*, Jt Bone Spine Rev Rhum, 86, 2019, s. 301-307, doi:10.1016/j.jbspin.2018.07.004.
16. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E., *The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate. Increased Adenosine Release at Inflamed Sites Diminishes Leukocyte Accumulation in an in Vivo Model of Inflammation*, J Clin Invest, 92, 1993, s. 2675-2682, doi:10.1172/JCI116884.
17. Chan E.S., Cronstein B.N., *Molecular Action of Methotrexate in Inflammatory Diseases*, Arthritis Res Ther, 4, 2002, 266, doi:10.1186/ar419.
18. Hoffman D.R., Cornatzer W.E., Duerre J.A., *Relationship between Tissue Levels of S-Adenosylmethionine, S-Adenylhomocysteine, and Transmethylation Reactions*, Can J Biochem, 57, 1979, s. 56-65, doi:10.1139/o79-007.
19. Hao X., Huang Y., Qiu M., Yin C., Ren H., Gan H., Li H., Zhou Y., Xia J., Li W. i in., *Immunoassay of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine: The Methylation Index as a Biomarker for Disease and Health Status. BMC Res*, Notes, 9, 2016, 498, doi:10.1186/s13104-016-2296-8.
20. Forster V.J., McDonnell A., Theobald R., McKay J.A., *Effect of Methotrexate/Vitamin B12 on DNA Methylation as a Potential Factor in Leukemia Treatment-Related Neurotoxicity*, Epigenomics, 9, 2017, s. 1205-1218, doi:10.2217/epi-2016-0165.
21. Nair N., Plant D., Verstappen S.M., Isaacs J.D., Morgan A.W., Hyrich K.L., Barton A., Wilson A.G., *Differential DNA Methylation Correlates with Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis*, Rheumatol Oxf Engl, 59, 2020, s. 1364-1371, doi:10.1093/rheumatology/kez411.
22. Guderud K., Sunde L.H., Flåm S.T., Mæhlen M.T., Mjaavatten M.D., Lillegraven S., Aga A.B., Evenrød I.M., Norli E.S., Andreassen B.K. i in., *Rheumatoid Arthritis Patients, Both Newly Diagnosed and Methotrexate Treated, Show More DNA Methylation Differences in CD4+ Memory Than in CD4+ Naïve T Cells*, Front Immunol, 11, 2020, 194, doi:10.3389/fimmu.2020.00194.
23. Morabito L., Montesinos M.C., Schreibman D.M., Balter L., Thompson L.F., Resta R., Carlin G., Huie M.A., Cronstein B.N., *Methotrexate and Sulfasalazine Promote Adenosine*

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

Release by a Mechanism That Requires Ecto-5'-Nucleotidase-Mediated Conversion of Adenine Nucleotides, J Clin Invest, 101, 1998, s. 295-300, doi:10.1172/JCI1554.
24. Mussoi B.S.S., Brown C.J., *Age-Related Changes in Temporal Resolution Revisited: Electrophysiological and Behavioral Findings from Cochlear Implant Users*, Ear Hear, 40, 2019, s. 1328-1344, doi:10.1097/AUD.0000000000000732.
25. Cribbs A.P., Kennedy A., Penn H., Amjadi P., Green P., Read J.E., Brennan F., Gregory B., Williams R.O., *Methotrexate Restores Regulatory T Cell Function Through Demethylation of the FoxP3 Upstream Enhancer in Patients With Rheumatoid Arthritis*, Arthritis Rheumatol, 67, 2015, s. 1182-1192, doi:10.1002/art.39031.
26. Takeichi T., Akiyama M., *KLICK Syndrome Linked to a POMP Mutation Has Features Suggestive of an Autoinflammatory Keratinization Disease*, Front Immunol, 11, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.00641.
27. Morabito L., Montesinos M.C., Schreibman D.M., Balter L., Thompson L.F., Resta R., Carlin G., Huie M.A., Cronstein B.N., *Methotrexate and Sulfasalazine Promote Adenosine Release by a Mechanism That Requires Ecto-5'-Nucleotidase-Mediated Conversion of Adenine Nucleotides*, J Clin Invest, 101, 1998, s. 295-300, doi:10.1172/JCI1554.
28. Dolhain R.J.E.M., Tak P., Dijkmans B., Kuiper P., Breedveld F., Miltenburg A., *Methotrexate Reduces Inflammatory Cell Numbers, Expression of Monokines and of Adhesion Molecules in Synovial Tissue of Patients with Rheumatoid Arthritis*, Br J Rheumatol, 37, 1998, s. 502-508, doi:10.1093/rheumatology/37.5.502.
29. Bedoui Y., Guillot X., Sélambarom J., Guiraud P., Giry C., Jaffar-Bandjee M.C., Ralandison S., Gasque P., *Methotrexate an Old Drug with New Tricks*, Int J Mol Sci, 20, 2019, 5023, doi:10.3390/ijms20205023.
30. Selvestrel D., Lucafò M., Pugnetti L., Pagarin S., Moressa V., Pastore S., Taddio A., Stocco G., Decorti G., *Responses of Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis to Methotrexate: A Genomic Outlook*, Expert Rev Clin Immunol, 17, 2021, s. 1131-1142, doi:10.1080/1744666X.2021.1968833.
31. Feagan B.G., Rochon J., Fedorak R.N., Irvine E.J., Wild G., Sutherland L., Steinhart A.H., Greenberg G.R., Gillies R., Hopkins M. i in., *Methotrexate for the Treatment of Crohn's Disease*, N Engl J Med., 332, 1995, s. 292-297, doi:10.1056/NEJM199502023320503.
32. Nielsen O.H., Steenholdt C., Juhl C.B., Rogler G., *Efficacy and Safety of Methotrexate in the Management of Inflammatory Bowel Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials*, EClinicalMedicine, 20, 2020, 100271, doi:10.1016/j.eclinm.2020.100271.
33. Mołoń A., Kubis H., Żurawska J., Cieśla M., *Blood-Based Epigenetic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis: Current Knowledge and Future Perspectives*, Front Immunol, 17, 2026, doi:10.3389/fimmu.2026.1753808.
34. Araki Y., Mimura T., *The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases*, Mediators Inflamm, 2017, 2017, 2608605, doi:10.1155/2017/2608605.
35. Bagni G., Biancalana E., Chiara E., Costanzo I., Malandrino D., Lastraioli E., Palmerini M., Silvestri E., Urban M.L., Emmi G., *Epigenetics in Autoimmune Diseases: Unraveling the Hidden Regulators of Immune Dysregulation*, Autoimmun Rev, 24, 2025, 103784, doi:10.1016/j.autrev.2025.103784.
36. Pauley K.M., Satoh M., Chan A.L., Bubb M.R., Reeves W.H., Chan E.K., *Upregulated miR-146a Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Rheumatoid Arthritis Patients*, Arthritis Res Ther, 10, 2008, R101, doi:10.1186/ar2493.
37. Spurlock C.F., Tossberg J.T., Matlock B.K., Olsen N.J., *Aune T.M., Methotrexate Inhibits NF-κB Activity via lincRNA-P21 Induction*, Arthritis Rheumatol, 66, 2014, s. 2947-2957, doi:10.1002/art.38805.
38. Cai X., Yao Y., *Epigenetic Modifications of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis*, Ann Med, 57, 2533432, doi:10.1080/07853890.2025.2533432.

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

39. Lucock M., *Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes*, Mol Genet Metab, 71, 2000, s. 121-138, doi:10.1006/mgme.2000.3027.
40. Albrecht L.V., Bui M.H., De Robertis E.M., *Canonical Wnt Is Inhibited by Targeting One-Carbon Metabolism through Methotrexate or Methionine Deprivation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 116, 2019, s. 2987-2995, doi:10.1073/pnas.1820161116.
41. Adams C., Nair N., Plant D., Verstappen S.M.M., Quach H.L., Quach D.L., Carvidi A., Nititham J., Nakamura M., Graf J. i in., *Identification of Cell-Specific Differential DNA Methylation Associated With Methotrexate Treatment Response in Rheumatoid Arthritis,* Arthritis Rheumatol, 75, 2023, s. 1088-1097, doi:10.1002/art.42464.
42. Castro Santos P., Díaz-Peña R., *Epigenetics and Pharmacoepigenetics of Rheumatic Disorders*, 2025, s. 718-728.
43. Kiełbowski K., Bakinowska E., Gorący-Rosik A., Figiel K., Judek R., Rosik J., Dec P., Modrzejewski A., Pawlik A., *DNA and RNA Methylation in Rheumatoid Arthritis – A Narrative Review*, Epigenomes, 9, 2025, doi:10.3390/epigenomes9010002.
44. Madrid-Paredes A., Martín J., Márquez A., *Omic Approaches and Treatment Response in Rheumatoid Arthritis*, Pharmaceutics, 14, 2022, doi:10.3390/pharmaceutics14081648.
45. Adams C., Nair N., Plant D., Verstappen S.M.M., Quach H.L., Quach D.L., Carvidi A., Nititham J., Nakamura M., Graf J. i in., *Identification of Cell-Specific Differential DNA Methylation Associated With Methotrexate Treatment Response in Rheumatoid Arthritis*, Arthritis Rheumatol Hoboken Nj, 75, 2023, s. 1088-1097, doi:10.1002/art.42464.
46. Huang C., Liang Y., Li Y., Wei Q., Ouyang L., Zhang J., *The Epigenetic Landscape of Rheumatoid Arthritis: Pathogenesis and Drug Therapeutic Potentials*, Acta Pharm Sin B, 15, 2025, s. 5601-5631, doi:10.1016/j.apsb.2025.08.022.
47. Casnici C., Lattuada D., Tonna N., Crotta K., Storini C., Bianco F., Truzzi M.C., Corradini C., Marelli O., *Optimized "In Vitro" Culture Conditions for Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts*, Mediators Inflamm, 2014, 2014, 702057, doi:10.1155/2014/702057.

Mechanizmy działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych z uwzględnieniem zmian epigenetycznych

Streszczenie

Celem opracowania było przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej mechanizmów działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli zmian epigenetycznych. Przesłanką podjęcia tematu jest utrzymująca się kluczowa pozycja metotreksatu w terapii mimo rozwoju leków biologicznych oraz potrzeba lepszego zrozumienia jego wielopoziomowego działania. Zakres pracy obejmuje analizę farmakologii leku, klasycznych mechanizmów przeciwzapalnych, jego wpływu na układ odpornościowy oraz znaczenia procesów epigenetycznych w odpowiedzi terapeutycznej. Opracowanie przygotowano w formie narracyjnego przeglądu literatury z elementami uporządkowanego wyszukiwania w bazach PubMed, Scopus i Web of Science. Uwzględniono prace oryginalne, przeglądowe oraz badania translacyjne dotyczące działania metotreksatu, metabolizmu jednowęglowego, sygnalizacji adenozynowej oraz mechanizmów epigenetycznych. Analiza wskazuje, że działanie metotreksatu ma charakter wielowymiarowy i nie ogranicza się do klasycznego efektu antyfolianowego. Kluczową rolę odgrywa oś ATIC-AICAR-adenozyna, prowadząca do nasilenia sygnalizacji przeciwzapalnej. Istotne znaczenie mają również zaburzenia metabolizmu jednowęglowego oraz modulacja odpowiedzi immunologicznej. Coraz więcej danych potwierdza udział mechanizmów epigenetycznych, w tym zmian metylacji DNA, regulacji ekspresji FOXP3 w limfocytach T regulatorowych oraz wpływu na niekodujące RNA, co może odpowiadać za trwałość efektu klinicznego.

Wnioski wskazują, że metotreksat należy postrzegać jako lek o zintegrowanym działaniu metaboliczno-immunologicznym i epigenetycznym. Epigenetyka stanowi potencjalny pomost między krótkoterminowymi efektami metabolicznymi a długotrwałą odpowiedzią terapeutyczną. Jednocześnie konieczne są dalsze badania wykorzystujące podejścia wielowymiarowe i analizy komórkowo swoiste w celu pełnego wyjaśnienia mechanizmu działania oraz opracowania narzędzi predykcji odpowiedzi i personalizacji terapii.

Słowa kluczowe: metotreksat, choroby autoimmunologiczne, RZS, epigenetyka

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

Mechanisms of action of methotrexate in autoimmune and inflammatory diseases, with a focus on epigenetic changes

Abstract

The aim of this study was to present current knowledge on the mechanisms of action of methotrexate in autoimmune and inflammatory diseases, with particular emphasis on the role of epigenetic changes. The rationale for addressing this topic stems from the continued key role of methotrexate in therapy despite the development of biological agents, as well as the need for a better understanding of its multi-level mechanisms of action. The scope of the work includes an analysis of the drug's pharmacology, classical anti-inflammatory mechanisms, its effects on the immune system, and the significance of epigenetic processes in the therapeutic response. The study was conducted as a narrative literature review with elements of a structured search in the PubMed, Scopus, and Web of Science databases. Original articles, review papers, and translational studies concerning methotrexate action, one-carbon metabolism, adenosine signaling, and epigenetic mechanisms were included. The analysis indicates that the effects of methotrexate are multidimensional and cannot be explained solely by its classical antifolate activity. A key role is played by the ATIC–AICAR–adenosine axis, which enhances anti-inflammatory signaling. Disturbances in one-carbon metabolism and modulation of the immune response are also of significant importance. Increasing evidence supports the involvement of epigenetic mechanisms, including DNA methylation changes, regulation of FOXP3 expression in regulatory T cells, and the influence on non-coding RNA, which may contribute to the durability of the clinical effect. The conclusions indicate that methotrexate should be considered a drug with integrated metabolic, immunological, and epigenetic actions. Epigenetics may serve as a bridge between short-term metabolic effects and long-term therapeutic response. Further studies using multi-dimensional approaches and cell-specific analyses are needed to fully elucidate the mechanism of action and to develop tools for response prediction and therapy personalization.

Keywords: methotrexate, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, epigenetics

This document was created by an application that isn't licensed to use novaPDF.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.