

Suolen tulehduksen laatu alle 16-vuotiaana colitis ulcerosan takia paksusuolen poistoleikkauksen läpikäyneillä potilailla 10 vuoden seuranta-ajan jälkeen

Maija Piekkala lääketieteen kandidaatti

opiskelijanumero: 013447799

Helsinki 25.8.2009

Tutkielma

Ohjaaja: Kaija-Leena Kolho dosentti, lasten gastroenterologian erikoislääkäri

kaija-leena.kolho@hus.fi

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Lääketieteellinen tiedekunta		Lastentaudit	
Tekijä – Författare – Author			
Maija Piekkala			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Suolen tulehduksen laatu alle 16-vuotiaana colitis ulcerosan takia paksusuolen poistoleikkauksen läpikäyneillä potilailla 10 vuoden seuranta-ajan jälkeen			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level		Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
tutkielma		8/2009	24
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Matriksin metalloproteinaaseilla (MMP:t) on osoitettu olevan roolia tulehduksellisessa suolistosairaudessa tapahtuvassa kudoksen tuhoutumisessa ja korjaantumisessa. Tutkimukseni tavoitteena oli verrata paksusuolen poistoleikkauksen jälkeisen, ohutusuoletta rakennetun pussin tulehduksen MMP-esiintyvyyttä colitis ulcerosassa havaittavaan MMP-esiintyvyyteen.</p> <p>MMP-3,-7,-8,-9,-12,-26 ja TIMP-1,-2,-3 esiintyvyys tutkittiin immunohistokemiallisesti 36 formaliinifiksoidusta parafiiniin valetusta näytteestä. Näytteistä 8 oli Crohnin taudista ja 28 CU:sta. Näytteet arvosteltiin semikvantitatiivisesti. Crohn -näytteet olivat mukana vertailua varten.</p> <p>Epiteelissä esiintyi MMP-3:sta, MMP-7:ää, MMP-12:sta ja TIMP-3:sta ja stroomassa MMP-9:ää, MMP-12:sta ja TIMP-3:sta. TIMP-2 esiintyminen epiteelissä oli voimakkaampaa näytteissä, joissa kalprotektiini oli koholla ($\geq 100 \mu\text{g/g}$). MMP-3:n esiintyminen epiteelissä oli voimakkaampaa tulehtuneissa näytteissä. MMP-3:n, MMP-7:n ja MMP-26:n esiintyminen epiteelissä ja MMP-9:n stroomassa liittyivät suolen funktionaaliseen toimintaan.</p> <p>Pussiitti-tulehdus ei näytä olevan CU:n tai Crohnin taudin ilmentymä vaan omanlaisensa tulehdus, joka muistuttaa näitä. sanoja: 118</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
MMP, TIMP, CU, pussiitti, lapset			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Lastentautien laitoksen arkisto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1	Johdanto.....
2	Aineisto.....
3	Menetelmä.....
4	Tulokset.....
	4.1 MMP-3.....
	4.2 MMP-7.....
	4.3 MMP-8.....
	4.4 MMP-9.....
	4.5MMP-12.....
	4.6 MMP-26.....
	4.7 TIMP-1.....
	4.8 TIMP-2.....
	4.9 TIMP-3.....
	4.10 Colitis ulcerosan ja Crohnin taudin tulosten vertailu.....
5	Pohdinta.....
6	Lähteet.....

1 Johdanto

Tulehduksellinen suolistosairaus (IBD) on yhteisnimitys Crohnin taudille ja colitis ulcerosalle (CU) eli haavaiselle paksusuolen tulehdukselle. IBD alkaa useimmiten nuoruusiässä, mutta 15 - 25 % sairastuneista on alle 18-vuotiaita (1). Sairaudet yleistyvät länsimaissa tuntemattomista syistä. Sairauksien etiologia on tuntematon, mutta teorian mukaan niiden taustalla on suolen limakalvon puolustusjärjestelmän pettäminen jonkin ulkoisen tekijän kuten toksiinin tai tuntemattoman patogeenin vaikutuksesta (2). CU on rektumin ja koolonin tauti, jossa tulehdus rajoittuu suolen limakalvoon. Crohnin tauti voi vaurioittaa koko ruuansulatuskanavaa aina suusta peräaukkoon. Tulehdus voi ulottua koko suolen seinämän läpi kaventaen suolen luumenia ja aiheuttaen fibroosia. (3) Perintötekijöillä on todettu altistavaa vaikutusta, sillä lähisukulaisen sairaus lisää riskiä taudin kehittymiselle. On etsitty myös riskitekijöitä, jotka altistaisivat taudin kehittymiselle varhaislapsuudessa. Tällaisina on pidetty varhaislapsuuden infektioita, allergisia sairauksia ja vanhempien tupakointia. Yhteydet eivät kuitenkaan ole tilastollisesti merkittäviä. (2), (4)

Alle 18-vuotiaita potilaita, jotka sairastavat tulehduksellista suolistosairautta, on Kelan tilaston mukaan tällä hetkellä noin 2000 (2). Colitis ulcerosa on Suomessa kaksi kertaa yleisempi lapsilla kuin Crohnin tauti ja sen taudinkulku on heillä aggressiivinen (4). Crohnin tautikin ilmenee lapsilla ja nuorilla usein koliittiina, joten erotusdiagnostiikka on heillä hyvin haastavaa. Tavallisimmat oireet ovat ripuli, veriset ulosteet, vatsakipu ja ulostuspakko. Oireet vaihtelevat päivittäin, mutta monilla stressi pahentaa niitä. Lisäksi Crohnin tauti aiheuttaa kasvun hidastumista sekä ravitsemusongelmia. Kroonisen sairauden hankalat oireet ovat rankkoja varsinkin nuorille. Monet häpeävät sairauttaan ja voivat eristäytyä. Taudinkulku on vaikeasti ennustettavissa ja pahenemisvaiheiden arvioiminen on toistaiseksi mahdotonta. (2), (4)

Tulehduksellisiin suolistosairauksiin ei ole parantavaa lääkitystä. Lievässä vaiheessa aloitetaan ylläpitolääkityksenä 5-ASA-valmiste. Tilanteen pahentuessa hoitoon lisätään glukokortikoidi. Immunosuppressiivisia lääkkeitä, kuten metotreksaattia ja TNF-alfasalpaajaa, käytetään vaikeassa Crohnin taudissa. Jos oireet jatkuvat lääkityksestä huolimatta tai kehittyä glukokortikoidiriippuvuus, voidaan joutua poistamaan koko

paksusuoli tulehduksen rauhoittamiseksi. Jopa 24 %:lle potilaista tehdään leikkaus keskimäärin 8 vuotta taudin toteamisen jälkeen. (2), (5)

Vuoden 1985 jälkeen paksusuolenpoiston suolireservuraari on useimmiten rakennettu ns. J-pussiteknikalla, jossa ohutsuoli yhdistetään anaalikanavan yläosaan. Näin potilaat välttävät pysyvän avanteen (6). 10-vuotisseurantatutkimuksessa on selvitetty lapsipotilaiden elämäntilannetta leikkauksen jälkeen. Suurimmalla osalla potilaista pussi toimii siten, että ulostustiheys, pidätyskyky ja elämänlaatu ovat hyväksyttävällä tasolla. Kuitenkin 73 %:lle leikkauksen läpikäyneistä kehittyy pussiin tulehdus eli pussiitti. Oireet ovat samankaltaisia kuin lähtötaudissa eli ripulia, vatsakipuja ja pidätysvaikeuksia. Joillekin kehittyy hankalia oireita ja kroonisia tulehdusmuutoksia. Tulehdus hoituu usein antibiootilla, mutta voi uusiutua. Ei tiedetä johtuuko tulehdus perustaudin aktivaatiosta vai epäspesifisestä muutoksesta. (7), (4), (5)

Tulehduksen toteamisessa, myös ennen leikkausta, ovat apuna uudet ulostetestit, joilla voidaan epäsuorasti arvioida pussiitin tai suolen tulehduksen astetta. Näistä tärkein on ulosteen kalprotektiinimääritys. Neutrofiilit vapauttavat kalprotektiinia suolen luumeniin tulehdusalueilla. Kalprotektiinin määrä kertoo tutkimusten mukaan pussiitin vaikeusasteesta ja määrän pitoisuuden kasvu on yhteydessä pussiittien uusiutumislle. (2)

Kudostasolla suolen tulehduksen laatua on tutkittu matriksin metalloproteiinaasien (MMP) esiintymisellä tulehtuneessa suolessa. MMP:t ovat ryhmä sinkkisormientsyymejä, jotka pystyvät pilkkomaan lähes kaikkia soluväliaineen ja tyvikalvon rakenneosasia kuten kollageenia, proteoglykaaneja, fibronktiinia, elastiinia ja laminiinia. (8) Monet soluväliaineen solut (lymfosyytit, polymorfonukleaariset neutrofiilit, makrofagit, sileät lihassolut) tuottavat niitä tulehdusreaktion seurauksena (9). Ne osallistuvat solujen vaeltamiseen, verisuonten uudelleen muodostumiseen sekä kudosten hajottamiseen ja uudelleen muodostamiseen. Joitakin MMP:ejä on myös tulehduksettomassa suolessa, sillä ne pitävät yllä soluväliaineen luonnollista tasapainoa, toiset taas aktivoituvat tulehduksessa (8), (10). Matriksin metalloproteiinaaseilla on osoitettu olevan merkitystä ulkoisen soluväliaineen hajoamisessa myös reumatoidi artriitissa, osteoartriitissa, ateroskleroosissa, syöpäsolujen invaasioissa ja metastoimisessa (11).

MMP -spesifisinä estäjinä toimivat TIMP:it (tissue inhibitors of metalloproteinases). Tähän mennessä on löydetty neljä inhibiittoria (TIMP-1, -2, -3, -4). TIMP:it estävät MMP:ien entsyymaattisen aktiivisuuden sitoutumalla kovalenttisesti niiden aktiiviseen kohtaan stoikiometrialla 1 suhde 1. Yleisesti TIMP:it pystyvät estämään kaikkien MMP:ien aktiivisuuden, joillakin poikkeuksilla. (12), (10) Tasapaino estäjien ja matriksin metalloproteinaasien välillä on tärkeä tekijä suolen tulehduksen synnyssä. Jos estäjää on liian vähän, pääsevät MMP:t aiheuttamaan kudonvauriota (8). TIMP:ien lisäksi on myös muita MMP:ien estäjiä, kuten seriini proteaasin estäjät, joihin kuuluvat α 1- antitrypsiini ja plasminogeenin aktivaation estäjät -1 ja -2. Nämä säätelevät epäsuorasti MMP- aktiivisuutta estämällä plasminogeenin aktivaation. (12) Yleinen proteaasi inhibiittori α 2- makroglobuliini voi toimia myös MMP –estäjänä (10), (12). α 2- makroglobuliini toimii pääasiallisesti kudonesteissä, toisin kuin TIMPit, jotka toimivat lähinnä paikallisesti (12).

Yleisesti MMP:eja tuotetaan lepäävässä kudoksessa vain vähän, mutta niiden tuotanto voi huomattavasti kasvaa useiden tulehdussolujen tuottamien sytokiinien ja kasvutekijöiden (esim. TNF- α , EGF, FGF ja TGF- β) vaikutuksesta. Myös kemikaalit ja UV-säteily voivat aktivoida MMP -tuotantoa. Aktivointi tapahtuu vaikuttamalla MMP:ien geenisäätelyyn. Säätely on soluspesifistä, sillä esim. jokin sytokiini voi lisätä MMP -tuotantoa toisessa solussa ja vähentää sitä toisessa. (12), (9)

MMP:t eritetään epäaktiivisina esientsyymeinä, poikkeuksena kuitenkin MMP -11, -23, -28, joita aktivoivat Golgin furiini proteaasit ennen eritystä tai sen aikana. MMP:t voivat aktivoida toisten MMP:ien esimuotoja. Lisäksi plasmiini, trypsiini, kymaasi ja syöttösolu tryptaasi aktivoivat MMP:ien esimuotoja. Myös ei-proteolyttiset aineet kuten merkuriaaliset yhdisteet, reaktiivinen happi tai denaturantit lisäävät MMP:ien määrää. (12), (9), (10) Kovalenttisen sidoksen hajoaminen kysteiinitähteen ja Zn^{2+} välillä vaaditaan aktivaatioon (12). MMP:ien proteolyttinen aktiivisuus määräytyy siis sen mukaan, paljonko MMP:ien esimuotoja aktivoidaan ja paljonko MMP:eja inhiboidaan niiden estäjillä (8).

Tulehduksellisissa suolistosairauksissa MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12 pitoisuudet ovat kasvaneet suolessa. Kohonneet pitoisuudet ovat positiivisessa yhteydessä tulehduksen määrään suolessa. (8) Myös TIMP:ien pitoisuus kasvaa, mutta ei riittävästi estääkseen

MMP:ien aiheuttaman kudostuhon (26). Erityisesti on osoitettu, että MMP-1 ja TIMP-1 suhde sekä MMP-3 ja TIMP-1 suhde ovat kohonneet IBD:ssä. (13), (10), (14), (15) On myös osoitettu, että yhdessä MMP:ien määrän kasvun kanssa lisääntyy myös niiden toiminnallinen aktiivisuus, kun tulehdus suolessa pahenee (26). Colitis ulcerosa ja Crohnin tauti eivät eroa MMP -profiilissaan merkittävästi (16), (26). MMP:t ovat tärkeimpiä proteaaseja IBD:n patogeneesissä, sillä ne vaikuttavat soluväliaineen hajottamisen lisäksi myös tulehdussolujen toimintaan ja vaellukseen sekä limakalvon haavautumiseen (8), (11). Synteettisiä MMP -estäjiä (Marimastat ja Batimastat) on tutkittu hiiritutkimuksilla ja lupaavia tuloksia on saatu, sillä IBD:n aktiivisuus on vähentynyt, mutta lisätutkimuksia tarvitaan (8), (11).

On tutkittu myös, miten MMP:ien ja TIMP:ien esiintyminen suolessa vaikuttavat leikkauksen jälkeiseen taudin uusiutumiseen Crohn -potilailla. Suojaa antavat kohonneet TIMP-1, TIMP-2 ja MMP-9 pitoisuudet normaalissa suolessa. Toisaalta, jos pitoisuudet ovat matalat taudin uusiutumisen riski kasvaa, heijastaen muutosta MMP ja TIMP tasapainossa. (17)

Matriksin metalloproteinaasien esiintymistä pussiitissa on tutkittu vasta vähän. On kuitenkin osoitettu, että MMP-1 ja MMP-2 määrät ovat kohonneet. Pussiitissa IL-1 ja interferoni γ pitoisuudet ovat myös koholla. Näiden sytokiinien on osoitettu aktivoivan matriksin metalloproteinaasien tuotantoa. (18)

Tässä tutkimuksessa keskityimme kuuteen matriksin metalloproteinaasiin MMP-3, -7, -8, -9, -12, -26 ja kolmeen niiden spesifiseen estäjään TIMP-1, -2 ja -3. Tärkeimmiksi erotusdiagnoositiikan kannalta nousevat MMP-9 ja MMP-3, joiden määrät kohoavat IBD:ssä eniten. (8) MMP-3 on raportoitu osallistuvan Crohnin taudissa esiintyvien fistuloiden muodostumiseen riippumatta tulehduksen laadusta. MMP-9 tekee samaa, mutta vain taudin akuutissa vaiheessa. (19) MMP-7 esiintyy normaalistikin suolessa, mutta sen määrä kohoaa tulehduksessa. Sitä on havaittu yhdessä MMP-26 kanssa haavojen reuna-alueilla ja onkin ajateltu, että nämä MMP:t osallistuisivat tuhoamisen sijaan haavan paranemiseen. (8), (20), (21), (22) Matriksin metalloproteinaaseja on käsitelty tarkemmin taulukossa 1. (8)

taulukko 1 Matriksin metalloproteinaasien kohdemolekyylit, erittävät solut ja tehtävät

		erittävät solut		tehtävät	
	kohdemolekyyli	normaali suoli	IBD	normaali suoli	IBD
MMP-3	proteoglykaani, kollageeni IV, V IX ja X, laminiini, fibronktiini, prokollageeni I ja III	fibroblastit, epiteliaaliset solut	lamina propria, soluväliaineen solut, mononukleaariset makrofagit	esiintyy vähän, hajottaa kemokiineja, sytokiinejä	fistuloiden muodostaminen mahdollistaa kudostuhon neutrofiilien vaellus
MMP-7	kollageenit, liukenemattomat elastiinit, proteoglykaanit, laminiini, fibronktiini, kaseiini	epiteliaaliset solut	koolonin epiteliaaliset solut	ottaa osaa immuunivasteeseen, haavan paraneminen ja korjaantumisen	ei määritetty, saattaa osallistua haavan paranemiseen
MMP-8	kollageeni I,II,III,VII,VIII IX,X	ei havaita	mesenkymaaliset ja epiteliaaliset solut	esiintyy vähän, hajottaa ECM	ei vielä määritetty
MMP-9	denatoroitunut kollageeni I-IV gelatiini, laminiini	neutrofiilit, makrofagi osteoklastit	epiteliaaliset solut tulehdussolut	esiintyy vähän, auttaa luiden kasvussa	aiheuttaa kudostuhoa kolitissa, estää haavan paranemista angiogeneesiä, metastoimista
MMP-12	elastiini, kollageeni IV, laminiini, fibronktiini, vitronektiini, hepariini, kondroitti sulfaatti	makrofagit	makrofagin kaltaiset solut lamina propriassa, makrofagit	esiintyy vähän, makrofagien vaellus	saattaa osallistua makrofagien vaellukseen
MMP-26	kollageeni IV, gelatiini, fibronktiini ja fibrini		vaeltavat enterosyytit		ei määritetty, saattaa osallistua haavan paranemiseen

MMP= matriksin metalloproteinaasi

IBD= tulehduksellinen suolistosairaus

ECM= ulkoinen soluväliaine

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia suolistossa esiintyvän pussiitti -tulehduksen laatua tarkemmin. Tarkoituksena oli selvittää tulehduksen MMP- ja TIMP- profiili ja katsoa muistuttaisiko se mitään IBD tulehdustyyppejä. On tärkeää saada tulehduksen laatu selville, jotta voitaisiin ymmärtää, miten tulehdusta voitaisiin hoitaa ja ennaltaehkäistä mahdollisimman tehokkaasti.

2 Aineisto

Kaikkien vuosina 1985- 2005 TaYs:ssa ja Lastenlinikalla (HYKS) alle 16-vuotiaana paksusuolen poistoleikkauksen colitis ulcerosan takia läpikäyneiden potilaiden osoitetiedot etsittiin Väestörekisterikeskuksesta. Heitä löytyi 81, joista yksi oli kuollut muuhun kuin IBD:stä johtuvaan syyhyn ja yksi muuttanut ulkomaille. Kutsu lähetettiin

postitse seurantakäynnille tutkimusta koskien 79 potilaalle vuonna 2006. 35 potilasta (44,3 %) osallistui. Potilaista 28:lla oli edelleen diagnoosina CU, mutta 7 potilaan diagnoosi oli vaihtunut Crohnin taudiksi. Otimme Crohn- potilaat mukaan vertailun vuoksi. Yhdestä Crohn -potilaasta oli 2 näytettä.

Kaikista CU potilaista 9 oli miestä ja 19 naista. Potilaiden ikä vaihteli välillä 9,5 - 35,5 (mediaani 26,2). Sairaus oli diagnosoitu, kun potilaat olivat 0,9 – 13,9 –vuotiaita (mediaani 11,75). Heidät oli leikattu 2 - 19 –vuotiaina (mediaani 13). Crohn-potilaista 4 oli miestä ja 3 naista iän vaihdellessa välillä 12 - 28,9 vuotta (mediaani 18,4). Potilaille oli diagnosoitu Crohnin tauti 5 – 28,3-vuotiaina (mediaani 10,7). Heidät oli leikattu 8 - 14-vuotiaina (mediaani 10). (taulukko 2)

Potilaat vastasivat kyselyyn, jossa kysyttiin alkuperäisestä ja nykyisestä diagnoosista, leikkauksen tyypistä, komplikaatioista, lääkähoidosta ja suolen toiminnasta. Suolen toimintaa liittyvät kysymykset käsittelivät pussiitin esiintymistä, oireita ja hoitoa. Heiltä kysyttiin myös ulostustiheydestä, tahrimisesta, ulosteen koostumuksesta, ulostuspakosta sekä hoidoista ja lääkityksestä, jota he käyttävät ulostustiheyden hallintaan. Käynnin yhteydessä otettiin koepala suolesta, verikokeet ja ulostenäytteet.

Pussiitteja oli ollut 39 %:lla potilaista ja 35,7 % tulkitse ei niitä ollut ollut. 25 % potilaista ei tiennyt oliko heillä ollut pussiittia. Säännöllistä lääkitystä tulehdukselliseen suolistosairauteen käytti tutkimushetkellä 6/28 (21,4 %). Suolen toimintaan lääkitystä tarvitsi jatkuvasti 5/28 (18,5 %), joskus 8/28 (29,6 %) ja ei koskaan 15/28 (55,6 %) Ulostusnäytteestä mitattu kalprotektiinin pitoisuus oli koholla normaaliin verrattuna (100 µg/g) 20/28 (71,4 %) potilaalla (taulukko 2)

taulukko 2 potilastiedot

CU- potilaat		
muuttuja	vaihteluväli	
lukumäärä	32	
miehiä	9	
naisia	19	
ikä (tutkimushetki, vuosia)	26,2	9,5 - 35,5
ikä (kolektomiahetki, vuosia)	13	2 - 19
diagnoosi-ikä (vuosia)	11,75	0,9 - 13,9
kalprotektiini (µg/g)	97	12 - 1953
crp (mg/l)	19,6	0 - 19
lasko (mm/h)	13,5	2 - 69
Crohn -potilaat		
muuttuja	vaihteluväli	
lukumäärä	7	
miehiä	4	
naisia	3	
ikä (tutkimushetki, vuosia)	18,4	12 - 28,9
ikä (kolektomiahetki, vuosia)	10	8 - 14
diagnoosi-ikä (vuosia)	10,7	5 - 28,3
kalprotektiini (µg/g)	334	155 - 859
crp (mg/l)	0,95	0,4 - 6,4
lasko (mm/h)	11	1 - 37

Tulokset muodossa mediaani ja vaihteluväli

CU= colitis ulcerosa

crp= c-reaktiivinen proteiini

3 Menetelmät

Tässä tutkimuksessa parafiiniin valetuista ja formaliiniin fiksoiduista koepaloista, tutkittiin immunohistokemiallisin menetelmin MMP -3, -7, -8, -9, -12, ja -26 sekä näiden spesifisien estäjien TIMP -1, -2 ja -3 esiintymistä tulehtuneessa kudoksessa. Käytettävät tekniikat olivat: streptaviini -biotini -peroksidaasi tekniikka (DakoCytomation, StreptABComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Glostrup, Denmark; ja Elite goat Vectastain ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) ja vasta-ainepolymeeri tunnistustekniikka (ImmPRESS universal reagent, Anti-Mouse/Rabbit IG, Vector laboratories Burlingame, CA, USA). Diaminobentsiiniä (DAB) tai Vector® NovaREDiä käytettiin kromogeenisina substraatteina ja Mayerin hematosykliiniä vastavärinä. Monoklonaalisia vasta-aineita käytettiin värjäämään MMP-7 (1:600, MAB3315, Millipore, Temecula, California, 92590), MMP-8 (1:100, IM38, Calbiochem) MMP-9 (1:100, MS-569, Lab Vision Corporation Neomarkers, 47790 Westinghouse Dr. Fremont, CA, USA), MMP-12 (1:80, sc-12361, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) TIMP-1 (1:50, IM63, Calbiochem) TIMP-2(1:600, IM56, Calbiochem) ja TIMP-3 (IM43L, Calbiochem) ja polyklonaalista vasta-ainetta värjäämään MMP-3 (1:50 Abcam Ltd, 332 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FW, UK) MMP-26 (1:120, lahja Prof. K. Isaka, Tokyo Medical University). MMP-9 esikäsiteltiin 1 % trypsiiniliuoksessa 30 minuuttia +37 °C:ssa ja MMP-3, MMP-7, MMP-12 MMP-26, TIMP-1, TIMP-2 ja TIMP-3 esikäsiteltiin +95 °C vesihauteessa 30 minuuttia (Dako retrieval solution pH 6; Dakocytomation). Inkubaatio -olosuhteet vasta-aineille olivat: +4 °C:ssa yön yli MMP-7:lle, MMP-9:lle, MMP-12, TIMP-1:lle, TIMP-2:lle ja TIMP-3:lle, 1tunti 45 minuuttia 37 °C:ssa MMP-8:lle ja MMP-26:lle ja 1 tunti huoneenlämmössä MMP-3:lle. Kaikissa värjäyssarjoissa värjättiin positiivinen kontrolli jokaiselle MMP:lle. Kontrolleina käytettiin näytteitä hailey-haileystä, pyoderma gangerosumista ja dermatitis herpetiformeksesta MMP-3:lle, ruokatorven syövästä MMP-7:lle ja MMP-8:lle, kroonisesta haavasta MMP-9:lle, vierasesine-reaktiosta MMP-12:lle, endometriumista MMP-26:lle, Morbus Bowenista TIMP-1:lle ja kroonisesta haavasta TIMP-2:lle ja TIMP-3:lle

Immunohistokemialliset näytteet tulkitsivat kaksi eri tutkijaa semikvantitatiivisesti valomikroskoopilla x 100 suurennoksella. Asteikkona käytettiin 0 = vähemmän kuin 20

positiivista solua; 1 = 20 - 50 positiivista solua; 2 = 50 - 200 positiivista solua ja 3 = yli 200 positiivista solua. (21)

Tilastollinen analysointi tehtiin ohjelmalla Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 17.0 Windowsille. Tutkimuksessa käytettiin T-testiä itsenäisille näytteille, Mann-Whitneyn testiä sekä Spearmanin korrelaatiotestiä. Merkitsevä p-arvona käytettiin alle 0,05.

Työ toteutettiin HYKS:in Iho- ja allergiasairaalassa DNA-laboratoriossa. Värjäykset tehtiin kesäkuun aikana ja näytteiden analysointi heinäkuussa 2009.

4 Tulokset

Eniten epiteelissä esiintyi MMP-3 (19/28; 67,9 %), MMP-7 (18/28; 64,3 %), MMP-12 (20/28; 71,4 %) ja TIMP-3 (25/28; 89,3 %) ja stroomassa MMP-9 (16/28; 57,1 %), MMP-12 (25/28; 89,2 %) ja TIMP-3 (28/28; 100 %). Semikvantitatiivisen analyysin tulokset on esitetty taulukoissa 3, 4 ja 5. Lisäksi tuloksia verrattiin näytteiden CRP-arvoon (≥ 10 mg/l), kalprotektiini-arvoon, jossa ≥ 100 μ g/g ulostetta katsottiin olevan merkittävästi koholla (23), (24), (25) sekä patologin tekemään histologiseen arvioon tulehduksen laadusta suolessa. Tutkimme myös suolen funktionaalisen toiminnan yhteyttä MMP- ja TIMP- esiintyvyyteen. Vertailujen tulokset on esitetty taulukoissa 6, 7 ja 8. Lisäksi vertasimme Crohnin taudin MMP- ja TIMP- esiintyvyyttä CU:n vastaavaan.

Taulukko 3 Semikvantitatiivisen arvostelun tulokset MMP-3:sta, MMP-7:stä ja MMP-8:sta

POTILAS-NRO	MMP-3		MMP-7		MMP-8	
	E	S	E	S	E	S
potilas 1 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 2 CU	0	0	2	0	0	0
potilas 3 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 4 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 5 CU	1	0	0	0	0	0
potilas 6 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 7 CU	0	0	1	0	0	0
potilas 8 CU	0	0	1	0	0	0
potilas 9 CU	1	1	0	0	0	0
potilas 10 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 11 CU	1	0	0	0	0	0
potilas 12 CU	1	0	0	0	0	0
potilas 13 CU	0	0	0	0	0	0
potilas 14 CU	0	0	0	0	0	0
potilas 15 CU	0	0	1	0	0	0
potilas 16 CU	2	0	2	0	0	0
potilas 17 CU	1	0	1	0	0	1
potilas 18 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 19 CU	2	0	2	0	0	0
potilas 20 CU	1	0	0	0	0	0
potilas 21 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 22 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 23 CU	0	0	0	0	0	0
potilas 24 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 25 CU	1	0	1	0	0	0
potilas 26 CU	0	0	1	0	0	0
potilas 27 CU	0	0	0	0	0	0
potilas 28 CU	1	0	0	0	0	0
potilas 29 Crohn	1	1	1	0	0	0
potilas 30a Crohn	0	0	0	0	0	0
potilas 30b Crohn	0	0	0	0	0	0
potilas 31 Crohn	1	0	1	0	0	0
potilas 32 Crohn	0	0	0	0	0	1
potilas 33 Crohn	1	0	0	0	0	0
potilas 34 Crohn	1	0	1	0	1	0
potilas 35 Crohn	1	0	1	0	0	0

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CU= colitis ulcerosa

Taulukko 4 Semikvantitatiivisen arvostelun tulokset MMP-9:sta, MMP-12:sta ja MMP-26:sta

POTILAS-NRO	MMP-9		MMP-12		MMP-26	
	E	S	E	S	E	S
potilas 1 CU	0	1	0	0	0	0
potilas 2 CU	0	1	0	1	1	0
potilas 3 CU	0	0	1	1	0	1
potilas 4 CU	0	1	1	1	0	2
potilas 5 CU	0	0	1	1	0	0
potilas 6 CU	0	0	1	2	0	1
potilas 7 CU	0	2	1	1	0	0
potilas 8 CU	0	1	0	0	0	0
potilas 9 CU	0	1	1	2	0	1
potilas 10 CU	0	1	0	2	0	0
potilas 11 CU	0	0	1	1	0	0
potilas 12 CU	0	0	1	2	0	0
potilas 13 CU	0	0	0	2	0	0
potilas 14 CU	0	1	0	1	0	0
potilas 15 CU	0	2	1	2	0	0
potilas 16 CU	0	1	1	2	0	0
potilas 17 CU	0	1	1	0	0	0
potilas 18 CU	0	1	1	1	0	0
potilas 19 CU	0	0	1	2	0	0
potilas 20 CU	0	1	1	1	0	0
potilas 21 CU	0	1	1	1	0	0
potilas 22 CU	0	0	0	2	0	0
potilas 23 CU	0	0	1	1	0	0
potilas 24 CU	0	1	1	2	0	0
potilas 25 CU	0	0	0	2	0	0
potilas 26 CU	0	0	2	2	0	0
potilas 27 CU	0	1	1	1	0	0
potilas 28 CU	0	0	1	2	0	0
potilas 29 Crohn	0	1	1	1	0	0
potilas 30a Crohn	0	0	3	1	0	0
potilas 30b Crohn	0	0	1	0	0	0
potilas 31 Crohn	0	1	2	1	0	1
potilas 32 Crohn	0	0	0	0	0	0
potilas 33 Crohn	0	0	2	2	0	1
potilas 34 Crohn	0	0	1	1	0	0
potilas 35 Crohn	0	0	2	2	1	0

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CU= colitis ulcerosa

Taulukko 5 Semikvantitatiivisen arvostelut tuloksen TIMP-1:stä, TIMP-2:sta ja TIMP-3:sta

POTILAS-NRO	TIMP-1		TIMP-2		TIMP-3	
	E	S	E	S	E	S
potilas 1 CU	0	0	0	0	0	2
potilas 2 CU	0	0	0	1	1	2
potilas 3 CU	0	0	0	3	1	2
potilas 4 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 5 CU	0	0	0	0	0	1
potilas 6 CU	0	0	0	0	1	2
potilas 7 CU	0	0	0	0	1	1
potilas 8 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 9 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 10 CU	0	0	0	0	0	3
potilas 11 CU	0	0	0	0	2	3
potilas 12 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 13 CU	0	0	0	0	1	2
potilas 14 CU	0	0	0	0	2	2
potilas 15 CU	0	0	0	0	1	2
potilas 16 CU	0	0	1	0	2	1
potilas 17 CU	0	0	0	0	1	2
potilas 18 CU	0	0	0	0	2	1
potilas 19 CU	0	0	1	0	2	1
potilas 20 CU	0	0	0	0	2	3
potilas 21 CU	0	0	1	0	2	3
potilas 22 CU	0	0	0	0	2	2
potilas 23 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 24 CU	0	0	0	0	1	2
potilas 25 CU	0	0	0	0	1	3
potilas 26 CU	0	1	0	0	2	3
potilas 27 CU	0	0	0	0	2	3
potilas 28 CU	0	0	1	0	1	3
potilas 29 Crohn	0	0	0	0	1	2
potilas 30a Crohn	0	0	0	0	0	0
potilas 30b Crohn	0	0	0	0	0	2
potilas 31 Crohn	0	0	0	0	0	2
potilas 32 Crohn	0	0	0	0	2	3
potilas 33 Crohn	0	0	1	0	1	1
potilas 34 Crohn	0	0	1	0	1	2
potilas 35 Crohn	0	0	0	0	2	1

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CU= colitis ulcerosa

Taulukko 6 Tulokset MMP-3, -7 ja -8 vertailusta histologisen arvioon, kalprotektiini-arvoon, CRP:iin ja suolen funktionaalisen toimintaan.

A.				
p-arvot				
	MMP-3		MMP-7*	MMP-8**
	E	S	E	S
histologinen arvio	0,004	0,383	0,886	e.m
kalprotektiini	0,809	0,247	0,892	0,81
CRP	0,44	e.m	0,428	0,725
ulosteen kiinteys	0,011	0,866	0,261	0,866
pidätyskyky	0,758	0,731	0,612	0,731
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	0,156	0,378	0,028	0,417
suolen tyhjennyskyky	0,012	0,564	0,717	0,091
ulosteen valuminen	0,887	0,385	0,757	0,505
tuhriminen päivällä	0,262	0,612	0,861	0,612
tuhriminen yöllä	0,611	0,385	0,504	0,549

B.				
korrelaatiokertoimet				
	MMP-3		MMP-7*	MMP-8**
	E	S	E	S
histologinen arvio	-0,582	-0,191	0,032	e.m
kalprotektiini	-0,048	-0,226	-0,027	0,048
CRP	-0,225	e.m	-0,23	-0,103
ulosteen kiinteys	0,473	-0,033	0,22	-0,033
pidätyskyky	0,062	0,069	0,102	0,069
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	0,257	0,173	-0,416	-0,16
suolen tyhjennyskyky	0,474	0,116	-0,073	-0,331
ulosteen valuminen	-0,028	-0,171	0,061	0,131
tuhriminen päivällä	0,219	-0,1	0,035	-0,1
tuhriminen yöllä	0,1	-0,171	-0,132	0,118

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CRP= c-reaktiivinen proteiini

e.m= ei merkitsevä

*= MMP-7 ei havaittavissa stroomassa

**= MMP-8 ei havaittavissa epiteelissä

taulukko 7 Tulokset MMP-9, -12 ja -26 vertailusta histologisen arvioon, kalprotektiini-arvoon, CRP:iin ja suolen funktionaalisen toimintaan.

A.					
p-arvot					
	MMP-9*	MMP-12		MMP-26	
	S	E	S	E	S
histologinen arvio	0,519	0,791	0,809	0,264	0,811
kalprotektiini	0,188	0,322	0,933	0,763	0,907
CRP	0,759	0,713	0,736	0,108	0,77
ulosteen kiinteys	0,091	0,237	0,397	0,021	0,052
pidätyskyky	0,834	0,82	0,804	0,003	0,464
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	0,695	0,184	0,663	0,083	0,055
suolen tyhjennyskyky	0,717	0,744	0,175	0,091	0,216
ulosteen valuminen	0,096	0,84	0,976	0,385	0,878
tuhriminen päivällä	0,214	0,595	0,712	0,612	0,928
tuhriminen yöllä	0,009	0,292	0,231	0,385	0,469

B.					
korrelaatiokertoimet					
	MMP-9*	MMP-12		MMP-26	
	S	E	S	E	S
histologinen arvio	-0,142	0,059	0,053	0,243	0,053
kalprotektiini	-0,256	-0,194	-0,017	-0,06	-0,023
CRP	-0,094	-0,108	0,099	-0,448	-0,086
ulosteen kiinteys	-0,326	0,231	0,167	-0,433	0,371
pidätyskyky	-0,042	0,046	0,05	-0,555	0,147
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	-0,077	0,259	0,086	-0,333	0,366
suolen tyhjennyskyky	0,073	0,066	0,269	-0,331	0,246
ulosteen valuminen	-0,321	0,04	-0,006	-0,171	-0,03
tuhriminen päivällä	-0,242	0,105	0,073	-0,1	0,018
tuhriminen yöllä	-0,484	0,206	0,234	-0,171	0,143

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CRP= c-reaktiivinen proteiini

*= MMP-9 ei havaittavissa epiteelissä

Taulukko 8 Tulokset TIMP-1, -2 ja -3 vertailusta histologisen arvioon, kalprotektiini-arvoon, CRP:iin ja suolen funktionaalisen toimintaan.

A.					
p-arvot					
	TIMP-1*	TIMP-2		TIMP-3	
	S	E	S	E	S
histologinen arvio	0,264	0,051	0,264	0,836	0,917
kalprotektiini	0,506	0,033	0,538	0,156	0,548
CRP	e.m	0,604	0,442	0,382	0,52
ulosteen kiinteys	0,866	0,419	0,99	0,323	0,376
pidätyskyky	0,731	0,357	0,09	0,8	0,348
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	0,417	0,943	0,605	0,18	0,467
suolen tyhjennyskyky	0,091	0,295	0,476	0,49	0,251
ulosteen valuminen	0,064	0,302	0,917	0,366	0,16
tuhriminen päivällä	0,612	0,893	0,328	0,274	0,698
tuhriminen yöllä	0,136	0,778	0,623	0,797	0,209

B.					
korrelaatiokertoimet					
	TIMP-1*	TIMP-2		TIMP-3	
	S	E	S	E	S
histologinen arvio	0,243	-0,411	0,243	0,046	0,023
kalprotektiini	0,131	-0,404	-0,121	-0,276	0,119
CRP	e.m	-0,152	-0,224	-0,254	0,188
ulosteen kiinteys	-0,033	0,159	-0,003	0,194	-0,174
pidätyskyky	0,069	-0,184	-0,333	-0,051	-0,188
ilmavaivan ja ulostamistarpeen erotuskyky	-0,16	0,014	-0,102	-0,261	0,143
suolen tyhjennyskyky	-0,331	0,209	-0,143	-0,139	-0,229
ulosteen valuminen	0,355	-0,202	-0,021	0,178	0,273
tuhriminen päivällä	-0,1	0,027	0,192	0,214	-0,077
tuhriminen yöllä	0,289	-0,056	0,097	0,051	0,245

MMP= matriksin metalloproteinaasi

E= epiteeli

S= strooma

CRP= c-reaktiivinen proteiini

e.m= ei merkitsevä

*= TIMP-1 ei havaittu epiteelissä

4.1 MMP-3

MMP-3:sta havaittiin 19/28 (67,9 %) näytteen epiteelissä (taulukko 3). Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo esiintyvyydelle oli $0,75 \pm 0,6$ (keskiarvo \pm keskihajonta). Lisäksi MMP-3:n esiintyminen epiteelissä oli yhteydessä patologin tekemään arvioon tulehduksen laadusta suolessa (p-arvo = 0,004, korrelaatiokerroin -0,582), ulosteiden kovuusasteeseen (p-arvo = 0,011, korrelaatiokerroin 0,473) ja potilaan kykyyn tyhjentää suoli (p-arvo = 0,012, korrelaatiokerroin 0,473) (taulukko 6). Vain yhden näytteen (1/28;3,6 %) stroomasta havaittiin merkittävästi positiivisia soluja ($0,04 \pm 0,19$) (taulukko 3). Kuitenkin lähes jokaisesta näytteestä havaittiin muutamia positiivisia neutrofiilejä.

4.2 MMP-7

MMP-7:ää havaittiin 18/28 (64,3 %) näytteen epiteelistä. Näytteiden semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo oli $0,75 \pm 0,6$. Yhdenkään näytteen stroomassa ei esiintynyt merkittävästi MMP-7:ää (0/28) (taulukko 3). Lähes jokaisesta näytteestä havaittiin 1-4 positiivista strooman solua. MMP-7 esiintyminen epiteelissä oli lisäksi yhteydessä potilaan kykyyn erottaa ilmavaiva ja ulostamistarve (p-arvo = 0,028, korrelaatiokerroin -0,416) (taulukko 6).

4.3 MMP-8

Yhdenkään näytteen epiteelissä ei esiintynyt MMP-8:aa (0/28). Vain yhden näytteen stroomassa (1/28) havaittiin merkittävästi MMP-8:aa keskiarvolla $0,03 \pm 0,19$ (taulukko 3). Muissakin näytteissä havaittiin stroomassa joitakin positiivisia neutrofiilejä, mutta soluja oli alle 10 näyttettä kohti.

4.4 MMP-9

MMP-9:ää ei esiintynyt näytteiden epiteelissä (0/28). Stroomassa sitä havaittiin 16/28 (57,1 %) näytteestä (taulukko 4). Keskimääräinen semikvantitatiivinen esiintyvyys stroomassa oli $0,64 \pm 0,6$. Solut tunnistettiin neutrofiileiksi ja makrofageiksi. MMP-9 esiintyminen stroomassa oli yhteydessä ulosteen valumiseen suoletta yöllä (klo: 22- 06) (p-arvo = 0,009, korrelaatiokerroin -0,484) (taulukko 7)

4.5 MMP-12

MMP-12:sta havaittiin 20/28 (71,4 %) näytteen epiteelistä. Semikvantitatiiviseksi keskiarvoksi epiteelille saatiin $0,75 \pm 0,5$. Myös stroomassa havaittiin MMP-12:sta 25/28 näytteessä (89,2 %) (taulukko 4). Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo oli stroomalle $1,6 \pm 0,7$. Positiivisuutta siinä esiintyi neutrofiileissa, makrofageissa ja lymfosyyteissä.

4.6 MMP-26

Vain yhden näytteen (1/28; 3,6 %) epiteelissä esiintyi merkittävästi MMP-26:sta. Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo oli $0,04 \pm 0,2$. Stroomassa MMP-26:sta havaittiin 4/28 (14,3 %) näytteessä (taulukko 4). Positiiviset solut olivat neutrofiileja ja makrofageja. Esiintyvyyden semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo stroomassa oli $0,18 \pm 0,5$. MMP-26 esiintyminen oli lisäksi yhteydessä ulosteiden kovuusasteeseen (p-arvo= 0,012 korrelaatiokerroin -0,433) ja ulosteen pidätyskykyyn (p-arvo= 0,003, korrelaatiokerroin -0,555) (taulukko 7)

4.7 TIMP-1

Näytteiden epiteeleissä ei esiintynyt TIMP-1:stä (0/28). Stroomassa yhdessä (1/28; 3,6 %) näytteessä havaittiin merkittävästi positiivisia soluja, jolloin semikvantitatiivinen keskiarvo oli $0,04 \pm 0,2$ (taulukko 5). Kuitenkin lähes jokaisessa näytteessä havaittiin joitakin positiivisia soluja. Kryptissa havaittiin myös positiivisuutta.

4.8 TIMP-2

TIMP-2:sta havaittiin 4/28 (14,3 %) näytteen epiteelistä. Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvoksi epiteelille saatiin $0,14 \pm 0,4$ (taulukko 4). Lisäksi TIMP-2:n esiintyminen epiteelissä oli vahvempaa näytteissä, joissa kalprotektiini oli koholla ($\geq 100 \mu\text{g/g}$) (p-arvo = 0,033 korrelaatiokerroin -0,404) (taulukko 7). Kahden näytteen (2/28; 7,1 %) stroomassa esiintyi merkittävästi TIMP-2-positiivisia soluja, jotka tunnistettiin neutrofiileiksi (taulukko 4). Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo stroomalle oli $0,14 \pm 0,6$.

4.9 TIMP-3

Epiteelissä havaittiin 25/28 (89,3 %) TIMP-3:sta. Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvoksi saatiin epiteelille $1,25 \pm 0,6$ (taulukko 4). Stroomassa havaittiin kaikissa näytteissä (28/28; 100 %) huomattavasti TIMP-3:sta (taulukko 4). Semikvantitatiivisen arvostelun keskiarvo stroomalle oli $2,29 \pm 0,8$. Positiiviset solut olivat neutrofiileja ja plasmasoluja.

4.10 Colitis ulcerosan ja Crohnin taudin tulosten vertailu

Tutkimuksen Crohn –potilaat saatiin, kun Väestörekisterikeskuksesta etsittiin kaikki vuosina 1985- 2005 TaYs:ssa ja Lastenlinikalla (HYKS) alle 16-vuotiaana paksusuolen poistoleikkauksen colitis ulcerosan takia läpikäyneet potilaat. Näistä 79 potilaasta 35 osallistui seurantakäynnille. Seitsemän seurantapotilaan alkuperäinen CU-diagnoosi oli vaihtunut Crohnin taudiksi. Saimme tällä varsin pienellä otoksella (7 Crohn-potilasta ja 28 CU-potilasta) tulokseksi, että vain MMP-12 ($p=0,005$) esiintyminen epiteelissä ja TIMP-3 ($p=0,046$) esiintyminen stroomassa olivat suurempia Crohn -potilailla kuin CU -potilailla. Crohnin taudin ja CU:n MMP- ja TIMP- esiintyminen on jo aiemmin todettu varsin samanlaiseksi (16), (26).

5 Pohdinta

Matriksin metalloproteinaaseilla (MMP:t) on osoitettu olevan roolia tulehduksellisessa suolistosairaudessa tapahtuvassa kudoksen tuhoutumisessa ja korjaantumisessa (9). Ne ovat ryhmä sinkkisormientsyymejä, jotka pystyvät pilkkomaan lähes kaikkia soluväliaineen ja tyvikalvon rakenneosasia (8). MMP -spesifisinä estäjinä toimivat TIMPit (tissue inhibitors of metalloproteinases) (12), (10). Tasapaino estäjien ja matriksin metalloproteinaasien välillä on tärkeä tekijä suolen tulehduksen synnyssä. Jos estäjää on liian vähän, pääsevät MMP:t aiheuttamaan kudonvauriota (8).

Tässä tutkimuksessa tutkimme MMP-3, -7, -8, -9, -12, -26 ja TIMP-1, -2, -3 esiintyvyyttä alle 16-vuotiaana colitis ulcerosan takia paksusuolen poistoleikkauksen läpikäyneiltä potilailta. Tarkoituksena oli selvittää, muistuttaako MMP- ja TIMP- esiintyminen potilaiden suolessa colitis ulcerosassa tai muussa IBD -sairaudessa

havaittavaa esiintymistä. Mukana tutkimuksessa oli vertailun vuoksi 7 Crohn -potilaan koepalat (yhdeeltä potilaalta oli 2 näytettä), jotka käsiteltiin CU -näytteiden rinnalla. Samantyyppistä tutkimusta ei ole tehty aikaisemmin lapsilla eikä aikuisilla näin pitkän seuranta-ajan jälkeen. Aikuisilla on tutkittu matriksin metalloproteiinien esiintymistä pussiitissa. On osoitettu, että MMP-1 ja MMP-2 määrät ovat kohonneet. Pussiitissa IL-1 ja interferoni γ pitoisuudet ovat myös koholla. Näiden sytokiinin on osoitettu aktivoivan matriksin metalloproteiinien tuotantoa. (18) Kalprotektiinin yhteyttä pussiittiin on myös tutkittu lapsena paksusuolenpoistoleikkauksen läpikäyneillä. On osoitettu, että kohonnut kalprotektiinin määrä on yhteydessä pussiittien määrään ja uusimiseen. (28) Elämänlaatua, suolen funktionaalista toimintaa ja leikkauskomplikaatiota on myös tutkittu aikuispotilailla, jotka on leikattu lapsina. 10 vuoden seurantatutkimus osoittaa, että elämänlaatu ja yleinen terveydentila ovat potilailla hyviä, vaikka öinen pidätyskyvyttömyys on yleistä (5).

Eniten CU -näytteiden epiteelissä esiintyi MMP-3:sta (19/28; 67,9 %), MMP-7:ää (18/28; 64,3 %), MMP-12:sta (20/28; 71,4 %) ja TIMP-3:sta (25/28; 89,3 %) ja stroomassa MMP-9:ää (16/28; 57,1 %), MMP-12:sta (25/28; 89,2 %) ja TIMP-3:sta (28/28; 100 %). Muiden MMP:ien esiintyminen oli vähäistä (alle 50 %) (taulukot 3, 4 ja 5). TIMP-2 esiintyminen epiteelissä oli voimakkaampaa näytteissä, joissa kalprotektiini oli koholla ($\geq 100 \mu\text{g/g}$). MMP-3 esiintyminen epiteelissä oli voimakkaampaa tulehtuneissa näytteissä. Lisäksi MMP-3:n, MMP-7:n ja MMP-26:n esiintyminen epiteelissä ja MMP-9:n stroomassa liittyivät suolen funktionaaliseen toimintaan. (taulukot 6,7 ja 8)

Samoissa MMP:eissä ja TIMP:eissä havaittiin kohoamista kuin CU:ssa. Kohoaminen ei kuitenkaan ollut kovin voimakasta, sillä vain neljää MMP:ia ja yhtä TIMP:iä havaittiin merkittävästi, kun CU:ssa havaitaan kaikkia tutkimiamme MMP:eitä ja TIMP:ejä. Erityisesti näytteissämme erosi MMP-3:n ja MMP-9:n esiintyminen, joiden on todettu esiintyvän voimakkaasti tulehduksellisissa suolistosairauksissa sekä aikuisilla että MMP-3:n osalta myös lapsipotilailla. (10), (14), (26), (27) Näytteissämme MMP-3:n ja MMP-9:n esiintyminen jäi verraten vähäiseksi. Näiden MMP:ien on myös osoitettu osallistuvan Crohnin taudissa esiintyvien fistuloiden muodostamiseen (19). Tästä voisi päätellä, ettei tulehdus ohutsuoletta tehdystä pussissa ainakaan merkittävästi muistuta Crohnin tautia.

Huomattavimmin näytteissä nousivat MMP-12:sta ja TIMP-3:n määrät, sillä molempia havaittiin runsaasti sekä epiteelissä että stroomassa. Näiden MMP:ien roolia ei tarkkaan tunneta tulehduksellisissa suolistosairauksissa, mutta niiden määrien on todettu kohoavan (16). Tulostemme perusteella näyttää siltä, että nämä kaksi MMP:ia ovat keskeisessä asemassa pussiitti –tulehduksessa, mutta väite vaatii lisää tutkimuksia.

Myös MMP-7:ssä havaittiin kohoamista. Sen on todettu esiintyvän haavojen reuna-alueilla ja osallistuvan suolen tuhoamisen sijaan haavan paranemiseen(8), (20), (21), (22).

Oli mielenkiintoista huomata, miten MMP -esiintyminen liittyi suolen funktionaaliseen toimintaan. Joidenkin MMP:ien esiintyminen liittyi selvästi ulosteiden kovuuteen, suolen tyhjentämiskykyyn, öiseen tuhrimiseen, pidätyskykyyn ja ilmavaivan ja ulostustarpeen erottamiskykyyn. Se, miten tämä liittyy pussiittiin, vaatii vielä lisätutkimuksia.

Vain TIMP-2 esiintyminen oli yhteydessä kohonneeseen ulosteen kalprotektiini -arvoon. Yksikään MMP ei siis kohonnut kalprotektiini -arvon noustessa. Tätä olisi voinut odottaa, sillä kertoohan kalprotektiinin määrä tutkimusten mukaan pussiitin vaikeusasteesta. (2), (28)

Potilaat arvioivat kyselytutkimuksessa myös heillä esiintyneiden pussiittien lukumäärää. Osalla pussiitteja oli ollut useita ja jatkuvasti, osalla ei ollenkaan ja osa ei tiennyt, oliko heillä ollut niitä. Näiden kolmen ryhmän MMP- ja TIMP- esiintymiset eivät eronneet toisistaan, joten pussiittien määrällä ei näytä olevan merkitystä.

MMP- ja TIMP- esiintymiset Crohnin taudissa verrattuna CU:n vastaaviin olivat myös varsin samanlaiset. Yhden MMP:n esiintymisen eroavuudella ei voida vetää johtopäätöksiä, että Crohnin taudin takia poistetun paksusuolen pussiitti olisi erilainen kuin CU:n takia poistetun.

Tulosteni perusteella pussiitti -tulehdus muistuttaa MMP- ja TIMP –esiintymisiltään tulehduksellisissa suolistosairauksissa havaittavaa, mutta erojakin on. En voi suoraan väittää, että paksusuolen poistoleikkauksen jälkeinen suolireservuaarin tulehdus olisi colitis ulcerosan tai Crohnin taudin ilmentymä, vaan se on jokin omanlaisensa tulehdus, joka muistuttaa näitä.

Mahdollisesti saamiani tuloksia vääristää se, että tutkimuksessamme käytetyt koepalat olivat varsin pieniä ja useimmat niistä olivat olleet parafiinissa lähes kymmenen vuotta. Näytteitä oli myös vähän, mutta niiden saaminen on varsin hankalaa, sillä koepalan ottaminen on potilaalle varsin epämiellyttävä toimenpide. Immunohistokemia on myös saattanut vaurioittaa näytteitä, sillä esim. vesihaude on haitallinen näytteille. Semikvantitatiivinen arvostelu on aina epätarkkaa, mutta vähentääkseni mahdollisia virhearviointeja näytteet tutki kaksi eri henkilöä. Tutkimuksessani olen tiedostanut virhelähteet ja uskon, että tulokseni ovat merkityksellisiä niistä huolimatta.

6 Lähteet

- (1) Kim SC, Ferry GD. Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology* 2004 May;126(6):1550-1560.
- (2) Kolho K. Nuoren tulehduksellinen suolistosairaus. *Suomen lääkärilehti - Finlands läkartidning* 2008;63(50):4423-4428.
- (3) Salmela MT. Matrix metalloproteinases in mucosal injury and Re-epithelialization of the gut. In: Salmela MT, editor. *Matrix metalloproteinases in mucosal injury and Re-epithelialization of the gut*. 1st ed. Helsinki: Yliopistopaino; 2003. p. 13-24.
- (4) Turunen P, Ashorn M, Auvinen A, Iltanen S, Huhtala H, Kolho KL. Long-term health outcomes in pediatric inflammatory bowel disease: a population-based study. *Inflamm.Bowel Dis.* 2009 Jan;15(1):56-62.
- (5) Pakarinen MP, Natunen J, Ashorn M, Koivusalo A, Turunen P, Rintala RJ, et al. Long-term outcomes of restorative proctocolectomy in children with ulcerative colitis. *Pediatrics* 2009 May;123(5):1377-1382.
- (6) Bach SP, Mortensen NJ. Revolution and evolution: 30 years of ileoanal pouch surgery. *Inflamm.Bowel Dis.* 2006 Feb;12(2):131-145.

- (7) Wewer V, Hesselfeldt P, Qvist N, Husby S, Paerregaard A. J-pouch ileoanal anastomosis in children and adolescents with ulcerative colitis: functional outcome, satisfaction and impact on social life. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2005 Feb;40(2):189-193.
- (8) Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflamm.Bowel Dis.* 2007 Jan;13(1):97-107.
- (9) Kusugami K, Nobata K, Tsuzuki T, Ando T, Ina K. Mucosal expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ulcerative colitis patients. *J.Gastroenterol.* 2003;38(4):412-413.
- (10) Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2006 Sep;318(3):933-938.
- (11) Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol.Aspects Med.* 2005 Aug-Oct;26(4-5):379-390.
- (12) Bister V. Novel matrix metalloproteinases in the intestinal inflammation and cancer of the gastrointestinal tract. In: Ville Bister, editor. *Novel matrix metalloproteinases in the intestinal inflammation and cancer of the gastrointestinal tract.* 1st ed. Helsinki: Yliopistopaino; 2007. p. 7-22.
- (13) von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000 Jul;47(1):63-73.
- (14) Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, et al. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin.Exp.Immunol.* 2000 May;120(2):241-246.
- (15) Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World J.Gastroenterol.* 2003 Dec;9(12):2843-2845.

- (16) Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am.J.Pathol.* 1998 Apr;152(4):1005-1014.
- (17) Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, Sier CF, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as prognostic indicators for diagnostic and surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2009 Jan;15(1):84-92.
- (18) Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000 Sep;47(3):415-422.
- (19) Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004 May;53(5):701-709.
- (20) Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, et al. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. *Gut* 2002 Oct;51(4):540-547.
- (21) Bister VO, Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P, et al. Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Dig.Dis.Sci.* 2004 Apr;49(4):653-661.
- (22) Matsuno K, Adachi Y, Yamamoto H, Goto A, Arimura Y, Endo T, et al. The expression of matrix metalloproteinase matrilysin indicates the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J.Gastroenterol.* 2003;38(4):348-354.
- (23) Kolho KL, Raivio T, Lindahl H, Savilahti E. Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 2006 Jun;41(6):720-725.

(24) Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm.Bowel Dis.* 2008 Jan;14(1):40-46.

(25) von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am.J.Gastroenterol.* 2007 Apr;102(4):803-813.

(26) Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van der Zon AM, van Duijn W, van Hogezaand RA, Sier CF, et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Dig.Liver Dis.* 2007 Aug;39(8):733-739.

(27) Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000 Jul;47(1):57-62.

(28) Pakarinen MP, Koivusalo A, Natunen J, Ashorn M, Aitola P, Rintala RJ, Kolho K-J, et al. Fecal calprotectin in relation to pouchitis and bowel function after restorative proctocolectomy in children with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis, painossa*