



Kandidaatintutkielma

Metotreksaatin metabolia ja toimintamekanismi nivelreuman hoidossa

Janica Thomasson

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli­lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	2
2. NIVELREUMA	2
2.1. Nivelreuman syntymekanismi	3
2.2. Nivelreuman oireet	5
3. METOTREKSAATTI	6
3.1. Metotreksaatin rakenne	7
3.2. Metotreksaatti inhiboi DHFR:n aktiivisuutta	8
3.3. Metotreksaatin käytön vaikutus elimistöön	8
4. METOTREKSAATIN AINEENVAIHDUNTA	9
4.1. Metotreksaatin absorptio	9
4.2. Metotreksaatin muokkaus	10
4.3. Metotreksaatin kuljetus	10
4.4. Metotreksaatin erityis	11
5. METOTREKSAATIN MAHDOLLISET TOIMINTAMEKANISMIT	12
5.1. Folaatti antagonismi	12
5.2. Adenosiinisignaloinnin stimulaatio	12
5.3. Reaktiivisten happiradikaalien muodostus	14
5.4. Metyyliryhmän luovuttajien tuotannon inhibitio	14
5.5. Eikosanoidien ja matriksin metalloproteiinaasien downregulaatio	14
5.6. Sytokiiniprofiilin muokkaus	15
5.7. Adheesiomolekyylien ekspression downregulaatio	15
6. METOTREKSAATIN TULEVAISUUS NIVELREUMAN HOIDOSSA	15
7. KIRJALLISUUSVIITTEET	17

1. Johdanto

Metotreksaatti on antimetaboliitti, joka alun perin kehitettiin käytettäväksi leukemian hoidossa. Myöhemmin metotreksaatin huomattiin olevan matalampina annoksina tehokas hoitamaan muitakin autoimmuunisairauksia kuten nivelreumaa. Nivelreuman hoitoon metotreksaattia käytettiin ensimmäisen kerran vuonna 1951 ja lukuisten tutkimusten jälkeen sen käyttö nivelreuman hoidossa virallistettiin vuonna 1988. Tänä päivänä metotreksaatti on yleisin käytössä oleva antireumaattinen lääke sen nopean toimivuuden, tehokkuuden ja hyvän siedettävyyden ansiosta (Castillo & Moyano, 2012).

Metotreksaatti on mielenkiintoinen tutkielman aihe sen laajakäyttöisyyden ja tuntemattomien vaikutusten vuoksi. Vaikka metotreksaatti on pitkään ollut vakituisessa käytössä nivelreuman hoidossa, sen toimintamekanismista ei vielä ole varmuutta. Useita ehdotuksia metotreksaatin mahdolliseksi toimintamekanismiksi on kuitenkin olemassa ja lääkkeen kokonaisvaikutuksen arvellaan olevan useamman mekanismin summa (Brown, Pratt, & Isaacs, 2016). Tässä työssä perehdytään ensin nivelreumaan ja sen patogeneesiin, jonka jälkeen tarkastellaan metotreksaattia molekyylinä, sen kulkua elimistössä ja potentiaalisia niveltulehdusta ehkäiseviä toimintamekanismeja. Lopuksi pohditaan metotreksaatin tulevaisuutta osana nivelreuman hoitoa.

2. Nivelreuma

Nivelreuma on pääasiassa niveliin kohdistuva autoimmuunisairaus, joka hoitamattomana voi johtaa nivelten vaurioitumiseen ja lopulta tulehtuneen nivelen toimintakyvyn menettämiseen (Weisman, 2011). Tuntemattomasta syystä tulehdus usein ilmenee ensimmäisenä käsien pienissä nivelissä. Nivelreumaan voi liittyä niveltulehdusten lisäksi esimerkiksi ihon, verisuonten, keuhkojen ja sydämen manifestaatiota (Rantalaiho, Sokka, & Meri, 2017). Potilaan sairastuttua nivelreumaan sairaus voi kestää kuukausista vuosiin ja pahimmillaan potilas sairastaa nivelreumaa lopun elämäänsä. Nivelreuman kehityksen suuntaa ei voida ennustaa, mutta sairauden edetessä oireet voivat muuttua lievemmiksi tai pahemmiksi. Sekä sairauden kehitys että oireiden vakavuus ja laajuus ovat yksilöllisiä ja ne vaihtelevat suuresti eri potilaiden välillä (Weisman, 2011).

Nivelreuma puhkeaa jopa 70 %:lla potilaista salakavalasti edeten, jolloin sairauden diagnosointi ei ole helppoa. Vielä ei ole onnistuttu kehittämään menetelmää, jolla pystyttäisiin kliinisesti tai serologisesti diagnosoimaan nivelreuma helposti. Osalla potilaista löydetään verestä reumaan viittaavia biomarkkereita, jolloin kyseessä on seropositiivinen nivelreuma. Seronegatiivisilla potilailla näitä biomarkkereita ei ole (Weisman, 2011). Biomarkkereiden läsnäolo potilaan

veressä ei yksinään riitä reumadiagnoosiin, sillä esimerkiksi reumatekijää löydetään myös Sjögrenin oireyhtymää sairastavilta (Rantalaiho et al., 2017). Nivelreumaa ei siis voida suoraan osoittaa näiden biomarkkereiden löytymisellä. Toistaiseksi nivelreuma diagnosoidaan oireiden, veren tulehdusarvojen ja nivelkuvausten avulla (Weisman, 2011).

Lääkinnällinen hoito tulisi aloittaa mahdollisimman pian diagnoosin jälkeen ja suosituksena on aloittaa lääkitys metotreksaatilla, joka on parhaiten tutkittu ja tehokas synteettinen antireumaattinen lääke (Rantalaiho et al., 2017; Weisman, 2011). Metotreksaatin lisäksi on olemassa muita synteettisiä ja biologisia nivelreumaan tehoavia lääkkeitä, joita voidaan käyttää yhdistelmähoitona metotreksaatin kanssa tai vaihtoehtoisena hoitomuotona metotreksaatille. Lääkityksen tavoitteena on lievittää kipuja ja hidastaa sairauden etenemistä, jotta nivelten tuhoutuminen saataisiin minimoitua ja potilaan toimintakyky ylläpidettyä (Weisman, 2011).

2.1. Nivelreuman syntymekanismi

Nivelreuman tarkka syntymekanismi ei ole selvillä, mutta sille altistavia tekijöitä on tunnistettu useita. Pääsyytä nivelreumaan sairastumiselle ei tiedetä, mutta geneettinen tekijä on todennäköinen. Merkittävin ulkoinen riskitekijä seropositiiviselle nivelreumalle on tupakointi (Makrygiannakis et al., 2008; Weisman, 2011). Tärkein sairastumisen riskiä lisäävä geneettinen tekijä on MHC II -lokuksesta sijaitseva HLA-DR4-alleeli, joka kasvattaa riskiä sairastua nivelreumaan jopa viisinkertaisesti (Firestein & McInnes, 2017).

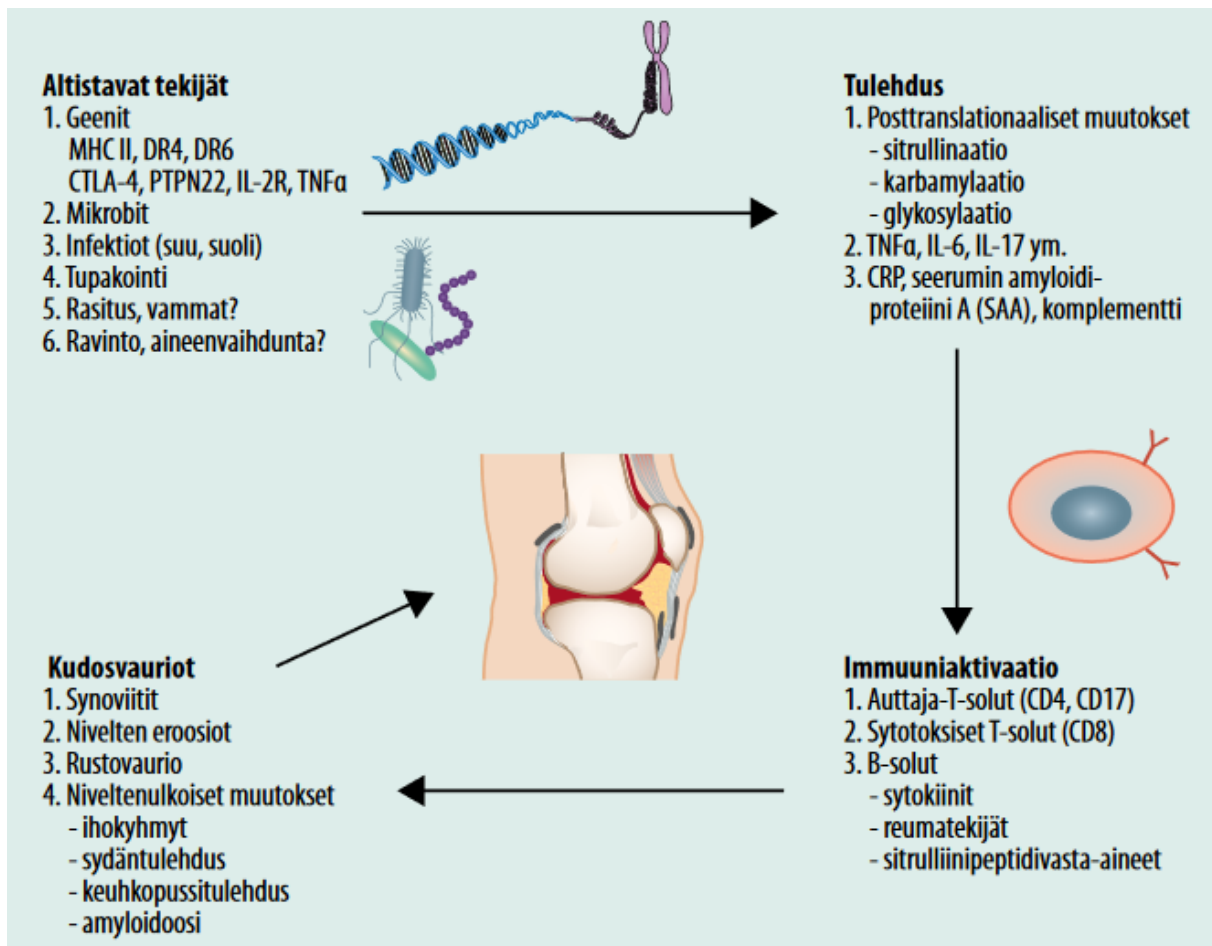
Varhaisimmat nivelreumaan viittaavat biomarkerit ovat sitrulliinipeptidivasta-aineet, joiden löytyminen viittaa seropositiiviseen nivelreumaan. Myös reumatekijä ja karbamyloituneiden peptidien vasta-aineet toimivat nivelreuman merkkiaineina, mutta ne eivät ole nivelreumalle spesifisiä, koska niitä tavataan myös muissa sairauksissa (Rantalaiho et al., 2017). Lääkehoitojen toimivuuden suuri vaihtelu eri nivelreumapotilaiden välillä viittaisi siihen, ettei nivelreuman syntymekanismi olisi yksiselitteinen tapahtuma, vaan vaihteleva joukko patogeneettisiä tekijöitä johtaisivat yhdessä nivelreuman laukeamiseen (Firestein & McInnes, 2017). Myös eri nivelien alttiutta nivelreumalle on tutkittu ja huomattu, että DNA:n metylaatioissa ja sitä myöten geenien ilmentymisessä on vaihtelua nivelten välillä. Tämä tarkoittaa, että nivelreuman mekanismi ei välttämättä olisi kaikissa nivelissä sama vaan vaihtelisi nivelkohtaisesti (Ai et al., 2016).

Nivelreuman aktivaation mekanismi on monimutkainen ja perustuu useiden solutyypin ja erilaisten soluprosessien vuorovaikutukseen. Merkittävä tapahtuma nivelreuman synnyssä on tyypin II kollageenin sitrullinaatio kudoksissa. Tätä reaktiota katalysoi peptidyliarginyyliideaminaasit (PAD), joiden kahta muotoa (PAD-2 ja -4) tavataan

tulehtuneiden nivelten lymfosyyteissä, neutrofiileissä, makrofageissa ja fibroblasteissa (Rantalaiho et al., 2017). Tupakointi kiihdyttää sitrullinaatiota, mikä osittain selittää aiemmin mainitun tupakoinnin merkittävyyden seropositiivisen nivelreuman riskitekijänä (Makrygiannakis et al., 2008; Rantalaiho et al., 2017). Sitrullinaatio on luonnollisesti soluissa tapahtuva posttranslacionaalinen reaktio, mutta nivelreumassa näitä sitrullinoituneita peptidejä vastaan kehittyvät sitrulliniptidivasta-aineita, joiden löytymistä potilaan verestä voidaan käyttää avuksi nivelreumadiagnoosia tehdessä (Firestein & McInnes, 2017; Rantalaiho et al., 2017). Nivelreumaan sairastuvilta puuttuu todennäköisesti toleranssi sitrullinoituneita peptidejä vastaan tai toleranssi on esimerkiksi infektion seurauksena heikentynyt (Rantalaiho et al., 2017).

Antigeeniä esittelevien solujen (APC), kuten B-solujen ja makrofagien normaalista poikkeava toiminta on suuressa roolissa nivelreuman aktivaatiossa. Auttaja T-solut tunnistavat APC-solujen solukalvolla esittelemiä antigeenejä, mikä johtaa B-solujen ja sytotoksisten T-solujen aktivaatioon (Rantalaiho et al., 2017; Weisman, 2011). Tulehduksen jatkuessa useat eri tulehdussolut kerääntyvät tulehtuneelle alueelle ja alkavat tuhota kudosta. Aktivoituneet T-solut erittävät lymfokiineja ja sytokiineja, jotka ohjaavat paikalle lisää tulehdussoluja ja aktivoivat niitä. Myös B-solut erittävät sytokiineja, esimerkiksi TNF- α :aa, minkä lisäksi ne tuottavat autoantibodeja ja aktivoivat T-soluja. Makrofagit stimuloivat synoviosyyttejä erittämään entsyymejä, jotka voivat aiheuttaa rusto- ja luukudoksen tuhoutumista ja fibroblastit tuhoavat nivelkudosta ja rustoa erittämällä matriksin metalloproteinaaseja (MMP). Tulehdusreaktioon osallistuvat solut eivät rajoitu vain edellä mainittuihin, vaan myös esimerkiksi luuta hajottavat osteoklastit kerääntyvät tulehtuneeseen niveleen. Tulehtuneen nivelen kudosta tuhoavien solujen toimintaan vaikuttaminen on ollut tavoitteena monen nykyaikaisen nivelreuman hoitoon tarkoitetun lääkkeen kehityksessä (Weisman, 2011).

Niveltulehdus alkaa nivelkalvojen tulehtumisella, josta tulehdus voi levitä muihin ympäröiviin rakenteisiin, esimerkiksi rustoon ja luuhun. Mikäli tulehdusreaktio pitkittyy ja tulehdussolut pääsevät vapaasti tuhoamaan nivelkudosta, voi se lopulta johtaa nivelen toimintakyvyn menettämiseen (Weisman, 2011). Kuvassa 1 on esitetty nivelreuman kehitystä ja kulkua havainnollistava kaavio, jossa on lueteltu nivelreumalle altistavia tekijöitä, tulehduksen ja immuuniaktivaation piirteitä sekä kudosvaurioita, joita nivelreumaa sairastavalle voi syntyä.



Kuva 1. Nivelreuman patogeneesi. Kudostekijät DR4 ja DR6 esiintyvät tavallisesti dendriittisolujen, makrofagien ja B-solujen pinnalla ja sitovat proteiineista pilkottuja peptidejä. Muut heikommin nivelreumalle altistavat geenit (MHC II, CTLA-4, PTPN22, IL-2R, TNF α) säätelevät tulehdussolujen aktiivisuutta. Nivelletulehduksessa kudoksen proteiineille on tehty posttranslacionaalisia muutoksia, jotka johtavat immuunipuolustuksen aktivaatioon. Tulehdusreaktion pitkittyessä tulehdussolut jatkavat nivelkudoksen tuhoamista ja syntyy kudolvaurioita. (Kuva ja teksti lähteestä (Rantalaiho et al., 2017)).

2.2. Nivelreuman oireet

Nivelreuman oireet vaihtelevat sairauden tyypin mukaan (Weisman, 2011). Esimerkiksi seropositiivisessa nivelreumassa taudin kulku on yhtenevä niveliä vaurioittava sairaus, kun taas seronegatiivisilla potilailla voidaan pidemmällä aikavälillä tavata nivelreuman lisäksi useita muita sairauksia. Tämä tarkoittaa, että seronegatiivinen muoto olisikin todellisuudessa heterogeeninen tautiryhmä (Rantalaiho et al., 2017). Tyypillisesti nivelreuma puhkeaa hitaasti symmetrisenä ja paikkaa vaihtavana käsien ja jalkojen nivelten tulehduksena. Symmetrisyydellä tarkoitetaan tässä yhteydessä sitä, että vasemman ja oikean raajan sama nivel, esimerkiksi molemmat ranteet, tulehtuvat samanaikaisesti. Tyypillisimpiä niveltulehduksen oireita ovat nivelen turvotus, kipuilu, liikeradan rajoittuneisuus ja aamujäykkyys (Rantalaiho et al., 2017; Weisman, 2011).

Nivelreuman oireet eivät rajoitu vain niveliin, vaan krooninen tulehdus vaikuttaa koko elimistössä. Tulehdustila kiihdyttää elimistön aineenvaihduntaa, jolloin niveloireiden lisäksi voi esiintyä lämmön nousua, uupumusta, laihtumista ja veren tulehdusarvojen nousua (Weisman, 2011). Yleisin nivelreuman ekstra-artikulaarinen manifestaatio on reumakyhmyt, joita esiintyy arviolta 30 %:lla nivelreumapotilaista. Nivelreumaa sairastavilla on myös suurentunut riski sairastua etenkin sydän- ja verisuonisairauksiin ja osteoporoosiin johtuen todennäköisesti kroonisesta tulehduksesta, liikunnan puutteesta ja lääkityksestä (Rantalaiho et al., 2017).

Niveltulehduksen oireita voidaan lievittää ja nivelten eroosiota sekä nivelreuman liitännäissairauksia ennaltaehkäistä hyvissä ajoin aloitetulla aktiivisella ja tehokkaalla lääkehoidolla. Hoidon tavoitteena on saavuttaa remissio mahdollisimman varhaisessa vaiheessa, jotta nivelreuman ennuste olisi parempi ja vältettäisiin nivelten tuhoutuminen ja toimintakyvyn menettäminen (Rantalaiho et al., 2017). Nivelreumaa on vuosikymmenien ajan hoidettu metotreksaatilla, joka on yleisesti ottaen hyvin siedetty antireumaattinen lääke, jolla on saatu hyviä hoitotuloksia (Castillo & Moyano, 2012; Rantalaiho et al., 2017).

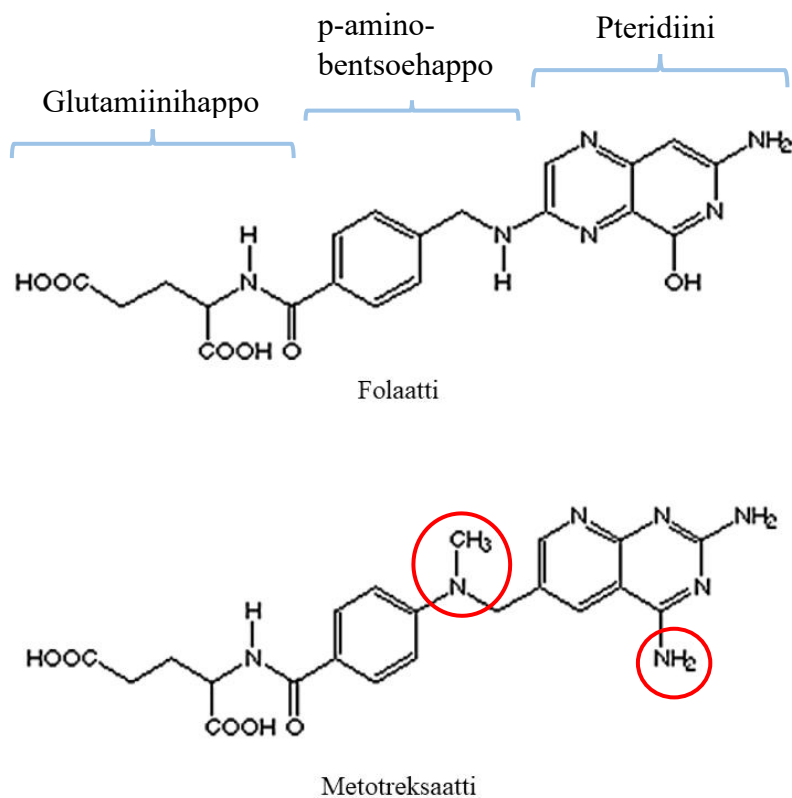
3. Metotreksaatti

Nivelreuman hoito aloitetaan ensisijaisesti metotreksaatilla, joka on synteettinen antireumaattinen lääke. Metotreksaatti inhiboi dihydrofolaattireduktaasia (DHFR) kilpailemalla sitoutumispaikoista folaatin kanssa. DHFR on entsyymi, joka on välttämätön DNA-synteesille ja sitä myöten elintärkeää solujen jakautumiselle. Metotreksaatti vaikuttaa siis erityisesti solujen jakautumisvaiheessa, jolloin soluissa tapahtuu DNA:n kahdentuminen (Castillo & Moyano, 2012). Metotreksaatin toimintamekanismia ei olla pystytty määrittelemään kokonaisuudessaan, mutta hypoteeseja metotreksaatin toimintamekanismista on useita (Brown et al., 2016).

Metotreksaatin suosio nivelreumalääkkeenä perustuu sen nopeaan toimivuuteen, tehokkuuteen, ja hyvään siedettävyyteen. Tämän lisäksi metotreksaatti on helppo antaa potilaalle ja se on myös kohtuullisen edullinen vaihtoehto (Castillo & Moyano, 2012). Nivelreuman hoidossa metotreksaatilla saavutetaan hyviä hoitotuloksia, mutta potilaista noin 10–20 % ei siedä sairauden kurissa pysymisen kannalta riittävän suurta metotreksaattiannosta. Tällöin metotreksaatin rinnalle tai tilalle voidaan ottaa käyttöön muita synteettisiä ja/tai biologisia lääkkeitä vahvistamaan antireumaattista vaikutusta (Rantalaiho et al., 2017). Metotreksaattilääkityksen toimivuutta yksittäisessä nivelreumapotilaassa ei ainakaan toistaiseksi pystytä ennustamaan (Brown et al., 2016).

3.1. Metotreksaatin rakenne

Metotreksaatti on foolihapon aineenvaihduntaa estävä antimetaboliitti. Se on folaatin analogi, joten sen rakenteelliset ja kemialliset ominaisuudet ovat hyvin samankaltaiset kuin folaatilla (Castillo & Moyano, 2012; Inoue & Yuasa, 2014). Kuvassa 2 on esitetty metotreksaatin ja folaatin rakenteet rinnakkain. Kuvasta nähdään folaatin ja metotreksaatin rakenteiden muodostuvan pteridiinirenkaasta, p-aminobentsoehaposta ja glutamiinihaposta. Metotreksaatissa p-aminobentsoehapon tyypen liittynyt vety on korvattu metyyli ryhmällä ja pteridiinirenkaan hydroksyyli ryhmä on vaihdettu aminoryhmäksi. Fysiologisessa ympäristössä metotreksaatin glutamiinihappo-osan karboksyyli ryhmät ovat ionisoituneessa muodossa, mikä estää lääkeaineen vapaan kulkemisen solukalvojen läpi (Inoue & Yuasa, 2014).



Kuva 2. Metotreksaatin ja folaatin rakenteet rinnakkain. Folaatin rakenteen yläpuolella on eritelty glutamiinihappo, p-aminobentsoehappo ja pteridiini, jotka muodostavat molempien molekyylien rakenteen. Metotreksaatin rakenne-erot folaatin kanssa on merkitty punaisilla ympyröillä metotreksaatin rakenteeseen. (Kuva muokattu lähteestä (Castillo & Moyano, 2012)).

3.2. Metotreksaatti inhiboi DHFR:n aktiivisuutta

Dihydrofolaattireduktaasi (DHFR) on avainasemassa folaatin aineenvaihdunnassa, jossa se katalysoi dihydrofolaatin reaktiota tetrahydrofolaatiksi, joka on foolihapon metabolisesti aktiivinen muoto. Reaktiossa muodostuva tetrahydrofolaatti on välttämätön nukleotidien synteesiin vaadittujen puriinien ja tymidylaatin biosynteesissä (P. T. Ravi Rajagopalan et al., 2002). Tetrahydrofolaattia tarvitaan myös joidenkin aminohappojen synteesissä sekä DNA:n, histonien ja neurotransmittereiden metylaatiota edistävän S-adenosyyylimetioniinin tuotannossa (Castillo & Moyano, 2012).

Koska DHFR on metabolisesti tärkeä entsyymi, sen toiminnan estäminen on ollut tavoitteena solunsalpaajien kehityksessä. Metotreksaatti on yksi näistä DHFR:n toimintaan vaikuttavista solunsalpaajista ja se inhiboi DHFR:n toimintaa kilpailemalla sitoutumispaikoista folaatin kanssa (Castillo & Moyano, 2012; P. T. Ravi Rajagopalan et al., 2002). Kun DHFR:n toiminta on estynyt, DNA synteesille välttämättömien rakennemolekyylien biosynteesi häiriintyy. Metotreksaatti vaikuttaa siis erityisesti solusyklin S-vaiheessa estäen solujen normaalin jakautumisen, mikä puolestaan johtaa apoptoosin käynnistymiseen. DHFR:n affiniteetti metotreksaattiin on jopa tuhatkertainen folaattiin verrattuna (Castillo & Moyano, 2012).

3.3. Metotreksaatin käytön vaikutus elimistöön

Metotreksaattia käytetään lievittämään nivelreuman oireita ja hidastamaan sairauden etenemistä, mutta toivottujen vaikutusten lisäksi metotreksaatilla on myös paljon haittavaikutuksia. Metotreksaatin tehossa ja sitä myöten vaikutuksen laajuudessa on jonkin verran vaihtelua annostuksesta ja ottotavasta riippuen. Tässä kappaleessa käsittelemme nivelreuman hoidossa yleensä käytetyn metotreksaattiannoksen (7,5–25 mg/viikko) vaikutuksia koko elimistön tasolla (Castillo & Moyano, 2012). Suurin osa metotreksaatin haittavaikutuksista johtuu solujen folaatin puutteesta, mikä on seurausta DHFR:n estyneestä toiminnasta tuottaa folaatin metabolisesti aktiivista muotoa eli tetrahydrofolaattia. Metotreksaatin sivuvaikutuksia voidaan siis lievittää antamalla potilaalle foolihappolisää, jolloin solut saavat folaattia käyttöönsä ja metotreksaatin toksinen vaikutus pienenee. Jotkin lääkeaineet samanaikaisesti metotreksaatin kanssa käytettynä voivat pahentaa metotreksaatista saatuja haittavaikutuksia (Castillo & Moyano, 2012).

Metotreksaatin haittavaikutuksia ovat ruuansulatuskanavaan, keuhkoihin ja vereen kohdistuva toksisuus, maksatoksisuus, munuaistoksisuus sekä immuunivasteen heikentyminen (Orion Corporation, 2015). Ruuansulatuskanavaan liittyvät haittavaikutukset ovat annoksesta riippuvia ja niihin lukeutuvat muun muassa pahoinvointi, oksentelu ja ripuli, joista pahoinvointi

on yleisin metotreksaatin sivuoire. Muita lievempiä haittavaikutuksia, joista metotreksaatin käyttäjät saattavat kärsiä ovat uupumus, flunssan kaltaiset oireet, suun ja nenän limakalvojen haavaumat, hiustenlähtö, valonherkkyys ja hengenahdistus. Vakavampia haittavaikutuksia ovat muutokset maksakudoksessa, munuaisvauriot, keuhkokuume ja heikentynyt luuytimen toiminta (Castillo & Moyano, 2012).

Metotreksaattia käyttävän yleistä vointia, maksa-arvoja ja verenkuvaa tulee seurata säännöllisesti, jotta mahdolliset muutokset elimistön toiminnassa huomattaisiin hyvissä ajoin ja lääkitys voidaan tarvittaessa keskeyttää. Nivelreuman hoitoon käytetty matalan annoksen metotreksaattihoito ei yleensä aiheuta hengenvaarallisia sivuvaikutuksia (Castillo & Moyano, 2012).

4. Metotreksaatin aineenvaihdunta

Metotreksaattia voidaan antaa suun kautta tablettina ja injektiona ihon alle tai lihakseen (Castillo & Moyano, 2012). Metotreksaatin kulkureitti soluihin on hiukan erilainen riippuen lääkkeen ottotavasta. Metotreksaatin polyglutamaatio on tärkeä tapahtuma metotreksaatin aineenvaihdunnassa ja sen kuljetukseen elimistössä osallistuu useita kuljetusmolekyylejä. Suurin osa metotreksaatista poistuu elimistöstä virtsan mukana, mutta myös maksa osallistuu metotreksaatin eritykseen (Castillo & Moyano, 2012; Inoue & Yuasa, 2014). Metotreksaatin kanssa samanaikaisesti käytetyillä muilla lääkeaineilla voi olla vaikutusta metotreksaatin absorptioon, kuljetukseen, aineenvaihduntaan ja eritykseen (Castillo & Moyano, 2012).

4.1. Metotreksaatin absorptio

Metotreksaatin absorptioon vaikuttaa ottotapa ja annostus. Suun kautta otettu metotreksaatti imeytyy nopeasti ohutsuolessa ja sen biosaatavuus on välillä 64–90 %. Tablettimuotoisen metotreksaatin biosaatavuus laskee mentäessä yli 25 mg kerta-annoksen, mikä viittaisi kuljettajamolekyylin olemassaoloon ja niiden saturaatioon. Suuri vaihtelevuus tablettimuotoisen metotreksaatin biosaatavuudessa voisi johtua esimerkiksi metotreksaatin kuljettamisesta vastuussa olevien kuljettajamolekyylin ekspression ja aktiivisuuden vaihtelusta. Suoraan elimistöön pistetyn metotreksaatin biosaatavuus on suurempi kuin suun kautta otetun, koska tällöin edellä mainittua kuljettajamolekyylin saturaatiota ei tapahdu (Inoue & Yuasa, 2014).

4.2. Metotreksaatin muokkaus

Soluissa metotreksaatti käy läpi polyglutamaation, jonka seurauksena metotreksaatin kuljetus ulos solusta ABCC-transportterin välityksellä vähenee. Metotreksaatin polyglutamaatio tuottaa metotreksaatti_{Glu(1-7)} ja sen ominaisuudet poikkeavat jonkin verran muokkaamattomasta metotreksaatista (Brown et al., 2016). Metotreksaatin polyglutamoidun muodon affiniteetti metotreksaatin kohde-entsyymeihin (DHFR, TYMS, ATIC-entsyymi) on muokkaamattomasta metotreksaattia korkeampi (Brown et al., 2016; Castillo & Moyano, 2012). Metotreksaatin metaboliassa esiintyy muitakin metotreksaatin muokattuja muotoja, kuten virtsan mukana eritettävä 7-hydroksyloitu metotreksaatti, mutta niitä emme käy läpi tässä työssä (Inoue & Yuasa, 2014).

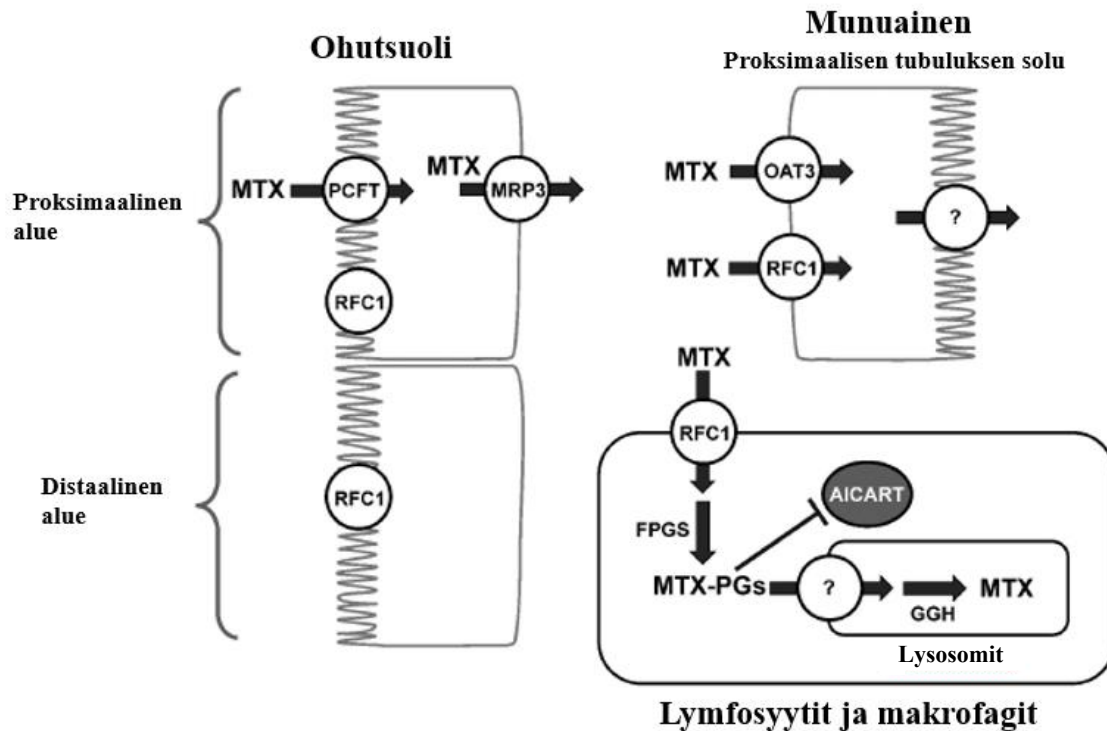
4.3. Metotreksaatin kuljetus

Kuten metotreksaatin rakennetta käsittelevässä luvussa todettiin, fysiologisessa ympäristössä metotreksaatti on hydrofiilinen ionisoituneista karboksyyli-ryhmistä johtuen. Tämän vuoksi on epätodennäköistä, että se kulkisi solukalvojen läpi diffuusiolla. Metotreksaatin kuljetus tapahtuu samaa reittiä pitkin kuin luonnollisten foolihapon johdannaisien ja useita metotreksaatin kuljetukseen osallistuvia kuljetusmolekyylejä onkin jo tunnistettu (Castillo & Moyano, 2012; Inoue & Yuasa, 2014).

Folaatit ja niiden johdannaiset kulkeutuvat soluihin pääasiassa pelkistetyn folaatin kantajaproteiinin (RFC) ja osittain folaattireseptorien (FR) välityksellä. RFC on solukalvon glykoproteiini, johon metotreksaatilla on korkea affiniteetti (Castillo & Moyano, 2012; Inoue & Yuasa, 2014). Ohutsuolesta metotreksaatti imeytyy PCFT:n ("Protein-coupled folate transporter") välityksellä, ja tämän transportterin ekspansion ja aktiivisuuden vaihtelevuus potilaiden välillä saattaa selittää tablettimuotoisen metotreksaatin biosaatavuuden vaihtelun (Inoue & Yuasa, 2014). Metotreksaatin kuljetus ulos solusta tapahtuu ABCC-transportterien välityksellä, joihin lukeutuu muun muassa kuvassa 3 esitetty enterosyytin solukalvolla oleva MRP3, joka kuljettaa ohutsuolesta imeytyneen metotreksaatin eteenpäin (Brown et al., 2016).

Munuaisissa sijaitseviin proksimaalisen tubuluksen soluihin metotreksaatin kuljettaa orgaanisten anionien kuljettajaproteiini 3 (OAT3) ja RFC1. Lymfosyytteihin ja makrofageihin metotreksaatti pääsee RFC1:n kuljettamana ja näissä soluissa metotreksaatti käy läpi polyglutamaation, jonka myötä sen poistuminen solusta ABCC-transportterin kuljettamana vähenee (Brown et al., 2016; Inoue & Yuasa, 2014). Polyglutamoitu metotreksaatti hajotetaan takaisin metotreksaatiksi lysosomeissa, mutta metotreksaatti_{Glu(1-7)}:n siirtymismekanismi

lysosomiin ei ole tiedossa (Inoue & Yuasa, 2014). Kuvassa 3 on esitetty kaavio, josta näkyy metotreksaatin kuljetus ja siihen osallistuvat kuljetusmolekyylit pääpiirteittäin.



Kuva 3. Metotreksaatin kuljetusta havainnollistava kaavio. Ohutsuolesta metotreksaatti imeytyy nopeasti PCFT-kalvoproteiinin välityksellä enterosyyttiin, josta se kuljetetaan eteenpäin MRP3:n toimesta. Munuaisiin metotreksaatti voi siirtyä joko OAT3:n tai RFC1:n kautta. RFC1 kuljettaa metotreksaatin lymfosyytteihin ja makrofageihin, joissa metotreksaatti muutetaan polyglutamoituun muotoon. Lysosomeissa polyglutamoitu metotreksaatti hajotetaan takaisin metotreksaatiksi. (Kuva muokattu ja teksti otettu lähteestä (Inoue & Yuasa, 2014))

4.4. Metotreksaatin erityys

Metotreksaatin erityys tapahtuu suurimmilta osin munuaisissa, eli pääasiassa metotreksaatti poistuu elimistöstä virtsan mukana. Yli 80 % metotreksaatista eritetään sellaisenaan ja noin 3 % 7-hydroksyloidussa muodossa (Inoue & Yuasa, 2014). Pieni mutta mahdollisesti merkittävä osa metotreksaatin erityksestä tapahtuu maksassa sappinesteen kautta. Mikäli potilaan munuaisten toiminta on vakavasti rajoittunut, metotreksaatin poistaminen elimistöstä sappinesteen mukana voisi tarjota vaihtoehdoisen reitin lääkeaineen eritykselle (Castillo & Moyano, 2012).

5. Metotreksaatin mahdolliset toimintamekanismit

Vaikka nivelreumaa on hoidettu metotreksaatilla jo vuosikymmeniä, ei sen toimintamekanismista olla vieläkään saatu varmuutta. Tässä luvussa käymme läpi erilaisia ehdotuksia metotreksaatin toimintamekanismiksi, joista eniten tieteellistä näyttöä on adenosiinisignaloinnin stimulaatiolla. Nykykäsityksen mukaan kuitenkin arvellaan metotreksaatin kokonaisvaikutuksen olevan useamman mekanismin summa (Brown et al., 2016).

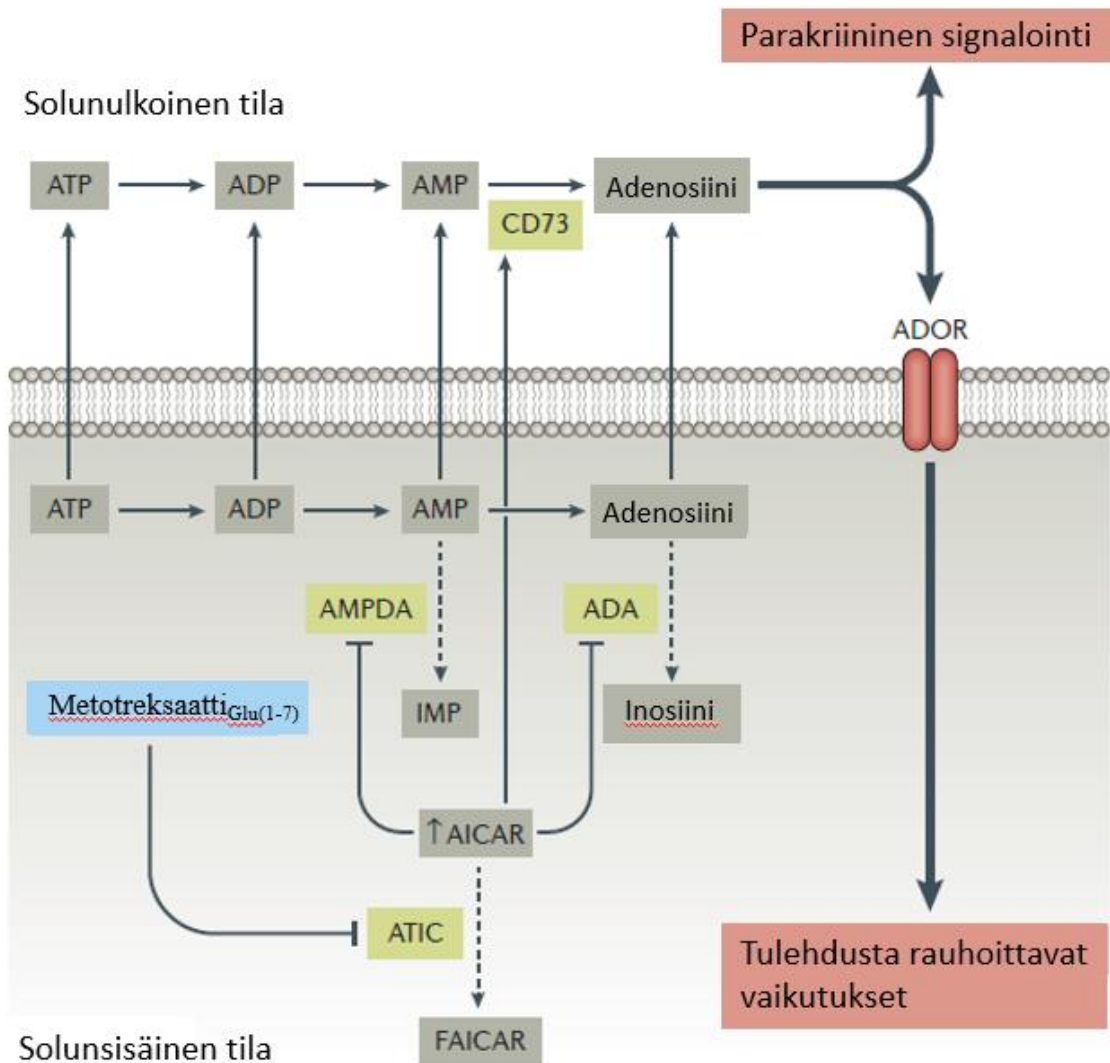
5.1. Folaatti antagonismi

Metotreksaatti on folaatin analogi, joka soluissa inhiboi folaattimetabolian avainentsyymejä. Näitä entsyymejä ovat dihydrofolaattireduktaasi (DHFR), tymidylaattisyntaasi (TYMS) jaATIC-entsyymi, jotka kaikki ovat tärkeitä puriinien ja pyrimidiinien synteesissä (Castillo & Moyano, 2012). Kun T-soluja käsiteltiin matalan annoksen metotreksaatilla, ATP:n ja GTP:n tuotanto laski samalla kun UTP:n synteesi lisääntyi (Liu, 2018). Tämä muutos puriinien ja pyrimidiinien metaboliassa vaikuttaa jakaantumisvaiheessa oleviin soluihin jakaantumista vähentävästi ja apoptoosia lisäten. Kun puriineja ja pyrimidiineja annettiin metotreksaatilla käsiteltyjen solujen käyttöön, metotreksaatin aiheuttama vaikutus solujen apoptoosiin kumoutui. Puriinien ja pyrimidiinien synteesin inhibitio ei kuitenkaan todennäköisesti ole merkittävä toimintamekanismi, sillä folaatin antaminen samanaikaisesti metotreksaatin kanssa ei heikennä metotreksaatin hoitovastetta (Brown et al., 2016).

5.2. Adenosiinisignaloinnin stimulaatio

Tällä hetkellä todennäköisin selitys metotreksaatin antireumaattisiin vaikutuksiin on adenosiinisignaloinnin stimulaatio. Adnosiini on tulehdusta rauhoittava signaalimolekyyli, joka vaikuttaa laajasti moniin immuunipuolustuksen soluihin. Metotreksaatti inhiboiATIC-entsyymin toimintaa, mikä johtaa 5-aminoimidatsoli-4-karboksiamidiribonukleotidin (AICAR) pitoisuuden nousuun ja solunulkoisen adnosiinin lisääntymiseen (Brown et al., 2016). Kuvassa 4 on esitetty metotreksaatin vaikutus adnosiinisignointiin.

Adenosiinin parakriininen signaali tapahtuu neljän purinergisen G-proteiiniin kytketyn reseptorin välityksellä: ADORA1, ADORA2A, ADORA2B ja ADORA3. Adenosiinin tulehdusta rauhoittavan vaikutuksen uskotaan syntyvän pääasiassa ADORA2A:n vaikutuksen kautta (Brown et al., 2016). Kaikkia neljää adenosiinireseptoria ilmenee nivelreumapotilaiden nivelkalvon soluissa, joista ADORA2A:n ja ADORA2B:n ekspresio on metotreksaattia saavien potilaiden soluissa korkeampi kuin hoitamattomissa potilaissa (Stamp et al., 2012).



Kuva 4. Metotreksaatin vaikutus adenosiinisignaaliin. Metotreksaatti estää ATIC-entsyymin toimintaa, jolloin AICAR kerääntyy solun sisälle. AICAR-pitoisuuden kasvu inhiboi adenosiinideaminaasia (ADA) ja AMP-deaminaasia (AMPDA), jolloin AMP:n reaktio IMP:ksi ja adenosiinin reaktio inosiiniksi estyy. AMP ja adenosiini kuljetetaan solun ulkopuolelle, jossa AMP muutetaan adenosiiniksi. Solun ulkopuolella oleva adenosiini toimii parakriinisena signaalimolekyylinä, joka vaikuttaa ympäröiviin soluihin adenosiinireseptorin välityksellä tulehdusta rauhoittavasti. (Kuva muokattu ja teksti otettu lähteestä (Brown et al., 2016))

5.3. Reaktiivisten happiradikaalien muodostus

Metotreksaattihoito lisää T-solujen apoptoosia annoksesta ja käyttöajasta riippuvaisesti. T-solujen apoptoosiin liittyy reaktiivisten happiradikaalien (ROS) tuotanto. Metotreksaatti voisi vaikuttaa näiden happiradikaalien muodostumiseen joko polyamiinien antagonismin seurauksena tai tetrahydrobiopteriinin saatavuuteen vaikuttamalla. Tetrahydrobiopteriini on endoteelisen typpioksidisyntaasin (eNOS) ligandi. Tetrahydrobiopteriini voi reagoida dihydrobiopteriiniksi ja takaisin tetrahydrobiopteriiniksi. Dihydrobiopteriinin reagoimista tetrahydrobiopteriiniksi katalysoi DHFR, jonka toimintaa metotreksaatti inhiboi. Tämä inhibitio saattaa johtaa tetrahydrobiopteriinin pitoisuuden laskuun, eNOS:n aktiivisuuden vähenemiseen ja reaktiivisten happiradikaalien lisääntymiseen (Brown et al., 2016).

5.4. Metyyliryhmän luovuttajien tuotannon inhibitio

Metylaatioreaktiot ovat biologisesti tärkeitä reaktioita, joissa molekyyliin lisätään metyyliryhmä. Tärkein metyyliryhmän luovuttaja soluissa on S-adenosyylimetioniini, jonka tuotannossa DHFR on suuressa roolissa (Brown et al., 2016). Metotreksaatti inhiboi DHFR:n toimintaa kilpailemalla sitoutumispaikoista dihydrofolaatin kanssa ja näin estää tetrahydrofolaatin synteesin (Castillo & Moyano, 2012). DHFR:n katalysoimassa reaktiossa muodostuva tetrahydrofolaatti on välttämätön s-adenosyylimetioniinin tuotannolle, joka taas toimii metyyliryhmän luovuttajana polyamiinien synteesissä. Polyamiinien määrä nivelnesteessä on nivelreumapotilailla korkeampi ja metotreksaatin on todettu vähentävän niiden määrää. Yksi mahdollinen metotreksaatin vaikutusmekanismi on siis polyamiinien synteesin inhibitio metyylinluovuttajien tuotannon estämisen kautta (Brown et al., 2016).

5.5. Eikosanoidien ja matriksin metalloproteinaasien downregulaatio

Metotreksaattihoito vähentää eikosanoidien ja matriksin metalloproteinaasien (MMP) määrää. Esimerkiksi prostaglandiini E2:n tuotanto on alhaisempaa metotreksaattia käyttävissä nivelreumapotilaissa kuin terveissä yksilöissä. Myös veren MMP-pitoisuus laskee metotreksaattihoiton myötä. Kun varhaista nivelreumaa sairastavien MMP-pitoisuuksia mitattiin seerumista, MMP1, MMP3, MMP9 ja MMP13 pitoisuudet olivat merkittävästi alhaisemmat 6 kuukautta hoidon aloittamisen jälkeen kuin ennen metotreksaattihoitoa. Nämä metotreksaatin aikaansaamat muutokset eikosanoidien ja matriksin metalloproteinaasien tuotannossa lievittävät tulehdusta ja ehkäisevät rustokudoksen vaurioitumista. Varmaa ei kuitenkaan ole onko kyseessä varsinainen toimintamekanismi vai ei (Brown et al., 2016).

5.6. Sytokiiniprofiilin muokkaus

Metotreksaatilla on inhiboiva vaikutus tulehdussolujen sytokiinituotantoon. Metotreksaattia käyttävän nivelreumapotilaan T-solujen sytokiinien tuotanto on heikompa verrattuna metotreksaattia käyttämättömän potilaan T-soluihin. Näitä inhiboivia sytokiineja ovat pääasiassa IFN γ , IL-4 ja IL-13, mutta myös tuumorinekroositekijän (TNF) tuotanto on vähäisempää metotreksaatilla käsitellyissä soluissa (Gerards, 2003). Tutkimusten mukaan jopa yksi kerta-annos metotreksaattia voi vähentää tulehdusta lisäävien sytokiinien tuotantoa. Jotkut arvelevat, että metotreksaatti vaikuttaisi yleisesti sytokiiniprofiiliin inhiboimalla NF- κ B:n aktiivisuutta, mutta tarkkaa tietoa metotreksaatin vaikutusmekanismista sytokiinien tuotantoon ei ole (Brown et al., 2016).

5.7. Adheesiomolekyylien ekspression downregulaatio

Metotreksaatin käytön seurauksena vähentynyt adheesiomolekyylien tuotanto saattaa estää solujen välistä vuorovaikutusta, joka on välttämätöntä tulehdusreaktiossa (Brown et al., 2016). Kun nivelistä otettiin näytteet ennen ja 16 viikkoa jälkeen metotreksaattihoidon aloituksen, huomattiin että E-selektiinin ja verisuonisolujen adheesiomolekyylin (VCAM-1) määrä laski hoidon myötä. Tämän lisäksi IL-1:n, TNF:n ja tulehdussolujen määrä nivelissä oli alhaisempi hoidon jälkeen otetuissa näytteissä (Dolhain et al., 1998). Metotreksaatin tulehdusta rauhoittava toimintamekanismi voisi siis perustua adheesiomolekyylien tuotannon laskemiseen, mikä taas vuorostaan vähentäisi tulehdussolujen kulkeutumista niveliin (Brown et al., 2016).

6. Metotreksaatin tulevaisuus nivelreuman hoidossa

Matalan annoksen metotreksaatti on ollut virallisessa käytössä nivelreuman hoidossa jo yli 30 vuoden ajan ja se on ensisijainen lääke, jolla nivelreuman hoito aloitetaan. Metotreksaatti on edullinen ja sillä saadaan hyviä hoitotuloksia, mutta potilaista noin 10–20 % ei siedä hoidon toimivuuden kannalta riittävän suurta metotreksaattiannosta (Castillo & Moyano, 2012; Rantalaiho et al., 2017). Metotreksaatin toimintamekanismi ei ole tiedossa ja sen haittavaikutuksiin lukeutuu vakaviakin oireita, kuten esimerkiksi muutoksia maksakudoksessa (Brown et al., 2016; Castillo & Moyano, 2012). Yleisesti ottaen metotreksaatti on siis tehokas ja hyvin siedetty lääke, mutta joissain tapauksissa sen käyttö ei ole potilaan edun mukaista esimerkiksi vaikeiden haittavaikutusten vuoksi. Tällöin joudutaan turvautumaan muihin antireumaattisiin lääkkeisiin, jotka eivät välttämättä ole teholtaan ja toimivuudeltaan samaa tasoa metotreksaatin kanssa.

Toistaiseksi metotreksaatin toimivuutta yksittäisessä potilaassa ei voida ennustaa. Jos juuri sairastuneen hoito aloitetaan metotreksaatilla eikä sillä saavuteta hoitotuloksia, voi tämä johtaa sairauden ennusteen huonontumiseen (Brown et al., 2016; Rantalaiho et al., 2017). Jos metotreksaatin toimivuutta potilaassa pystyttäisiin ennustamaan, voitaisiin metotreksaatista epätodennäköisesti hyötyville määrätä heti alussa jotain toista lääkettä, jolloin sairaus olisi mahdollista saada kuriin aiemmin. Yksi mahdollisuus ennustaa metotreksaatin toimivuutta voisi olla tutkia metotreksaatin kuljetukseen osallistuvien kuljetusmolekyylien ekspressiota ja aktiivisuutta potilaassa ennen lääkityksen aloittamista (Inoue & Yuasa, 2014).

Yksi merkittävä muuttuja metotreksaatin johtavan aseman jatkuvuuden kannalta on nivelreuman patogeneesin selvittäminen. Mikäli nivelreuman syntymekanismi saadaan tulevaisuudessa selville, mahdollistaisi tämä spesifisten lääkeaineiden kehittämisen tai jopa sairauden parantamisen. Metotreksaatti ainoastaan lievittää nivelreuman oireita parantamatta sitä ja sen käytön riskit tekevät siitä jokseenkin epäviehättävän lääkkeen. Se on kuitenkin jo vuosikymmenien ajan parantanut nivelreumaa sairastavien elämänlaatua ja säilyttänyt heidän työkykynsä. Huolimatta uusien synteettisten ja biologisten lääkkeiden ilmestymisestä markkinoille, metotreksaatti on onnistunut säilyttämään vahvan asemansa nivelreuman peruslääkkeenä. Lähitulevaisuudessa metotreksaatin asema tulee tuskin muuttumaan, mutta tiedon lisääntyessä ja lääkekehityksen myötä on hyvin todennäköistä, että metotreksaatti menettäisi johtavan asemansa nivelreuman hoidossa.

7. Kirjallisuusviitteet

- Ai, R., Hammaker, D., Boyle, D. L., Morgan, R., Walsh, A. M., Fan, S., & Wang, W. (2016). Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. *Nature Communications*, 7 doi:10.1038/ncomms11849
- Brown, P. M., Pratt, A. G., & Isaacs, J. D. (2016). Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews. Rheumatology*, 12(12), 731-742. doi:10.1038/nrrheum.2016.175
- Castillo, V. S., & Moyano, L. A. (2012). *Methotrexate: Pharmacology, clinical uses, and adverse effects*. New York: Nova Science Publishers.
- Dolhain, R. J., Tak, P. P., Dijkmans, B. A., De Kuiper, P., Breedveld, F. C., & Miltenburg, A. M. (1998). Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*, 37(5), 502-508. doi:10.1093/rheumatology/37.5.502
- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 46(2), 183-196. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006
- Gerards, A. H. (2003). Inhibition of cytokine production by methotrexate. studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*, 42(10), 1189-1196. doi:10.1093/rheumatology/keg323
- Inoue, K., & Yuasa, H. (2014). Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 12-19. doi:N/JST.JSTAGE/dmpk/DMPK-13-RV-119 [pii]
- Liu, S. (2018). *Rheumatoid arthritis*. New York, NY: Humana Press.

- Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A., Nicholas, A. P., Zendman, A. J. W., Eklund, A., & Catrina, A. I. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(10), 1488-1492. doi:10.1136/ard.2007.075192
- Orion Corporation. (2015). Riskinhallintasuunnitelman julkinen yhteenveto trexan 25mg/ml, injektioneste, liuos, esitäytetty ruisku. Retrieved from https://www.fimea.fi/documents/160140/744738/29077_Trexan_RMP_summary_FI.pdf
- P. T. Ravi Rajagopalan, Zhiquan Zhang, Lynn McCourt, Mary Dwyer, Stephen J. Benkovic, & Gordon G. Hammes. (2002). Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 99(21), 13481-13486. doi:10.1073/pnas.172501499
- Rantalaiho, V., Sokka, T., & Meri, S. (2017). Nivelreuma. Retrieved from <https://www.duodecimlehti.fi/duo13915>
- Stamp, L. K., Hazlett, J., Roberts, R. L., Frampton, C., Highton, J., & Hessian, P. A. (2012). Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: A basis for methotrexate action. *Arthritis Research & Therapy*, 14(3), R138. doi:10.1186/ar3871
- Weisman, M. H. (2011). *Rheumatoid arthritis* Oxford University Press, USA.