

Johanna Hästbacka

LT, erikoislääkäri
Hyks, ATEK, tehohoito
johanna.hastbacka[a]hus.fi

MATRIKSIIN METALLOPROTEINAASIT KRIITTISESTI SAIRAILLA POTILAILLA

Johanna Hästbacka

Helsingin yliopisto 31.5.2013

Vastaväittäjä

Professori Arvi Yli-Hankala, Tampereen yliopisto

Esitarkastajat

Professori Else Tønnesen, Århusin yliopisto

Professori Olli Vainio, Oulun yliopisto

▶ Matriksin metalloproteinaasit (MMP) ovat rakenteellisesti toisiaan muistuttavia entsyymejä, joille on yhteistä kyky hajottaa solujen väliainetta, matriksia. Ryhmän entsyymit kykenevät hajottamaan lähes kaikkia matriksin komponentteja. Ensimmäinen MMP löydettiin vuonna 1962, kun Gros ja Lapière havaitsivat uuden

kollageenia hajottavan entsyymin osallistuvan sammakonpoikasen metamorfoosiin (1). Sittemmin on selkärankaisilla löydetty yli 25 erilaista MMP:a. MMP:t jaotellaan perinteisesti ryhmiin niiden ensisijaisen substraatin perusteella: kollageenaasit (MMP-1, -3 ja -8) hajottavat intersitiaalista kollageenia, gelatinaasit

(MMP-2 ja MMP-9) hajottavat denaturoitunutta kollageenia ja tyypin IV kollageenia, joka on mm tyvikalvojen tärkeä komponentti. Stromelysiinit (MMP-3, -10 ja -11) hajottavat myös matriksin komponentteja ja aktivoivat muita MMP:ja, ja lisäksi ryhmään kuuluvat matrilysiinit (MMP-7 ja -26), solukalvolle paikallistuvat MT-MMP:t (MT = membrane-type) (MMP-14, -15, -16, -17, -24 ja -25), sekä muut MMP:t (2).

MMP:t ovat potentteja entsyymejä, ja niiden synteesi, aktiivisuus ja toiminta ovatkin monivaiheisen tarkan säätelyn kohteena. Verenkierrossa niiden tärkein inhibiittori on plasman epäspesifinen anti-proteinaasi α -2-makroglobuliini. Kudostasolla TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) estää MMP:n toimintaa. MMP:illa on merkitystä monissa fysiologisissa ja patofysiologisissa prosesseissa, joihin liittyy ekstrasellulaarisen matriksin muokkautuminen. Tällaisia ovat esimerkiksi sikiönkehitys, kasvu, haavan paraneminen, verisuonten muodostuminen, kasvainten invaasio ja metastasointi, ateroskleroosi ja

Väitöskirja ja osatyöt

Matrix metalloproteinases in critically ill patients. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/38910/hastbacka_dissertation.pdf?sequence=1

I Hästbacka J, Hynninen M, Kolho E, Pettilä V, Tervahartiala T, Sorsa T, Lauhio A. Collagenase 2/ matrix metalloproteinase 8 in critically ill patients with secondary peritonitis. Shock 2007; 27: 145-50.

II Lauhio A, Hästbacka J, Pettilä V, Tervahartiala T, Karlsson S, Varpula T, Varpula M, Ruokonen E, Sorsa T, Kolho E. Serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in sepsis: High serum levels of MMP-8 and TIMP-1 are associated with fatal outcome in a multicentre, prospective cohort study. Hypothetical impact of tetracyclines. Pharmacol Res 2011; 64: 590-4.

III Hästbacka J, Tiainen M, Hynninen M, Kolho E, Tervahartiala T, Sorsa T, Lauhio A, Pettilä V. Serum matrix metalloproteinases in patients resuscitated from cardiac arrest. The association with therapeutic hypothermia. Resuscitation 2012; 83: 197-201.

IV Hästbacka J, Linko R, Tervahartiala T, Varpula T, Hovilehto S, Parviainen I, Sorsa T, Pettilä V. Serum MMP-8 and TIMP-1 in critically ill patients with acute respiratory failure: TIMP-1 is associated with increased 90-day mortality. Anesth Analg (hyväksytty julkaistavaksi 11/2013).

akuutti sekä krooninen inflammaatio (3–5).

Viime aikoina on havaittu, että MMP:en rooli on laajempi kuin aiemmin tunnettu soluväliaineen muokkaus. MMP:t osallistuvat tulehdusreaktioon ja toimivat sen säätelijänä, sekä voimistaen että hilliten sitä (3). Erityisen mielenkiinnon kohteina akuutissa inflammaatiassa ovat neutrofiiliperäiset metalloproteiinaasit. Tulehdusreaktiossa MMP-8 ja MMP-9 vapautuvat neutrofileistä lähes välittömästi, kun ne aktivoituvat proinflammatoristen sytokiinin tai vaikkapa lipopolysakkaridin vaikutuksesta. Ne auttavat neutrofilejä tunkeutumaan verenkierrosta kudokseen tulehduspaikalle, aktivoivat kemokiineja, ja vapauttavat matriksissa lepääviä sytokiineja. Niillä on kuvattu olevan merkitystä esimerkiksi vaikeisiin infektioihin ja

iskemia-reperfuusiovaurioon liittyvissä permeabiliteetti muutoksissa, liittyen mm niiden kykyyn hajoittaa tyvikalvojen komponentteja (6–7). Toisaalta MMP:lla on merkitystä myös tulehduksen resoluutiassa ja kudosvaurion paranemisessa (8).

Kokeellisissa tutkimuksissa on osoitettu, että MMP-8:n ja -9:n tasot ovat yleisesti kohonneet vaikeissa infektioissa ja sepsiksessä jo varhaisessa vaiheessa. Estämällä niiden toimintaa lääkkeellisesti voidaan vaikuttaa koe-eläinten selviytymiseen sepsiksestä (9–11). Myös elinhäiriöiden syntyyn on voitu eläinkoeasetelmissa vaikuttaa estämällä MMP 8:aa ja 9:ää (6, 12–14). Kliinisiä tutkimuksia sepsispotilailla on vasta vähän. Kohonneita MMP-8 ja -9-tasoa on havaittu vaikeissa infektioissa ja sepsiksessä, mutta MMP-tasojen yhteydestä ennusteeseen tai

elinhäiriöiden kehittymiseen on vain vähän tietoa, joka sekkin on ristiriitaisista (15–18).

Väitöskirjatyon tavoitteena oli kuvata MMP:den -7 (mm säätelee MMP-8:n ja -9:n aktiivisuutta), -8 ja -9 sekä TIMP-1 tasoja kriittisesti sairailta potilailla ja tutkia, voidaanko niiden avulla ennustaa potilaiden selviytymistä. Lisäksi haluttiin tutkia, kuinka kammiovärinästä elvytetyillä potilailla hypotermiahoido vaikuttaa näiden tasoihin, koska hypotermiahoidon vaikutusmekanismit ovat puutteellisesti tunnettuja, ja toisaalta MMP:den merkityksestä on kokeellista näyttöä aivojen iskeemisessä vauriossa (19–20).

Aineisto ja menetelmät

Väitöskirjatutkimuksessa oli mukana 877 potilasta. Verrokkeina oli terveitä vapaaehtoisia koehenkilöitä. >>



Osatyössä I tutkittiin MMP-8 tasoja 15 teho-osastolla hoidetun peritoniittipotilaan seerumista, virtsasta ja peritoneaalineesteestä. Potilaiden ja verrokkien seerumin ja virtsan MMP-8 tasoja verrattiin toisiinsa. Lisäksi verrattiin MMP-tasoja potilaiden seerumi-, virtsa- ja peritoneaalineesteessä.

Osatyössä II oli mukana 248 FINNSEPSIS-monikeskustutkimukseen kuulunutta vaikeaa sepsistä tai septistä sokkia sairastanutta potilasta. Näytteet otettiin teholla tullessa tai kun vaikean sepsiksen kriteerit täyttyivät. Potilaiden seerumin MMP-8, -9 ja TIMP-1 tasoja verrattiin terveisiin koehenkilöihin. Lisäksi verrattiin tehohoidossa menehtyneiden potilaiden seerumitasoja selviytyneiden tasoihin.

Osatyössä III käytettiin ns HACA-tutkimuksen Helsingin keskuksen potilaista (N = 51/70) otettuja verinäytteitä. Potilaat olivat kammioväriinistä elvytettyjä. Heistä 31 kuului hypotermiaryhmään, ja 20 hoidettiin silloisen standardihoidon mukaisesti ilman viilennystä. Seeruminäytteistä tutkittiin MMP-7, -8 ja -9 sekä TIMP-1 tasoja ja verrattiin niitä terveiden koehenkilöiden näytteistä mitattuihin tasoihin. Lisäksi vertailtiin e.m. muuttujien käyttäytymistä hypotermiaryhmässä ja standardihoitoryhmässä hypotermiahoidon aikana ja sen jälkeen.

Osatyössä IV aineistona oli 563 akuuttia hengitysvajauksa sairastavaa potilasta (FINNALI-tutkimuksesta). Potilaista tutkittiin seerumin MMP-8 ja TIMP-1 tasoja teho-osastolle tultaessa tai akuutin hengitysvajauksen kriteerien täytyessä (yli 6 h mekaanisen ventilaation tarve) ja 48 h sen jälkeen, ja analysoitiin MMP-8 ja TIMP-1 käyttökelpoisuutta 90 vrk kuolleisuuden ennustamiseen.

Tärkeimmät tulokset

I osatyössä havaittiin korkeita MMP-8 pitoisuuksia peritoniittia sairastavien peritoneaalineesteessä, ja siinä MMP-8 oli pääasiallisesti neutrofiliperäistä. Seerumin ja virtsan MMP-8 pitoisuus oli potilailla



TIMP-1 oli itsenäinen pitkäaikaiskuolleisuuden ennustetekijä.

suurempi kuin verrokeilla. Potilaiden seerumissa ja virtsassa pitoisuudet olivat huomattavasti pienemmät kuin peritoneaalineesteessä, eivätkä eritteiden pitoisuudet korreloineet keskenään.

II osatyössä todettiin, että MMP-8, MMP-9 ja TIMP-1 -tasojen mediaanit olivat sepsispotilailla suuremmat kuin verrokeilla. Teholla menehtyneiden MMP-8 ja TIMP-1 -tasot olivat suuremmat kuin niillä, jotka selviytyivät. Sen sijaan MMP-9 tasot olivat selviytyneillä jonkin verran suuremmat.

III osatyön tärkein havainto oli, että hypotermiahoidon aikana MMP-9 tasot olivat pienemmät kuin verrokkipotilailla samana ajankohtana (24 tuntia elvytyksen onnistumisesta), mutta ero tasoittui hypotermiahoidon jälkeen. MMP-8 ja MMP-9 olivat elvytettyillä suuremmat kuin terveillä

verrokeilla. TIMP-1 oli elvytettyillä pienempi kuin verrokeilla.

IV osatyössä havaittiin, että tulo- vaiheen seerumin MMP-8 ei erottele vaikeaa hengitysvajauksa sairastavista potilaista niitä, jotka menehtyvät 90 vuorokauden kuluessa. Sen sijaan TIMP-1 assosioitui suurentuneeseen kuolleisuuteen (AUC ROC 0,63, 95 % CI 0,58–0,69) ja myös hengitysvajauksen vaikeusasteeseen, jota arvioitiin P/F-suhteen avulla. TIMP-1 ennusti itsenäisesti kuolleisuutta ja toimi myös ennustetekijänä elektiivisesti leikatuilla potilailla.

Johtopäätökset

Systemiset MMP-8 ja -9 pitoisuudet ovat terveisiin koehenkilöihin verrattuna koholla monissa sairaustiloissa, jotka johtavat tehohoidon tarpeeseen. Seerumin TIMP-1 tasot suurenevat vaikeassa sepsiksessä ja septisessä sokissa, mutteivät tämän tutkimuksen perusteella kammioväriinistä elvytettyillä potilailla. Peritoniittipotilaiden peritoneaalineesteessä MMP-8 on koholla ja ylittää pitoisuudet seerumissa ja virtsassa. Seerumin MMP-8 assosioituu kohonneeseen tehokuolleisuuteen vaikeaa sepsistä ja septistä sokkia sairastavilla potilailla, mutta pidemmällä aikavälillä sen ennustearvo on huono. MMP-9 on tehohoidossa selviytyvillä sepsispotilailla korkeampi kuin niillä, jotka eivät selviydy. TIMP-1 assosioituu suurentuneeseen kuolleisuuteen vaikeaa sepsistä ja septistä sokkia sairastavilla ja niinkään akuutin hengitysvajauksen vuoksi tehohoitoon päätyneillä potilailla. TIMP-1:a voitaisiin tutkia yhtenä merkkiaineena, esimerkiksi biomarkeripaneelissa, tehohoitopotilaan ennusteen arvioimiseksi. Seerumin MMP-9 nousu saattaa vähentyä hypotermiahoidon ansiosta, mikä olisi uusi viite siitä, että ns. postresuskitaatiosyndroomaan liittyy systeeminen inflammaatioreaktio, jota hypotermiahoido hillitsee.

Väitöstutkimus toi uutta tietoa systeemisestä inflammaatiosta potilasryhmissä, joita yhdistää tehohoitoon johtava kriittinen sairaus-tila.

MMP-8-tasoilla oli yhteyttä lyhytaikaiseen ennusteeseen, kun taas niiden inhibiittori TIMP-1 oli ainoana myös itsenäinen pitkäaikaiskuoleisuuden ennustetekijä. Lisäksi tutkimus toi uutta tietoa hypotermiahoidon mahdollisista vaikutusmekanismeista ja vahvasti käsitystä siitä, että postresuskitaatiosyndroomaan liittyy systeeminen inflammatio-reaktio, jota hypotermiahoido mahdollisesti vaimentaa. ■

Viitteet

1. Gross J, Lapiere C. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48 : 1014–22.
2. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-39.
3. Vanlaere I, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 224-39.
4. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What they do not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochem Biophys Acta* 2010; 1803: 39-54.
5. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
6. Vandenbroucke RE, Dejonckheere E, Van Lint P, ym. Matrix metalloprotease 8-dependent extracellular matrix cleavage at the blood-CSF barrier contributes to lethality during systemic inflammatory diseases. *J Neurosci* 2012; 32: 9805-16.
7. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29: 2189-95.
8. Garcia-Prieto E, González-López A, Cabrera S, ym. Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. *PLoS One* 2010; 5:e13242.
9. Paemen L, Jansen PM, Proost P, ym. Induction of gelatinase B and MCP-2 in baboons during sublethal and lethal bacteremia. *Cytokine* 1997; 9: 412-5.
10. Castellheim A, Thorgersen EB, Hellerud BC, ym. New biomarkers in an acute model of live *Escherichia coli*-induced sepsis in pigs. *Scand J Immunol* 2008; 68: 75-84.
11. Maitra SR, Jacob A, Zhou M, Wang P. Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3: 180-5.
12. Maitra SR, Bhaduri S, Valane PD, ym. Inhibition of matrix metalloproteinases by chemically modified tetracyclines in sepsis. *Shock* 2003; 20: 280-5.
13. Steinberg J, Halter J, Schiller HJ, ym. Metalloproteinase inhibition reduces lung injury and improves survival after cecal ligation and puncture in rats. *J Surg Res* 2003; 111: 185-95.
14. Steinberg J, Halter J, Schiller H, ym. Chemically modified tetracycline prevents the development of septic shock and acute respiratory distress syndrome in a clinically applicable porcine model. *Shock* 2005; 24: 348-56.
15. Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E, ym. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: Prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 867-72.
16. Lorente L, Martín M, Labarta L, ym. Matrix metalloproteinase-9, -10 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit Care* 2009; 13: R158.
17. Gäddnäs, F, Sutinen MM, Koskela M, ym. Matrix metalloproteinase-2, -8 and -9 in serum and skin blister fluid in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2010; 14: R49.
18. Solan PD, Dunsmore KE, Denenberg AG, ym. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. *Crit Care Med* 2012; 40: 379-87.
19. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor- α -induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res* 1995; 703: 151-5.
20. Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, ym. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* 2001; 893: 104-12.