

**PITKÄKETJUISTEN RASVAHAPPOJEN VAIKUTUS
MONOSYYTTIEN MMP-9:N ERITYKSEEN**

Maria Asmala
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Lääketieteellisen biokemian tutkimusryhmä
2012

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Lääketieteellisen biokemian tutkimusryhmä

ASMALA MARIA: PITKÄKETJUISTEN RASVAHAPPOJEN VAIKUTUS MONOSYYTTIEN MMP-9:N ERITYKSEEN

Kirjallinen työ, 30 s.
Ohjaaja: Tiina Solakivi
Lokakuu 2012

Avainsanat: ateroskleroosi, arakidonihappo, eikosapentaeenihappo, dokosapentaeenihappo, dokosaheksaeenihappo, matriksin metalloproteinaasit

Tutkimuksen taustaa

Pitkäketjuisista rasvahapoista peräisin olevien johdannaisten on todettu olevan merkittävässä asemassa elimistön tulehdusreaktioiden säätelyssä. On todettu, että n-6 perheen rasvahaposta, arakidonihaposta, peräisin olevilla johdannaisilla on enemmän proinflammatorisia vaikutuksia kuin n-3 perheen rasvahapoilla (eikosapentaeenihappo, dokosapentaeenihappo, dokosaheksaeenihappo). Useissa tutkimuksissa on myös saatu viitteitä, että n-3 perheen rasvahapoilla olisi ehkäisevää vaikutusta sydän- ja verisuonisairauksissa. Tutkimuksissa on löydetty myös viitteitä MMP-9:n mahdollisesta osuudesta sydäntapahtumissa. Tässä tutkimuksessa halusimme selvittää, vähentääkö seerumittomassa mediumissa, x-vivossa, kasvaneiden ihmisen MonoMac 6 -monosyyttien inkuboiminen etukäteen n-3 perheen rasvahapoissa arakidonihapon indusoivaa vaikutusta matriksimetalloproteinaasi 9:n eritykseen.

Tulokset

Havaitsimme, että tutkimistamme n-3 perheen rasvahapoista dokosapentaeenihapolla ja dokosaheksaeenihapolla oli merkittävä MMP-9:n eritystä vähentävä vaikutus, kun soluja ensin oli inkuboitu 24 h arakidonihapossa. DPA:ssa kasvaneet solut tuottivat MMP-9:ää 15 % ja DHA:ssa kasvaneet solut 18 % ainoastaan arakidonihapossa kasvaneisiin soluihin verrattuna. Eikosapentaeenihapossa kasvaneet solut tuottivat MMP-9:ää 94 % arakidonihapossa kasvaneisiin verrattuna eli väheneminen oli vain 6 %. Tutkimuksessa myös havaittiin, että prosessi on hyvin herkkä ulkoisille tekijöille, esimerkiksi haihtuminen ja siitä seuranneet konsentraatioerot tuottivat hyvin erilaisia tuloksia.

Pohdinta

Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että kun MonoMac 6 -soluja viljellään optimaalisessa kasvuympäristössä, dokosapentaeenihappo (DPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA) vähentävät merkittävästi arakidonihapon indusoivaa vaikutusta MMP-9 tuotantoon. Näistä DPA:lla oli hieman voimakkaampi vaikutus kuin DHA:lla. Sen sijaan eikosapentaeenihappo (EPA) ei juuri vähentänyt MMP-9:n eritymistä.

SISÄLLYSLUETTELO

1.0 Johdanto	
1.1 Pitkätetjuiset rasvahapot	1
1.2 Rasvahappojen osuus inflammatorisissa prosesseissa	1
1.3 N–6 ja n–3 -suhteen vaikutus kardiovaskulaariterveyteen	3
1.4 Matriksimetallproteiinaasit	5
1.5 Matriksimetallproteiinaasi 9	5
1.6 MMP–9:n yhteys kardiovaskulaariterveyteen	7
1.7 Pitkätetjuisten rasvahappojen ja MMP-9:n välinen yhteys	7
2.0 Tutkimusasetelma	8
3.0 Materiaalit ja menetelmät	8
3.1 Reagenssit	8
3.2 Rasvahapot	8
3.3 Soluviljely	9
3.31 Koeasetelma 1	9
3.32 Koeasetelma 1, poikkeava koe	10
3.33 Koeasetelma 2	10
3.4 Proteiiniaktiivisuuden määrittäminen	11
3.5 Kuvien analysointi	11
3.6 Tilastolliset menetelmät	12
4.0 Tulokset	12
4.1 Koeasetelma 1	12
4.2 Koeasetelma 1, poikkeava koe	13
4.3 Koeasetelma 2, ensimmäiset sarjat	14
4.4 Koeasetelma 2, jälkimmäiset sarjat	17
4.5 Keskiarvon keskihajonnan vertailu	19
5.0 Pohdinta	21
6.0 Loppusanat	24
Lähteet	25

1.0 JOHDANTO

1.1 Pitkäketjuiset rasvahapot

Linolihaposta (LA 18:2 n–6) muodostuva arakidonihappo (AA 20:4 n–6) sekä α -linoleenihappojohdannaiset (ALA 18:3 n–3) eikosapentaeenihappo (EPA 20:5 n–3), dokosapentaeenihappo (DPA 22:5 n–3) ja dokosaheksaeenihappo (DHA 22:6 n–3) ovat elimistön tärkeitä monityydyttymättömiä rasvahappoja (PUFA).

Linolihappoa ja α -linoleenihappoa sanotaan usein välttämättömiksi rasvahapoiksi (EFA), sillä eläinsolut eivät kykene syntetisoimaan niitä *de novo*, vaan ne on saatava ravinnosta [1]. Ihmiset, kuten useimmat muutkin nisäkkäät, kykenevät muodostamaan linolihaposta ja α -linoleenihaposta edellä mainittuja johdannaisia eli arakidonihappoa sekä eikosapentaeenihappoa, dokosapentaeenihappoa ja dokosaheksaeenihappoa, vaikka se on hidasta [2]. Näiden kahden rasvahapon johdannaiset, vaikka eivät varsinaisesti ole välttämättömiä, ovat kuitenkin tärkeässä osassa, sillä monet välttämättömien rasvahappojen biologisista funktioista välittyvät juuri johdannaisten kautta. EFA ja niiden johdannaiset toimivat muun muassa energianlähteenä sekä membraanikomponentteina: siinä missä solujen proteiinit ovat geneettisesti määräytyneet, solukalvojen sisältämien monityydyttymättömien rasvahappojen määrä riippuu suuresti dietäarisestä saannista. [3]. Niiden ansiosta muun muassa membraanit ovat juoksevampia. Lisäksi PUFA:illa on myös inflammaatioita moduloivia vaikutuksia [4].

1.2 Rasvahappojen osuus inflammatorisissa prosesseissa

Tulehdusta välittävät ja säätelevät tekijät ovat eikosanoideja, jotka muodostuvat syklo-oksigenaasien (COX) ja lipoksygenaasien (LOX) avustuksella 20–hiilisistä monityydyttymättömistä rasvahapoista. Tulehdussolut sisältävät paljon arakidonihappoa, joka on n–6 perheen PUFA, ja vähemmän n–3 perheen rasvahappoja. Pääasiassa eikosanoidit ovat siis arakidonihapon metaboliatuotteita, esimerkkeinä niistä muun muassa prostaglandiinit, tromboksaanit, leukotrieenit, lipoksiinit ja hydroksirasvahapot. [3].

Ihmisillä AA:n määrään tulehdussoluissa vaikuttaa ruokavalion n-6 perheen rasvahappojen määrä, joka ainakin länsimaisessa ruokavaliossa on kasvanut [3, 5]. Myös rotilla on saatu vastaavanlaisia tuloksia [6]. Lisääntyneen omega-6-rasvahappojen määrä nostaa myös AA:n pitoisuutta, ja lisääntynyt AA:n pitoisuus taas lisää inflammatoristen eikosanoidien tuottoa [3, 7] mutta se ei vaikuta tulehduksellisten sytokiinien tuotantoon [7, 8]. Sen sijaan lisääntynyt n-3 sarjan rasvahappojen käyttö lisää myös tulehdussolujen n-3 rasvahappopitoisuutta [9, 10, 11]. Molempien rasvahappoperheiden metaboliaa hoitavat samat entsyymit, kuten esimerkiksi syklo-oksigenaasi (COX) ja lipoksigenaasi-5 (LOX-5), mutta niiden affiniteetti on suurempi n-3 perheen rasvahapoille kuin n-6 perheen. Mitä enemmän n-3 rasvahappoja on kilpailemassa entsyymeistä, sitä enemmän inflammatoristen välittäjäaineiden muodostuksessa käytetään n-3 perheen rasvahappoja AA:n sijasta. [12]. Tällä on etunsa, sillä n-3-johdannaisien eikosanoidien ajatellaan olevan vähemmän inflammatorisia kuin AA:sta peräisin olevien: esimerkiksi AA:sta muodostunut leukotrieni B₄ (LTB₄) on 10–100 kertaa potentimpi, kuin EPA:sta muodostunut leukotrieni B₅ (LTB₅) [13, 14], ja lisäksi AA:sta muodostunut prostaglandiini E₂ (PGE₂) on potentimpi COX-2-geeniekspression indusoija, kuin EPA:sta muodostunut prostaglandiini E₃ (PGE₃) [15]. Tiedetään myös, että dokosaheksaenihaposta muodostuu inflammaation vaimenemista edistäviä resolviineja [12].

Paitsi toimimalla antagonisteinä arakidonihapon metaboliassa, n-3 perheen rasvahapoilla on muitakin anti-inflammatorisia vaikutuksia. ω-3 ravintolisä vähensi ihmisen neutrofiilien ja monosyyttien kemotaksista erilaisia kemoatraktantteja, kuten LTB₄:ä, bakteeripeptidejä ja ihmisen seerumia, kohtaan. [16, 17, 18, 19]. Lisäksi n-3 PUFA:t vähentävät solujen pinnalla olevien adheesiomolekyylien ekspressiota [20, 21, 22]. N-3 perheen rasvahapoilla on myös anti-inflammatoristen ja immunomoduloivien vaikutusten kautta mahdollisesti vaikutusta ateroskleroosiin ja sen kliinisiin ilmentymiin, kuten sydäninfarktiin ja äkkikuolemaan, sekä muihin metabolisiin sairauksiin [23, 24]

1.3 N–6 ja n–3 -suhteen vaikutus kardiovaskulaariterveyteen

Suurimmat muutokset ruokavalioomme ovat tulleet agraarikulttuurin kehittymisen myötä noin 10 000 vuotta sitten. Koska DNA:n korjausmekanismit ovat hyvät, geenimme eivät ole juurikaan muuttuneet sen jälkeen. Tämän vuoksi alkuperäiseen ruokavalioon totunut kehomme on altis elinympäristömme muutoksille, jotka ovat olleet erityisen merkittäviä viimeisten 150 vuoden aikana. Teollinen vallankumous on vaikuttanut paitsi ravinnon tuotantoon myös sen jatkokäsittelyyn – nykyaikana syömämme ruoka eroaa näin ollen valtavasti siitä ravinnosta, johon kehomme ja geenimme aikoinaan ovat sopeutuneet. Näin on myös monityydyttymättömien rasvahappojen kohdalla. Nykyaikaisessa länsimaisessa ruokavaliossamme on puutetta n–3 perheen rasvahapoista ja lisäksi n–6-rasvahappojen suhde n–3-rasvahappoihin on vääristynyt: syömässämme ravinnossa suhde on 15–20/1, kun taas vapaana luonnossa elävillä eläimillä se on 1/1. [25–28].

N–6 ja n–3 -rasvahapoista on tehty lukuisia tutkimuksia eikä tuloksista ole voitu vetää kiistattomia johtopäätöksiä. Linolihapon (LA) hyödyistä löytyy julkaisuja 1980-luvulta: Terveillä eurooppalaisilla miehillä tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että korkeampi LA:n saantia kuvaavan rasvakudoksen LA:n määrä yhdistyi pienempään koronaaritautikuolleisuuteen [29]. Toisessa tutkimuksessa matala LA:n saanti ruokavaliosta altisti sydäninfarkteille [30]. Kolmannessa tutkimuksessa seerumin linolihapon todettiin vähentävän kardiovaskulaarikuolleisuutta sydäninfarktin sairastaneilla keski-ikäisillä miehillä [31].

Kuitenkin linolihapon (LA) haitoista on 1990-luvulla julkaistu useita tutkimuksia. LDL:n (low density lipoprotein) hapettuminen lisää sen aterogeenisyyttä verisuonissa: fagosytoivien solujen reseptorit, jotka eivät havaitse muuttumatonta LDL:a, havaitsevat oksidoituneet LDL-partikkelit, fagosytoivat ne ja muuttuvat vaahtosoluiksi. Tutkimuksissa on osoitettu, että ruokavalio, jossa oli runsaasti LA:a, lisäsi LDL-partikkeleiden LA-pitoisuutta ja herkisti myös LDL:n hapettumiselle [32, 33]. Samoin Louheranta *et al.* [34] osoittivat, että kun LA:sta saatavan energian prosenttiosuus nousi alemmasta kvartiilista (2,9 %) ylimpään kvartiiliin (6,4 %), samalla lisääntyi myös LDL:n oksidaatio. Hapettunut LDL ja sitä vastaan muodostuneet vasta-aineet ovat osa ateroskleroottista prosessia [35].

2002 julkaistussa meta-analyysissä, jossa arvioitiin satunnaistettuja kontrolloituja tutkimuksia, havaittiin, että lisäämällä n–3 -rasvahappojen saantia ruokavaliossa, saatiin

vähennettyä tappavien iskeemisten sydänsairauksien riskiä sekä äkkikuolemia sepelvaltimotautia sairastavilla henkilöillä [36]. Wheltonin ym. tekemässä epäkoikeellisia tutkimuksia arvioivassa meta-analyysissä havaittiin, että kalan syöminen vähensi merkittävästi riskiä saada sepelvaltimotauti [37]. Edellistä tulosta tukevat prospektiiviset kohorttitutkimukset osoittivat, että eikosapentaeenihappoa (EPA) ja dokosaheksaeenihappoa (DHA) sisältävät kalat ja kalaöljyt vähentävät kardiovaskulaarikuolleisuutta, mutta kasviöljyistä peräisin oleva α -linoleenihappo ei ole yhtä tehokas kardiovaskulaarikuolleisuuden vähentäjä [38]. Edellä mainittuja tuloksia tukee myös tutkimus vuodelta 2002, jossa n-3 -rasvahappolisä terveellisen ravinnon lisänä suojaasi sepelvaltimotaudilta [39]. Erittäin laajassa satunnaistettuja kontrolloituja tutkimuksia ja prospektiivisiä kohorttitutkimuksia arvioivassa katsauksessa saatiin tulokseksi, että n-3 -rasvahappojen lisääntynyt saanti kalasta tai kalaöljyä sisältävistä ravintolisistä vähentää yleisesti kuolleisuutta, sydänkuolemia ja äkillisiä kuolemia sekä mahdollisesti myös aivoverenkiertohäiriöitä. Samaa vaikutusta ei kuitenkaan havaittu olevan ravinnosta saatavalla α -linoleenihapolla. Kalaöljyn suojaava vaikutus näytti olevan vahvempi sekundaari- kuin primaaripreventiossa. [40].

Koska n-6 ja n-3 -rasvahappojen oikeasta suhteesta oli käyty paljon keskustelua, Britanniassa käynnistettiin OPTILIP-tutkimus, jossa muista aiemmista tutkimuksista poiketen annettiin ruokavalio-ohjausta sen sijaan, että olisi tutkittu vain yhtä ruoka-ainetta tai ravintolisää. Myös tutkimusryhmä oli suurempi kuin muissa tutkimuksissa ja kesto oli pitkä, 6 kuukautta. Ryhmällä, jonka ravinnossa n-6 ja n-3 -rasvahappojen suhde oli 3:1, todettiin huomattava väheneminen seerumin triglyseridi- ja LDL-arvoissa sekä aterian jälkeisessä lipemiassa. Lisäksi heidän ravintonsa n-6 ja n-3 -suhde muuttui selkeästi edullisempaan suuntaan alkuperäisestä 6,7:stä 2,9:än. Kontrolliryhmällä tämä suhdeluku tutkimuksen päätyttyä oli noussut 7,1:stä 11,4:än. Keskimäärin tutkimusryhmiin osallistuneet henkilöt käyttivät n-3 -rasvahappoja 0,5 g/vrk ja jo 6 kuukauden käyttö oli aiheuttanut merkittäviä muutoksia heidän seeruminsa lipideihin. [41].

Ravinnon n-6 ja n-3 -rasvahappojen oikea suhde ei edellisten tutkimusten valossa siis ole lainkaan merkityksetön. Länsimaissa ihmiset saavat keskimäärin ylimäärin n-6 -rasvahappoja ja vähemmän n-3 -rasvahappoja. Kuitenkin juuri n-3 -perheen rasvahappojen on osoitettu lukuisissa tutkimuksissa vähentävän riskiä sydän- ja verisuonisairauksiin sekä niistä aiheutuviin kuolemiin, joten niiden saantia ravinnosta olisi lisättävä.

1.4 Matriksimetalloproteinaasit

Matriksimetalloproteinaasit, joita kutsutaan myös matriksiineiksi, ovat proteaaseja, jotka osallistuvat ekstrasellulaarimatriksin (ECM) hajottamiseen [42, 43]. Ekstrasellulaarimatriksi koostuu solujen ympärillä olevista makromolekyyleistä, joilla on tärkeä rooli, koska ne muun muassa antavat rakenteellista tukea ympäröimilleen soluille sekä varastoivat biologisesti aktiivisia molekyylejä, kuten kasvutekijöitä [43]. Ekstrasellulaarimatriksia tarvitaan lisäksi esimerkiksi kudoksen paranemisen ja uudelleenmuodostuksen yhteydessä. Normaaleissa olosuhteissa matriksimetalloproteinaasien toiminta on tarkkaan säädeltyä. [42, 43]. Säätelyn menetys voi aiheuttaa monenlaisia tauteja, kuten syöpää, artriittia, ateroskleroosia ja emfyseemaa [44]. Matriksiineilla on myös spesifisiä inhibiittoreita, joita kutsutaan metalloproteinaasien kudoshäviöinhibiittoreiksi (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs). Ne kontrolloivat metalloproteinaasien aktiivisuutta kudoksissa. [45, 46].

Matriksimetalloproteinaasit ovat kalsiumista riippuvaisia ja sinkkiä sisältäviä endopeptidaaseja [47]. Niiden perusrakenne koostuu signaalipeptidistä, prodomeenista, katalyyttisestä domeenista, linkkipeptidistä eli sarana-alueesta ja hemopeksiini-domeenista. Ne voidaan jakaa substraattispesifisyyden, sekvenssien samankaltaisuuden ja domeenien järjestäytymisen mukaan kuuteen eri ryhmään: kollageenaaseihin, gelatinaaseihin, stromelysiineihin, matrilysiineihin, membraanityyppisiin MMP:hin (MT-MMPs) ja muihin MMP:hin.

1.5 Matriksimetalloproteinaasi 9

Matriksimetalloproteinaasi 9 (MMP-9), toiselta nimeltään gelatinaasi B, on molekyylikooltaan 92 kD ja kuuluu nimensä mukaisesti gelatinaasien ryhmään, johon sen lisäksi kuuluu MMP-2 eli gelatinaasi A. MMP-9 kykenee hajottamaan gelatiinia, tyyppin IV, V ja VII kollageeneja, elastiinia ja laminiinia. [48, 49].

MMP-9:n perusrakenne on muiden metalloproteinaasien kaltainen. Signaalipeptidin jälkeen on prodomeeni, joka koostuu kolmesta α -heliksistä ja liitossilmukoista. Prodomeeni sisältää myös kysteiiniosan, joka sitoutumalla entsyymin aktiivisen kohdan sinkki-atomiin estää entsyymin ja substraatin kohtaamisen ja näin ollen pitää zymogeenin

inaktiivisena. [50]. Seuraava osa, katalyyttinen domeeni, sisältää 5–juosteisen β –laskosteisen levyn, kolme α –heliksiä ja liitossilmukoita. Katalyyttisen domeenin keskellä on kuitenkin MMP–9:lle ja MMP–2:lle spesifiset kolme jaksoa tyyppin II fibronektiini -domeenia, jotka ovat vuorovaikutuksessa kollageenien ja gelatiinien kanssa. Katalyyttinen domeeni sisältää yhden katalyyttisen sinkki-ionin, yhden rakenteeseen kuuluvan sinkki-ionin ja rakennetta stabiloivat kolme kalsiumionia. Se myös muodostaa entsyymien substraatin sitoutumiskohtaan. [51–53]. Linkkiosan jälkeisessä hemopeksiini-domeenissa polypeptidiketju on β –laskoksina muodostanut 4–osaisen propellia muistuttavan proteiinin, joka pysyy koossa yhden disulfidi-sidoksen avulla [54].

Kuten monet muutkin proteaasit, MMP–9 syntetisoidaan pre-proentsyyminä. Translaatiossa signaalipeptidi poistetaan ja muodostuu pro-MMP eli inaktiivinen zymogeeni. Tässä muodossa MMP eritetään ulos solusta. Joidenkin matriksimetalloproteinaasien kohdalla aktivoiminen voi tapahtua intrasellulaarisesti [55], mutta MMP–9 aktivoidaan solun ulkopuolella. MMP:n aktivaatio vaatii kaksi proteolyyttistä katkaisua: Pro-MMP:n prodomeenista katkaistaan ensin erityisen herkkä peptidiosa pois, minkä vuoksi proteiini menettää stabiilin rakenteensa, jäljelle jäänyt osa paljastuu proteolyttiselle entsyymille ja lopullinen aktivoiminen voi tapahtua. Tämän aktivoinnin viimeisen vaiheen hoitavat jo kokonaan tai osittain aktivoituneet MMP:t. [56]. Esimerkiksi plasmiini voi aktivoida Pro-MMP–9:ä eli toimia ensivaiheen aktivoijana [57], kuten myös MMP–7 ja MMP–2 [58]. Myös solun pinnalla membraanityypin matriksimetalloproteinaasit (MT-MMP:t) voivat TIMP:n kanssa yhdessä aktivoida pro-MMP:ja [59]. Zymogeenimuotoista MMP–9:ä kykenee aktivoimaan suoraan ainakin aktivoitu MMP–3. Lisäksi MMP–3 pystyy aktivoimaan pro-MMP–9:ä epäsuorasti aktivoimalla MMP–7:ä. [60]. Jälkimmäisen katkaisun jälkeen zymogeenistä tulee aktiivinen entsyymi.

MMP–9: aktiivisuutta voidaan säädellä ainakin kolmessa kohdassa: geenin transkription tasolla, posttranslationalisella zymogeenien aktivoinnilla ja MMP:n inaktivoinnin kautta [61]. Avainasemassa on transkription säätely [62]. Normaaleissa kudoksissa MMP:a ei juurikaan ekspressoidu. Kuitenkin kun oli altistettu soluviljelmissä kasvavia soluja tekijöille, jotka normaalioloissa tuottaisivat kudoksissa kudonvauriota, todettiin, että kaikki soluviljelmissä kasvatetut solut kykenevät sitä tuottamaan. [63]. On todettu, että tietyt tekijät, kuten esimerkiksi hapettunut LDL [64], tuumorinekroosifaktori- α (TNF- α) [65] ja hyperglykemia [66], lisäävät MMP–9:n erittymistä. Sen sijaan esimerkiksi eräät lääkkeet, kuten statiineista fluvastatiini ja simvastatiini, vähentävät MMP–9:n eritystä in vitro [67].

1.6 MMP–9:n yhteys kardiovaskulaariterveyteen

Sepelvaltimoissa tapahtuvan ateroskleroottisen palkin repeämä ja sitä seuraava tromboosi on pääasiallinen syy akuuttiin koronaaritapahtumaan. Plakin rupturaatiossa aterooman kroonisella inflammaatiolla on tärkeä osuus [68]. Shalin ym. tekemässä tutkimuksessa osoitettiin, että ihmisen monosyyteistä peräisin olevat makrofagit indusoivat ihmisten ateroskleroottisten plakkien sidekudoksen kollageenin hajotusta [69]. Etenkin plakkien reunoilla ja makrofageista muodostuneiden vaahtosolujen lähetyillä on lisääntynyt määrä MMP–9:ää [70]. Ateroskleroottisissa plakeissa makrofagien lisäksi myös sileät lihassolut tuottavat MMP–9:ää [71]. Sepelvaltimotautia luonnehtii siis sekä valtimon seinämän inflammaatio että lisääntynyt MMP–9:n ekspresio [72, 73]. Temporaaliarteriitissa valtimon seinämien inflammaatiossa MMP–9:ä on havaittu esiintyvän seinämän sisimmän kerroksen elastisen laminan alueella olevissa makrofageissa [74]. Lisäksi tulehtuneiden valtimoiden mediassa on havaittu lisääntynyt MMP–9:n mRNA:n pitoisuus [75]. Paitsi paikallisesti myös systeemisesti on voitu havaita kohonneita MMP–9:n tasoja kardiovaskulaarisairauksiin liittyen: Kalelan ym. tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että seerumin MMP–9:n taso oli kohonnut henkilöillä, jotka sairastivat sepelvaltimotautia. MMP–9:n pitoisuudet olivat korkeimmat niillä, joilla oli kolmen suonen tauti verrattuna yhden tai kahden suonen tautia sairastaviin henkilöihin. [76]

1.6 Pitkäketjuisten rasvahappojen ja MMP–9:n välinen yhteys

Äskettäin tehdyissä tutkimuksissa on todettu, että pitkäketjuisista rasvahapoista arakidonihapolla on vaikutusta solumatriksin gelatiinia pilkkovan matriksimetalloproteinaasi 9:n (MMP–9) ekspressioon. 10 µM arakidonihapon todettiin lisäävän MMP–9:n erittymistä soluista jo 1 h inkubaation jälkeen ja kasvun jatkuvan ainakin 6 h. Ensimmäisen tunnin jälkeen ilmenevä MMP–9:n pitoisuuden lisääntyminen johtuu oletettavasti varastorakkuloiden tyhjentymisestä, mutta tämä ei voi olla syy pidemmän aikavälin lisääntyneeseen pitoisuuteen, vaan ilmiön takana on geeniekspression lisääntyminen. Muilla pitkäketjuisilla rasvahapoilla eli EPA:lla, DPA:lla ja DHA:lla vastaavaa vaikutusta ei havaittu. Myöskään solujen inkuboiminen yhtä aikaa sekä arakidonihapossa että EPA-, DPA- tai DHA-liuoksessa ei saanut AA:n MMP–9:n ekspressiota lisäävää vaikutusta häviämään. [77].

2.0 TUTKIMUSASETELMA

Koska aikaisemman tutkimuksen mukaan solujen inkuboiminen samanaikaisesti sekä arakidonihapossa että EPA-, DPA- tai DHA-liuoksissa ei saanut AA:n MMP-9:n ekspressiota lisäävää vaikutusta häviämään, oman tutkimukseni tarkoituksena oli selvittää, voisiko preinkubaatio edellä mainituissa rasvahappoliuoksissa saada tämän aikaan. Yksityiskohtaisemmin sen tarkoituksena oli selvittää, vähentääkö seerumittomassa mediumissa, x-vivossa, kasvaneiden ihmisen MonoMac 6 -monosyyttien inkuboiminen etukäteen n-3 perheen rasvahappoja sisältävässä mediumissa (EPA, DPA ja DHA) arakidonihapon indusoivaa vaikutusta matriksimetalloproteinaasi 9:n eritykseen.

3.0 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Reagenssit

Kaikki käytetyt reagenssit oli hankittu Sigma-Aldrichilta (USA) tai Merckiltä (Saksa), ellei toisin ole mainittu.

3.2 Rasvahapot

Arakidonihappo, eikosapentaeenihappo, dokosapentaeenihappo ja dokosaheksaeenihappo hankittiin mahdollisimman puhtaina (Cayman Chemical Company, USA) ja hapettumisen estämiseksi ne säilytettiin -70 °C:ssa. Soluviljelykokeiden suorittamiseksi rasvahapoista valmistettiin kantaliuokset etanoliin ja kaikissa kokeissa

rasvahapot laimennettiin X-Vivoon niin, että rasvahappojen loppukonsentraatioksi soluviljelymaljalla tuli 10 µmol/l.

3.3 Soluviljely

Tutkimuksessa käytetyt solut olivat ihmisen monosyyttisoluja, MonoMac 6 nimellä German Collection of Microorganisms and Cell Cultures -yhtiöstä hankittuja suspensiossa kasvavia soluja. Soluja viljeltiin RPMI-1640-mediumissa (PAA Laboratories, Saksa), johon oli lisätty 2 mM L-glutamiinia, 5 ml/l non-essentiaaleja aminohappoja (PAA Laboratories), penisilliiniä (50 IU/ml), 1 mM natriumpyruvaattia, 1 mM oksaloasetaattia, 0,2 U/ml naudan insuliinia (OPI Media Supplement, Sigma Chemicals Co) ja 10 % kuumassa inaktivoitua nautaeläimen sikiön seerumia (FBS "GOLD", PAA Laboratories). Soluja kasvatettiin kostutetussa 5 %:ssa CO₂:ssa +37 °C:ssa. Solujen kasvutiheytenä pidettiin valmistajan ohjeen mukaisesti 0,3 -1,0 x10⁶ solua/ml. Uutta mediumia lisättiin kolme kertaa viikossa, jolloin yksi kolmasosa solususpensiosta korvattiin uudella mediumilla. Viljelmästä erotettu osuus joko käytettiin tutkimukseen tai hävitettiin. Koetta varten otettu solususpensio sentrifugoitiin 10 min 1000 rpm CRU-5000 Centrifugella (IEC) ja suspensioitiin uudelleen seerumittomaan mediumiin, X-Vivo 15:een (Lonza, Belgia), jossa solujen annettiin olla 24 h ennen kokeen aloitusta.

3.31 Koeasetelma 1

Koeasetelmassa 1 X-Vivossa olleet MonoMac 6 -solut laskettiin Bürckerin kammiossa siten, että lasilla olevasta ruudukosta valittiin satunnaisesti kuusi ruutua, joiden solumäärä laskettiin ja saaduista tuloksista laskettiin keskiarvo. Keskiarvon mukaisesti otettiin tarvittava tilavuus X-Vivossa kasvaneita soluja, solut sentrifugoitiin 10 min 1000 rpm ja liuotettiin uudelleen X-Vivoon siten, että konsentraatioksi tuli haluttu 800 000 solua/ml. Saatua solususpensiota annosteltiin annostelijaa käyttäen 1 ml (noin 800 000 solua/ml) kahteentoista kuoppaan Nunclon-kasvatusmaljalle (Nunc A/C, Tanska). Neljä kuoppaa jätettiin kontrollinäytteiksi: kahteen niistä lisättiin 100 µl etanolia (EtOH, loppukonsentraatio 10 µM) ja kahteen kontrollikuoppaan (C) lisättiin vain 100 µl mediumia eli solut saivat kasvaa omassa normaalissa mediumissaan. Muihin kahdeksaan kuoppaan lisättiin 10 µM rasvahappoja alla olevan pipetointikaavion mukaan: arakidonihappo (AA), eikosapentaeenihappo (EPA), dokosapentaeenihappo (DPA) ja dokosaheksaeenihappo

(DHA) sekoitettiin ensin X-Vivoon, jota lisättiin 100 µl kuoppiin. Kokeet suoritettiin rinnakkaismäärityksinä.

AA	AA	EPA	EPA
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
DPA	DPA	DHA	DHA
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
EtOH	EtOH	Control	Control
100 µl	100 µl		

Kuva 1

Pipetointikaavio.

Tämän jälkeen soluja inkuboitiin edellä mainittujen rasvahappojen läsnäollessa 48 h +37 °C:ssa. Inkubaation jälkeen solut kerättiin, sentrifugoitiin 10 min 1000 rpm ja suspensoitiin uusiin kuoppiin. Seuraavaksi jokaiseen kuoppaan lisättiin 100 µl arakidonihappolaimennosta ja soluja inkuboitiin tässä liuoksessa 24 h. Tämän jälkeen sekä solut että medium kerättiin ja varastoitettiin erikseen pakastimeen -18 °C:een odottamaan proteinaasiaktiivisuusmäärittystä.

3.32 Koeasetelma 1, poikkeava koe

Lisäksi yksi koesarja tehtiin poikkeuksellista koeasetelmaa 1 käyttäen siten, että ensimmäisten rasvahappojen inkubointiaika oli 48 h:n sijasta vain 24 h ja lisäksi ainoastaan mediumia ja soluja sisältävät kontrollikuopat (C) puuttuivat. 24 h:n inkuboinnin jälkeen koe jatkui koeasetelma 1:n tapaan: solut kerättiin, puhdistettiin ja suspensoitiin uusiin kuoppiin ja arakidonihappo lisättiin.

3.33 Koeasetelma 2

Koeasetelma 2 oli täysin samanlainen kuin koeasetelma 1, mutta 48 h:n rasvahappoinkubaation jälkeen soluja ei kerätty kuopista. Jokaisesta kuopasta otettiin

koeputkeen talteen 100 µl mediumia, joka pakastettiin, ja tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 100 µl arakidonihappolaimennosta. Tämän jälkeen koejärjestely noudatti ensimmäisen koetavan periaatteita: lisätyn arakidonihapon inkubaatioaika oli 24 h, ja tämän jälkeen sekä medium että solut kerättiin ja pakastettiin.

3.4 Proteinaasiaktiivisuuden määrittäminen

Gelatiinizymografia

Soluviljelykokeiden jälkeen kerätyistä mediuumeista määritettiin matriksimetalloproteinaasi 9:n (MMP-9) aktiivisuus käyttäen gelatiinizymografiaa [78]. Ensimmäisessä vaiheessa molekyylit erotettiin koon ja varauksen perusteella SDS-polyakryyliamidigeleielektroforeesilla. Toisessa vaiheessa geelissä erottuneet entsyymit aktivoitiin ja niiden aktiivisuus ilmeni geelissä olevan gelatiinin pilkkoutumisesta johtuen värjäytymättöminä raitoina. Geeli koostui kahdesta osasta: 5 mg/ml gelatiinia (Sigma) sisältävästä alageelistä, jossa proteaasit ajon loputtua aktivoituivat, sekä 10 % SDS-polyakryyliamidi-ylägeelistä, jonka kaivoihin näytteet annosteltiin ennen ajoa. Ennen annostelua mediumnäyte oli laimennettu 1:3 elektroforeesin näytepuskuriin [79]. Näytteet ajettiin Mini-PROTEAN-laiteella (Bio Rad) erityisessä ajopuskuri-liuoksessa (124 mM Tris-HCl, 960 mM glysiini, 17 mM SDS, laimennettuna veteen 1:4, pH 8,3) 15 min (150 V) huoneenlämmössä ja 40 min (200 V) +4 °C:ssa laitteen liiallisen lämpenemisen estämiseksi. Elektroforeesin jälkeen entsyymien alkuperäinen rakenne palautettiin huuhtelemalla niitä 2 x 30 min 0,25 %:ssa Triton X-100:ssa ja sen jälkeen entsyymit aktivoitiin inkuboimalla geelejä erityisessä inkubointiliuoksessa (50 mM Tris-HCl, 15 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂ ja 1 % Triton X-100, pH 7,5) +37 °C:ssa 18 tunnin ajan. Inkuboinnin aikana entsyymit hajottivat gelatiinia ympäriltään. Inkuboinnin jälkeen geelit värjättiin 1,5 h Coomassie Brilliant Blue® -väriliuoksessa (0,1 % Coomassie Brilliant Blue® 40 %:ssa propanoliliuoksessa) ja lopuksi huuhdeltiin värinpoistoliuoksessa (7 % etikkahappoliuos) vähintään kolmen tunnin ajan, minkä jälkeen entsyymien aktiivisuuden seurauksena muodostuneet värjäytymättömät kohdat geelistä paljastuivat.

3.5 Kuvien analysointi

MMP-9 aktiivisuutta heijastava gelatiinin hajoamisen aste määritettiin tietokoneella

käytettävällä Epson Perfection 3200 Photo scanner -ohjelmalla. Geelit skannattiin Epson Scan -ohjelmistolla käyttäen dia-asetusta ja harmaa skaala -asetusta. Skanneri kalibroitiin käyttämällä Stouffer Graphic Arts kalibrointitaulukkoa. Kuvat analysoitiin Scion Image -ohjelmistolla (Scion Corporation). Tiheysarvot linearisoitiin käyttäen Scion Image -ohjelman Rodbard-funktiota. Kuvista tehtiin digitaalisesti käänteiset versiot, jotta analysoinnissa saatavat arvot olisivat positiivisia. Pikselitiheys määritettiin kunkin MMP-9 raidan alalta. Saadusta absorbanssiin vertautuvasta lukemasta vähennettiin taustan tiheys, ja saatua arvoa käytettiin ko. alueen entsyymiaktiivisuuden estimaattina. MMP-9:n gelatinoilyttisen aktiivisuuden integroidut tiheysarvot on raportoitu pikseli-intensiteetin tilavuusyksikköinä mm²:ä kohden.

3.6 Tilastolliset metodit

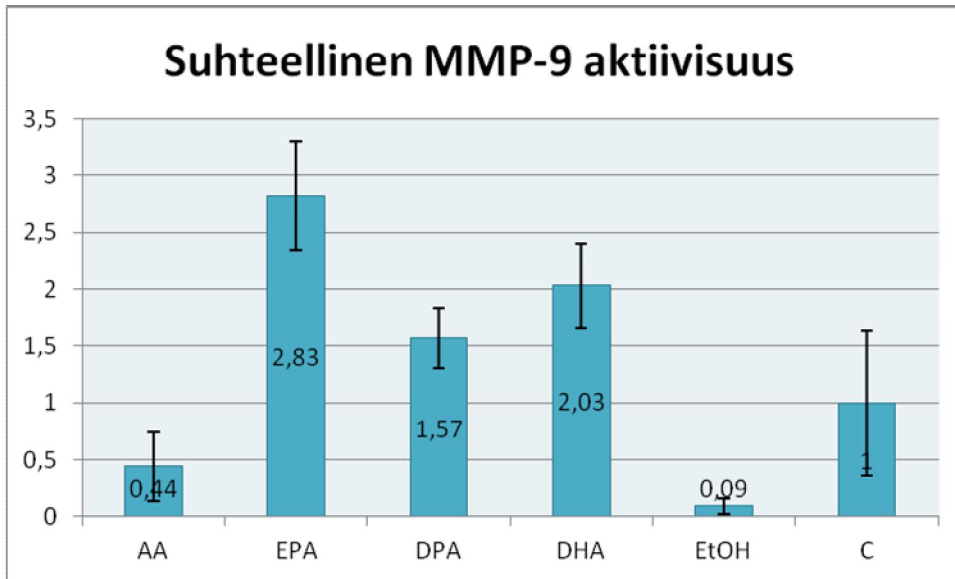
Numeeriset arvot taulukoitiin käyttäen Excel-ohjelmaa (Microsoft Office). Jokaisen koesarjan kahdesta rinnakkaisesta tuloksesta laskettiin keskiarvo, ja näitä keskiarvoja hyväksi käyttäen laskettiin usean koesarjan keskiarvoja sekä erilaisia suhde- ja vertailulukuja.

4.0 TULOKSET

4.1 Koeasetelma 1

Koeasetelmalla 1 tehtiin useita koesarjoja, joista tähän otetaan kolme tarkasteltavaksi. Näiden kolmen koesarjan tulosten mukaan arakidonihapolla olisi MMP-9:n erittymiseen hillitsevä vaikutus: kontrollinäytteessä (C) MMP-9:n erityis on yli kaksinkertainen AA:on verrattuna, EPA:n vaikutus on 6,5-kertainen, DPA:n 3,6 -kertainen ja DHA:n lähes 4,6-kertainen arakidonihappoon verrattuna. Vain etanolia sisältäneessä kuopassa MMP-9:n erityis oli pienempi, vain noin 20 % arakidonihapon erityksestä. Kontrollisoluihin verrattuna

EPA, DPA ja DHA lisäsivät MMP–9:n erittymistä, AA vähensi sitä 56 % ja etanoli jopa 90 %. Tätä havainnollistaa kuva 1.

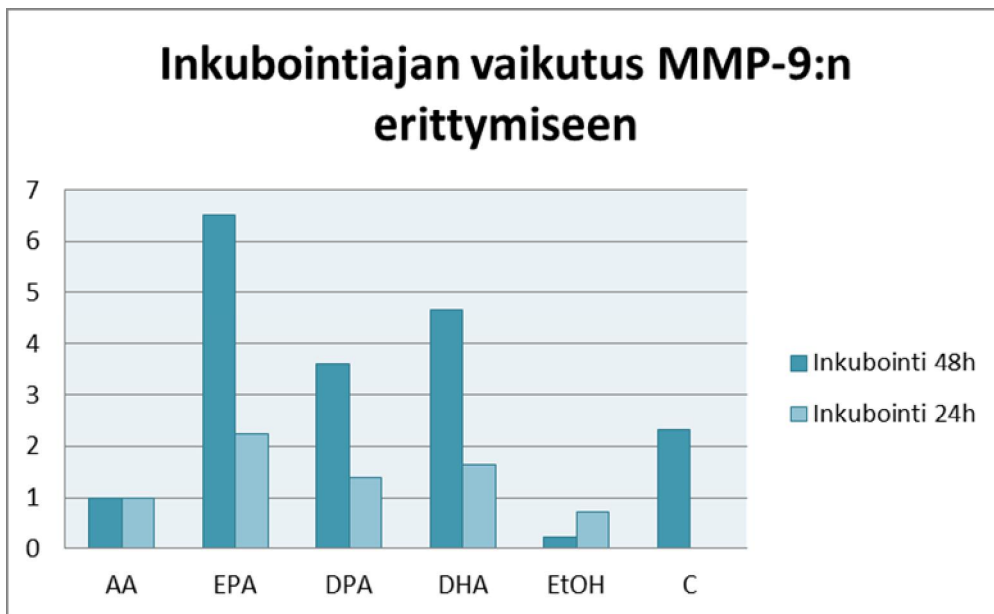


Kuva 1

Eri rasvahappojen vaikutus AA:n indusoimaan MMP–9:n erittymiseen, kun solut kesken kokeen kerättiin, fuugattiin ja suspensoitiin uusiin kuoppiin. Vertailuarvona toimi kontrollinäyte, C. Koeasetelmalla 1 tehdyissä koesarjoissa MonoMac 6 -soluja viljeltiin 48 h eri rasvahapoissa. Tämän jälkeen solut kerättiin ja suspensoitiin uusiin kuoppiin ja 10µM AA:n, EPA:n, DPA:n tai DHA:n läsnä ollessa soluja inkuboitettiin 24 h, mediumit kerättiin ja niistä määritettiin MMP–9:n aktiivisuus gelatiinizymografilla. Kokeet tehtiin rinnakkaismäärityksinä ja toistettiin 3 kertaa.

4.2 Koeasetelma 1, poikkeava koe

Koeasetelmalla 1 tehtiin myös normaalista poikkeava koe, jossa ensimmäisten rasvahappojen inkubaatioaika oli 48 h:n sijasta vain 24 h. Tässäkin kokeessa arakidonihappo vaikutti vähemmän MMP–9:n eritykseen kuin EPA, DPA ja DHA mutta ero ei ollut yhtä huomattava kuin 48 h inkubaation jälkeen, kuten alla olevasta kuvaajasta käy ilmi. (Kuva 2).



Kuva 2

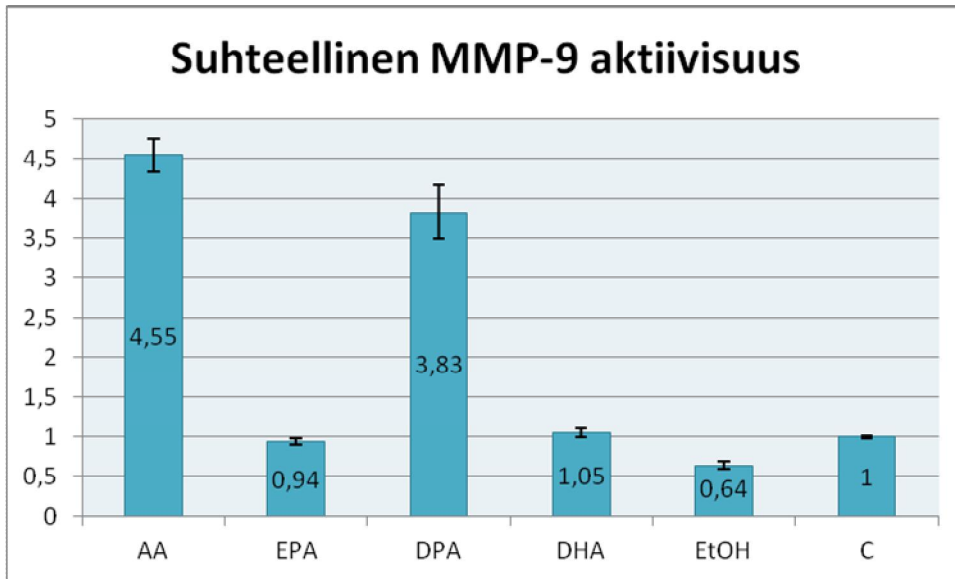
Inkubointiajan vaikutus MMP-9:n erittymiseen. Koeasetelmalla 1 tehty lyhyempi koe, jossa MonoMac 6 -solujen inkubaatioaika oli vain 24 h. Kuvassa näkyy eri rasvahappojen vaikutus MMP-9:n erittymiseen, vertailuarvona toimi arakidonihappo (AA). Saatuja arvoja verrattiin koeasetelman 1 48 h:n inkubaation jälkeen saatuihin arvoihin.

4.3 Koeasetelma 2, ensimmäiset sarjat

Kuten koeasetelmalla 1, myös koeasetelmalla 2 tehtiin useita koesarjoja. Ensimmäisissä sarjoissa solukaapin kosteusolot olivat häiriytyneet ja ilma oli liian kuivaa. Jälkimmäisissä sarjoissa solukaapin ilmankosteus oli optimaalinen.

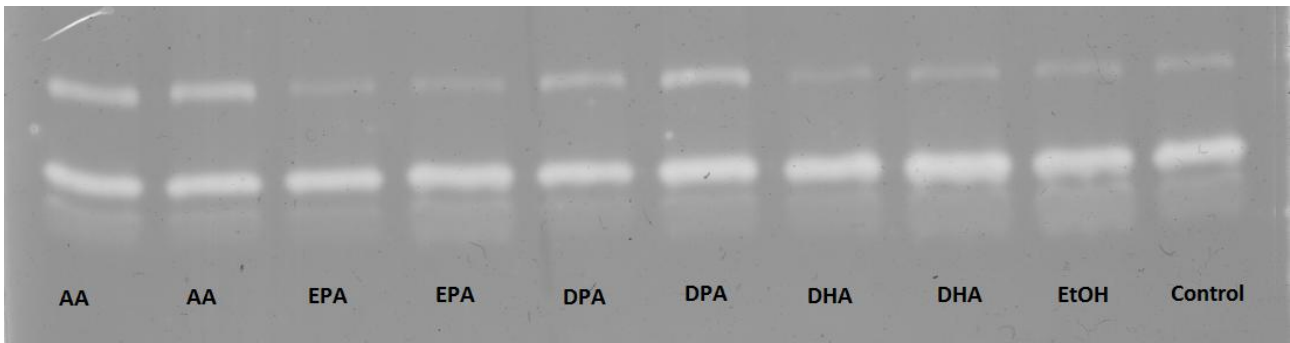
Koeasetelman 2 ensimmäisissä sarjoissa tulokset olivat aivan päinvastaisia koeasetelman 1 tuloksiin verrattuna. Uudistetussa koeasetelmassa arakidonihappo lisäsi eniten MMP-9:n erittymistä, noin 4,5-kertaisesti kontrollinäytteeseen C verrattuna. DPA:ssa inkuboidut solut tuottivat toiseksi eniten entsyymiä, noin 3,8-kertaisesti kontrollinäytteeseen verrattuna. Sen sijaan EPA:ssa ja DHA:ssa kasvatetut solut erosivat hieman MMP-9:n tuotossa kontrollikuopissa C kasvaneista soluista: DPA tuotti 0,94-kertaisesti ja DHA 1,05-kertaisesti MMP-9:ä kontrollisoluihin verrattuna ja molemmat vain noin 20 % verrattuna arakidonihappoon. Tässä ryhmässä koesarjojen keskinäinen vaihtelu oli pientä, mikä käy ilmi alla olevasta kuvasta (Kuva 3). Kuvassa 4 on valokuva tällä koeasetelmalla tehdystä geelistä, siinä on havaittavissa kuvan 3 tulokset. Näiden kokeiden perusteella EPA vähensi

arakidonihapon indusoivaa vaikutusta 78 %, DPA 16 % ja DHA 77 %. (Kuva 5)



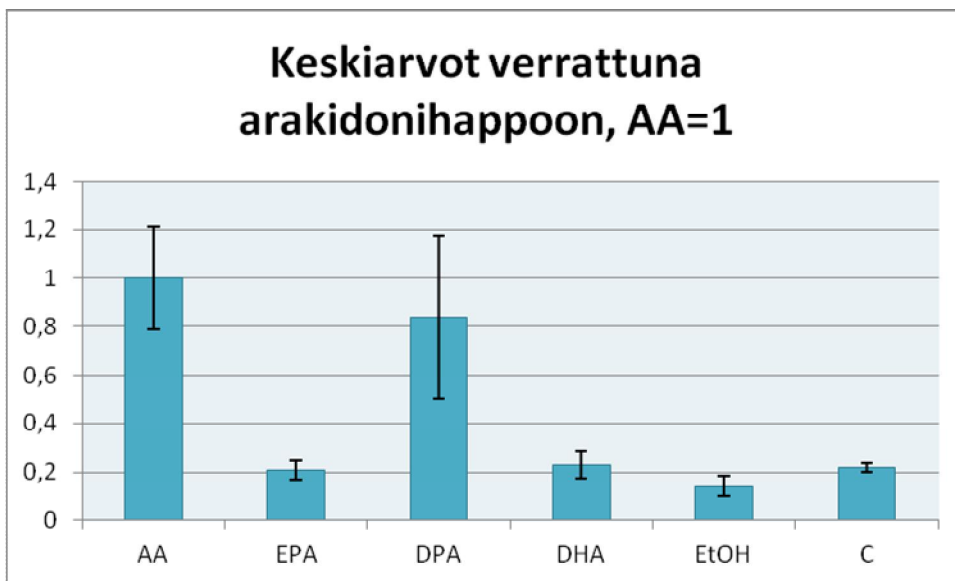
Kuva 3

Eri rasvahappojen vaikutus AA:n indusoimaan MMP-9:n erittymiseen. Koesarjoissa AA lisättiin entisiin kuoppiin. Vertailuarvona toimi kontrollinäyte, C. Koeasetelmalla 2 tehdyt ensimmäiset koesarjat, joissa kasvuolosuhteet eivät olleet optimaaliset (haihtuminen ja sen seurauksena mediumin eri ainesosien konsentraatiomuutokset). MonoMac 6 -soluja viljeltiin 48 h eri rasvahapoissa, minkä jälkeen jokaisesta kuopasta otettiin 100 µl mediumia talteen. Tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin arakidonihappoa 100 µl ja soluja inkuboitiin tässä 10µM AA:ssa 24 h, mediumit kerättiin ja niistä määritettiin MMP-9:n aktiivisuus gelatiinizymografilla. Kokeet tehtiin rinnakkaismäärityksinä ja toistettiin 3 kertaa. Mediumin haihtumisen aiheuttama muutos tilavuudessa huomioitiin näytevolyymissä.



Kuva 4

Valokuva koeasetelman 2 geelistä, kokeissa soluja ei suspensoitu uusiin kuoppiin kesken solukokeen ja solujen kasvuolosuhteissa oli haihtumisesta aiheutuneita eroja saman viljelymaljan eri kuoppien välillä. MMP–9:n aktiivisuutta kuvastaa kunkin sarakkeen ylin raita.



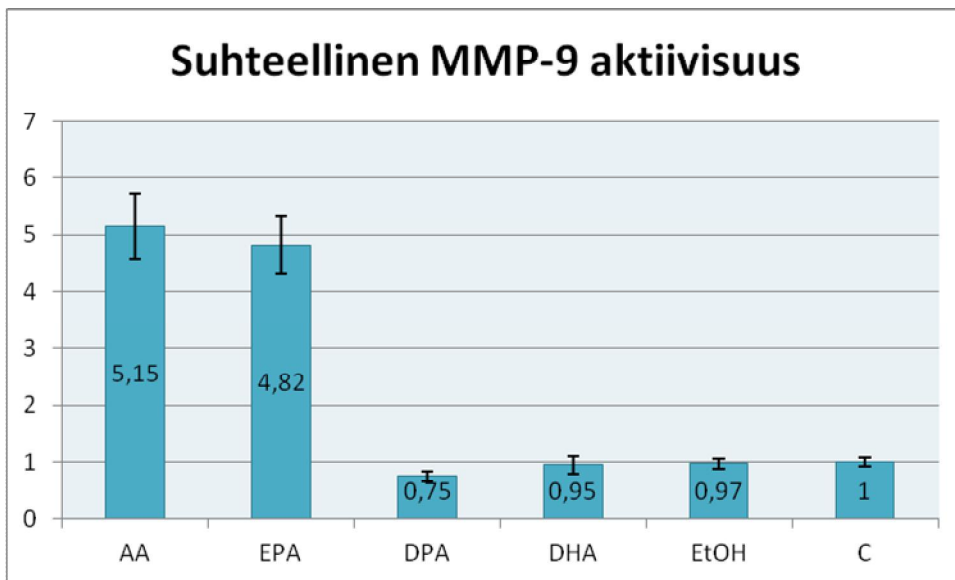
Kuva 5

Eri rasvahappojen vaikutus AA:n indusoimaan MMP–9:n erittymiseen. Koesarjoissa AA lisättiin entisiin kuoppiin. Vertailuarvona toimi arakidonihappo, AA. Koeasetelmalla 2 tehdyt ensimmäiset koesarjat, joissa kasvuolosuhteet eivät olleet optimaaliset (haihtuminen ja sen seurauksena mediumin eri ainesosien konsentraatiomuutokset). MonoMac 6 -soluja viljeltiin 48 h eri rasvahapoissa, minkä jälkeen jokaisesta kuopasta otettiin 100 µl mediumia talteen. Tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin arakidonihappoa 100 µl ja soluja inkuboitiin tässä 10µM AA:ssa 24 h, mediumit kerättiin ja niistä määritettiin MMP–9:n aktiivisuus gelatiinizymografilla. Kokeet tehtiin rinnakkaismäärityksinä ja toistettiin 3 kertaa. Mediumin haihtumisen aiheuttama muutos

tilavuudessa huomioitiin näytevolyymissä.

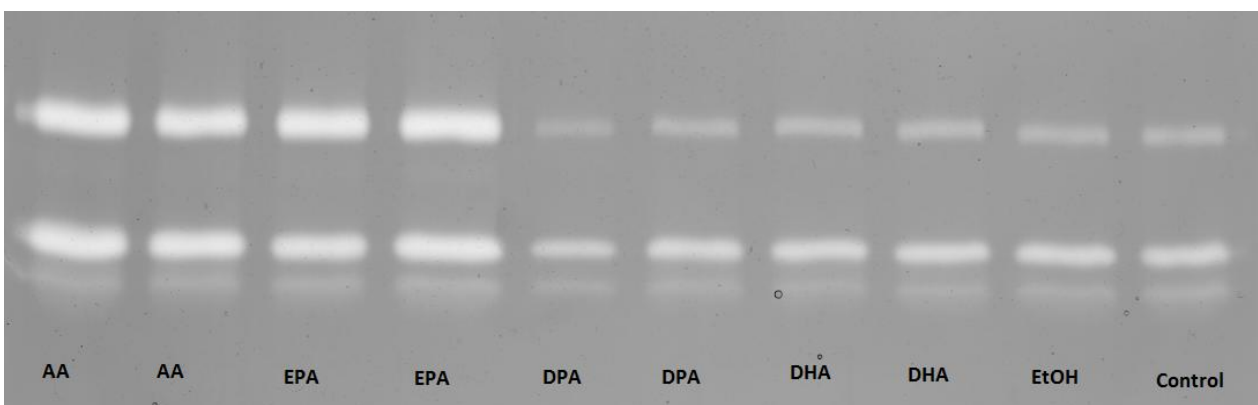
4.4 Koeasetelma 2, jälkimmäiset sarjat

Myös koeasetelman 2 jälkimmäisissä sarjoissa havaittiin arakidonihapolla olevan huomattava MMP-9:n erittymistä lisäävä vaikutus: se oli yli 5-kertainen kontrollinäytteeseen C verrattuna. Toisin kuin edellä, näissä jälkimmäisissä sarjoissa myös EPA:ssa inkuboidut solut erittivät huomattavasti MMP-9:ä, lähes viisinkertaisesti kontrollinäytteeseen verrattuna. Sen sijaan DPA:ssa ja DHA:ssa inkuboidut solut estivät arakidonihapon MMP-9:än kohdistuvaa indusoivaa vaikutusta ja vähensivät myös MMP-9:n erittymistä kontrollisoluihin verrattuna. DHA:n vaikutuksesta MMP-9 erityksen palautui suurin piirtein kontrollisolukon erityksen tasolle (95 % kontrollinäytteen tasosta). DPA:ssa inkuboitujen solujen MMP-9:n erityksen taso oli 25 % pienempi kuin normaalissa mediumissa kasvaneiden solujen. Myös tässä ryhmässä koesarjojen keskinäinen vaihtelu oli pientä, minkä keskiarvon keskivirhe (Std Err) myös osoittaa (Kuva 6). Kuvassa 7 on valokuva yhdestä tällä koesarjalla tuotetuista geeleistä. Verrattuna arakidonihappoon havaittiin, että DPA ja DHA vähensivät merkittävästi arakidonihapon indusoivaa vaikutusta MMP-9:n erittymisessä: kokeen alussa DPA:ssa kasvaneet solut tuottivat MMP-9:ä vain 15 % ja DHA:ssa kasvaneet solut 18 % ainoastaan AA:ssa kasvaneiden solujen MMP-9-tuottoon verrattuna. EPA:ssa kasvaneet solut tuottivat MMP-9:ä 94 % AA:n vastaavasta arvosta eli MMP-9:n erityksen väheni vain 6 %. (Kuva 8)



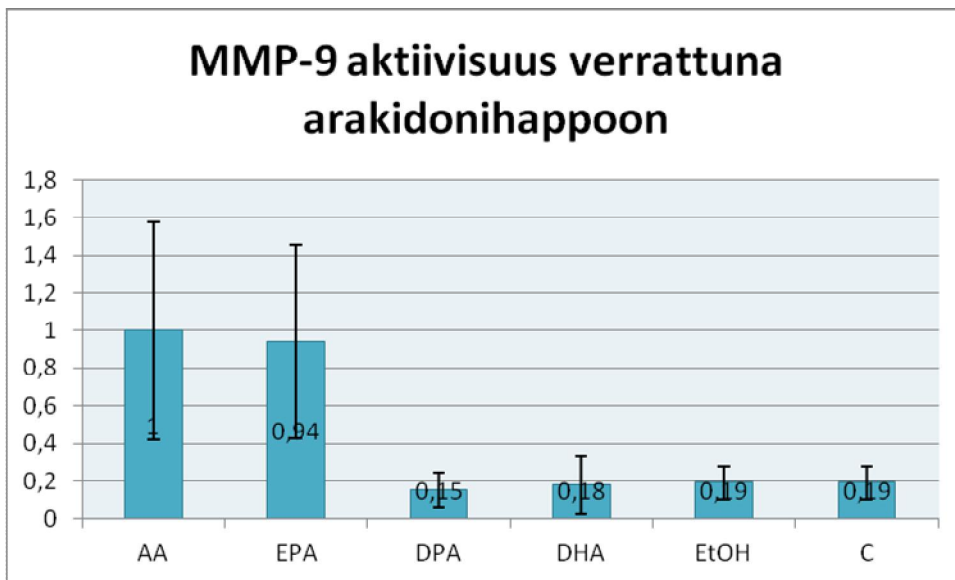
Kuva 6

Eri rasvahappojen vaikutus MMP–9:n erittymiseen, kun soluja ei kerätty kuopista kesken solukokeen ja solujen kasvuolosuhteet olivat optimaaliset. Vertailuarvona toimi kontrollinäyte, C. Koeasetelmalla 2 tehdyt jälkimmäiset koesarjat, joissa kasvuolosuhteet olivat optimaaliset (ei haihtumista). MonoMac 6 -soluja viljeltiin 48 h eri rasvahapoissa, minkä jälkeen jokaisesta kuopasta otettiin 100 µl mediumia talteen. Tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin arakidonihappoa 100 µl ja soluja inkuboitiin tässä 10µM AA:ssa 24 h, mediumit kerättiin ja niistä määritettiin MMP–9:n aktiivisuus gelatiinizymografilla. Kokeet tehtiin rinnakkaismäärityksinä ja toistettiin 4 kertaa.



Kuva 7

Valokuva koeasetelman 2 geelistä, kokeissa soluja ei suspensoitu uusiin kuoppiin kesken solukokeen ja solujen kasvuolosuhteet olivat optimaaliset. MMP–9:n aktiivisuutta kuvastaa kunkin sarakkeen ylin raita.



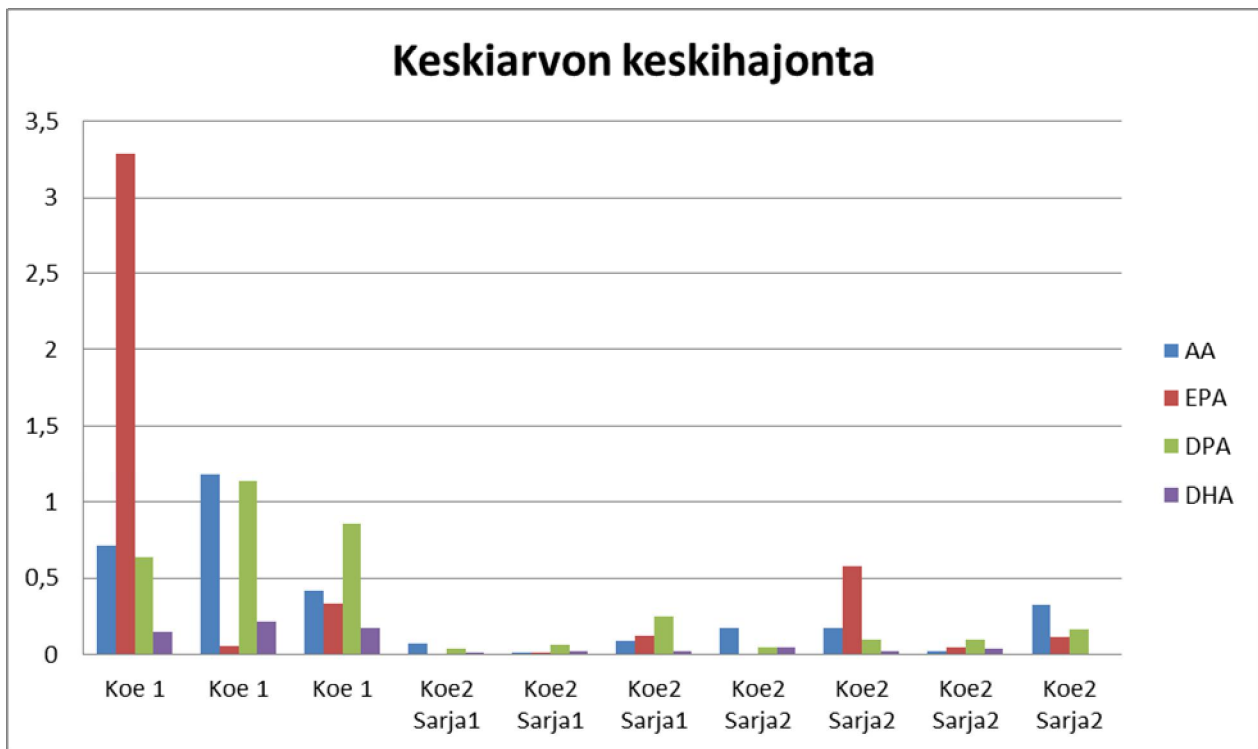
Kuva 8

Eri rasvahappojen vaikutus MMP-9:n erittymiseen, kun soluja ei kerätty kuopista kesken solukokeen ja solujen kasvuolosuhteet olivat optimaaliset. Vertailuarvona kokeessa toimi arakidonihappo, AA.

4.5 Keskiarvon keskihajonnan vertailu

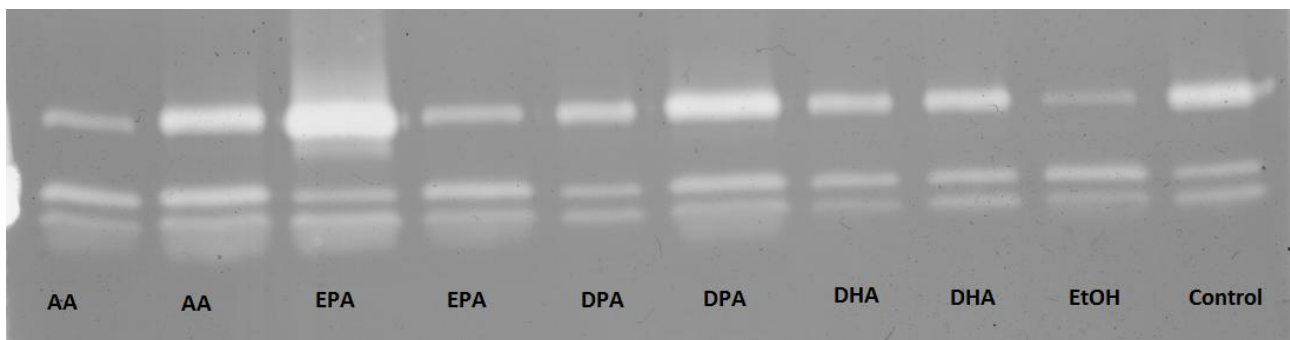
Jokaisessa koesarjassa oli kaksi vierekkäistä kuoppaa, joiden rasvahappokoostumukset koko kokeen ajan olivat keskenään samanlaiset (rinnakkaismääritykset). Näistä kahdesta solukuopasta saatiin kaksi eroavaa numeerista arvoa, ja niiden keskiarvoa käytettiin kokeen kyseisen rasvahapon arvona. Myös näille keskiarvoille laskettiin keskiarvon keskivirhe (Standar Error = Std Err), josta voi päätellä koesarjan luotettavuutta. Mitä suurempi keskiarvon keskivirhe on, sitä kriittisemmin tulokseen pitää suhtautua.

Koeasetelmassa 1 keskiarvon keskihajonta oli selvästi suurempaa kuin koeasetelmassa 2. Alla oleva pylväsdiagrammi havainnollistaa tätä seikkaa (Kuva 9). Lisäksi kuvassa 10 on valokuva geelistä, jossa järjestyksessä ensimmäisen Koe 1 rinnakkaismääritysten keskinäinen vaihtelu käy hyvin ilmi.



Kuva 9

Solututkimuksissa käytettyjen keskiarvojen keskihajonta. Mitä suurempi keskiarvo on sitä kriittisemmin tulokseen tulee suhtautua. Suurin variaatio on nähtävissä kolmessa ensimmäisessä kokeessa.



Kuva 10

Valokuva koeasetelman 1 geelistä, jossa solut kerättiin ja suspensoitiin uusiin kuoppiin kesken solukokeen. MMP–9:n aktiivisuutta kuvastavat ylimmät raidat. Kuvan geelin tulokset ovat numeerisina arvoina kuvassa 9 (järjestyksessä ensimmäinen Koe 1). Kuvasta voidaan nähdä yksittäisen kokeen rinnakkaismääritysten keskinäisen vaihtelu, joka etenkin AA:n, EPA:n ja DPA:n kohdalla on huomattavaa.

5.0 POHDINTA

Tekemäni tutkimus osoitti, että arakidonihapon indusoimaan MMP–9:n tuottoon MonoMac 6 -soluissa voidaan vaikuttaa. Kaskadi on herkkä paitsi eri rasvahappojen vaikutukselle, myös muille ympäristötekijöille. Tutkimukseni osoittivat, että kun MonoMac 6 -soluja viljellään optimaalisessa kasvuympäristössä, dokosapentaeenihappo (DPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA) vähentävät merkittävästi arakidonihapon indusoivaa vaikutusta MMP–9 tuotantoon.

Koeasetelman 1 tuloksiin, jotka ovat ristiriidassa aikaisempien tulosten kanssa [51], on suhtauduttava erittäin kriittisesti. Vaikka siihen kuuluneet kolme tutkimusta osoittivatkin, että arakidonihappo ei indusoisi lainkaan MMP–9:n erittymistä vaan olisi päinvastoin rajoittamassa eritystä, muut myöhemmät koesarjani osoittivat tämän tuloksen vääräksi. Tosin yksittäinen solukoe, jossa ensimmäisten rasvahappojen inkubaatioaika oli vain 24 h, antoi vastaavanlaisia tuloksia, kuin normaalit koeasetelmalla 1 tehdyt solukokeet. Tästä solukokeesta käy ilmi inkubaatioajan vaikutus lopputulokseen: mitä pidempi inkubaatioaika, sitä enemmän MMP–9:ä erittyy. Kuitenkin edellä mainituissa solukokeissa on lisäksi kiinnitettävä huomio saman koesarjan vierekkäisten rasvahappoarvojen suureen keskinäiseen vaihteluun. Arvojen ei tulisi juurikaan erota toisistaan, sillä kokeen alussa solut laskettiin ja annosteltiin tarkasti kuoppiin. Tämän jälkeen kuoppiin lisätyt rasvahapot olivat olleet täysin vastaavia ja myös muut olosuhteet (pipetit, pipetin kärjet, kasvatusmalja, inkubaattori, työn suorittaja) olivat olleet yhtäläiset. Kuitenkin koeasetelmalla 1 vierekkäiset arvot vaihtelivat suurestikin keskenään. Viitteitä tähän suuntaan havaittiin jo tutkimukseni ollessa vielä kesken. Kun muita selittäviä tekijöitä ei pohdinnasta huolimatta löydetty, pääteltiin syynä mahdollisesti olevan solujen keräämisen alkuperäisistä kuopista ja siirron uusiin kuoppiin. Tämän vuoksi koejärjestelyä päätettiin muuttaa ja otettiin käyttöön koeasetelma 2, jossa tämä kriittinen vaihe jäisi kokonaan pois.

Uudenlaiset solukokeet alkoivatkin lupaavasti. Kokeita ehdittiin tehdä kuitenkin vasta kolme kappaletta, ennen kuin huomattiin, että solujen kasvatuskaapissa ei ollut normaalia tarvittavaa kosteutta, vaan ilma oli hyvin kuivaa. Epäilyn tästä herätti solukokeen lopulla kerättävän mediumin suuri tilavuusvaihtelu kuopan sijainnista riippuen: reunimmaisissa kuopissa oli selvästi vähemmän mediumia kuin keskimmäisissä. Koska tilavuusheitot olivat

merkittäviä (jopa 50 %), proteiiniaktiivisuusmäärytyksissä tämä otettiin huomioon suhteuttamalla zymografiin pipetoitavan näytteen määrä solukokeessa saatuun mediumtilavuuteen.

Koeasetelmalla 2 tehdyt ensimmäiset solukokeet antoivat osittain yhteneviä tuloksia aiempaan tutkimukseen [51] verrattuna. Arakidonihappo oli merkittävin indusoiva rasvahappo, mutta myös DPA:ssa kasvatetut solut tuottivat huomattavasti MMP-9:ä. Sen sijaan DHA:ssa kasvaneet solut tuottivat vain aavistuksen enemmän (5 %) MMP-9:ä kuin kontrolli, ja EPA näytti jopa aavistuksen vähentävän (6 %) proteaasin tuottoa kontrollinäytteeseen verrattuna. Arakidonihapon indusoivaa vaikutusta EPA ja DHA vähensivät merkittävästi (EPA 78 %, DHA 77 %), DPA selvästi vähemmän (16 %). Tässä tutkimuksissa keskiarvojen keskihajonta oli erittäin pientä, eli se puoltaa tutkimuksen luotettavuutta. Näiden kolmen solukokeen perusteella näyttää siltä, että poikkeuksellisessa kasvuympäristössä EPA ja DHA vähentävät arakidonihapon indusoivaa vaikutusta MMP-9:n erittymiseen merkittävästi, DPA vain hieman. Lisäksi DPA:lla on mahdollisesti myös itsenäinen indusoiva vaikutus MMP-9:n erittymiseen.

Koeasetelmalla 2 tehdyt jälkimmäiset neljä koetta ovat olosuhteidensa ja koemetodinsa puolesta kaikkein vakuuttavimmat tehdyistä kokeista. Myös niissä AA indusoi huomattavasti MMP-9:n erittymistä, yli 5-kertaisesti verrattuna kontrollinäytteeseen. Toisin kuin aiemmissa kolmessa solukokeessa, näissä EPA indusoi metalloproteinaasin eritystä lähes samanveroisesti kuin AA. DHA (0,95-kertainen) ja EtOH (0,97-kertainen) vaikuttivat proteaasin erittymiseen kontrollisolujen tapaan. Sen sijaan DPA:lla näytti olevan MMP-9:n eritystä vähentävä vaikutus: kontrollisoluihin verrattuna se tuotti vain 0,75-kertaisesti MMP-9:ä eli 25 % vähemmän kuin kontrollisolut (C). Arakidonihapon indusoivaa vaikutusta DPA ja DHA vähensivät selvästi (MMP-9:n tuotto DPA:lla 15 % ja DHA:lla 18 % verrattuna arakidonihappoon). EPA:lla tällaista vaikutusta ei juurikaan havaittu. Myös näissä neljässä tutkimuksessa verrokki-solukuoppien antamat arvot olivat lähellä toisiaan.

Koeasetelmalla 2 tehdyissä kaikissa kokeissa keskiarvojen keskivirheet olivat pieniä eli molemmat tutkimussarjat olivat suurin piirtein yhtä luotettavia. Tästä voidaan päätellä, että verrokkikuoppien arvoissa koeasetelmassa 1 esiintyneeseen hajontaan todennäköisesti oli syynä solujen kerääminen, fuugaaminen ja uusiin solukuoppiin suspensoiminen kesken solukokeen. Koska tutkimustulokset sen sijaan eroavat huomattavasti toisistaan, on pääteltävä, että solumaljoilta tapahtuneella haihtumisella on vaikutusta eri rasvahappojen

kykyyn indusoida tai estää MMP–9:n muodostumista. Arakidonihappoon ja dokosaheksaeenihappoon ei ilmankosteudella näyttäisi olevan suurtakaan vaikutusta. Sen sijaan eikosapentaeenihappoon ja dokosapentaeenihappoon vaikutukset ovat dramaattiset: koekuopissa olleen mediumin määrästä riippuen kummallakin niistä on potentiaalia sekä indusoida että jossain määrin myös vähentää MMP–9:n erittymistä. Tosin solut normaalisti tarvitsevat kostean kasvuympäristön eli jälkimmäisimmät solukokeet antanevat kaikkein luotettavimpia tuloksia.

Tutkimusteni perusteella vaikuttaa siis siltä, että ilman haihtumista ja sen aiheuttamia konsentraatiomuutoksia mediumissa dokosapentaeenihappo (DPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA) kykenevät vähentämään arakidonihapon (AA) MMP–9:än kohdistuvaa indusoivaa vaikutusta, jos MonoMac 6 -soluja on inkuboitu 10 µM DPA:ssa tai DHA:ssa 48 tunnin ajan, ja tämän jälkeen altistuminen arakidonihapolle on maksimissaan 24 tuntia. Lisäksi edellä mainituissa olosuhteissa eikosapentaeenihapolla (EPA) näyttää olevan lähes arakidonihapon veroinen MMP–9-indusoija. Tosin tekemieni koesarjojen lukumäärä on niin pieni, että edellä esitetyt tulokset ovat vasta alustavia ja viitteitä antavia.

6.0 LOPPUSANAT

Niin nykyään kuin tulevaisuudessakin ravitsemussuositukset tulevat olemaan laajan kiinnostuksen ja keskustelun kohteena. Tietynlaisella ravinnolla väitetään olevan milloin terveyttä edistäviä ja syövältä ehkäiseviä vaikutuksia, milloin kohutaan syöpää aiheuttavista yhdisteistä tai enneaikaista kuolleisuutta lisäävistä ruokavalioista. Tutkimieni pitkäketjuisten rasvahappojen prekursorit, linolihappo ja α -linoleenihappo, ovat elimistölle välttämättömiä, ja niistä onkin jo olemassa kansallisia ja kansainvälisiä suosituksia. Jo nyt on myös tiedossa omega-6-johdannaisen arakidonihapon mahdollisia haittavaikutuksia muun muassa tulehdusvasteen kautta. Monissa ravitsemussuosituksissa tämä on otettu huomioon antamalla omega-6 ja omega-3 rasvahappojen saantiin ja etenkin niiden suhteellisiin osuuksiin liittyviä suosituksia. Vaikka tutkimusteni mukaan alustavasti näyttää siltä, että omega-3-johdannaiset dokosapentaeenihappo (DPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA) vähentäisivät arakidonihapon vaikutusta, on solutason tutkimuksista pitkä matka ravitsemussuositukseen. Tulevaisuudessa jää nähtäväksi, onko DPA:lla ja DHA:lla todella kuvaamaani vaikutusta suhteessa arakidonihappoon, ja jos on, millainen on sen vaikutus tulehdusvasteisiin ja muihin arakidonihapon vaikuttamiin prosesseihin.

LÄHTEET

- [1] A.P. Simopoulos, The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Experimental Biology and Medicine*, 233 (2008) 674–688.
- [2] I.N.T. de Gomez Dumm, R.R. Brenner, Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic and stearic acids by human liver microsomes, *Lipids* 10 (1975) 315–317.
- [3] A.P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Am J Clin Nutr* 54 (1991) 438–463.
- [4] G.L. Russo, Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention, *Biochemical Pharmacology* 77 (2009) 937–946.
- [5] F. Thies, G. Nebe-von-Caron, J.R. Powell, P. Yaqoob, E.A. Newsholme, P.C. Calder, Dietary supplementation with γ -linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans, *J Nutr* 131 (2001) 1918–1927.
- [6] L.D. Peterson, N.M. Jeffery, F. Thies, P. Sanderson, E.A. Newsholme, P.C. Calder, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E₂ production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity, *Lipids* 33 (1998) 171–180.
- [7] D.S. Kelley, P.C. Taylor, G.J. Nelson, B.E. Mackey, Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men, *Lipids* 33 (1998) 125–130.
- [8] F. Thies, G. Nebe-von-Caron et al, Influence of dietary supplementation with long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults, *Lipids* 36 (2001) 1183–1193.
- [9] P. Yaqoob, H.S. Pala, M. Cortina-Borja, E.A. Newsholme, P.C. Calder, Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions, *Eur J Clin Invest* 30 (2000) 260–274.
- [10] T.H. Lee, R.L. Hoover, J.D. Williams et al, Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function, *N Eng J Med* 312 (1985) 1217–1224.
- [11] D.A. Healy, F.A. Wallace, E.A. Miles, P.C. Calder, P. Newsholme, The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function, *Lipids* 35 (2000), 763–768.
- [12] P.C. Calder, Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases, *Mol Nutr Food Res* 52 (2008) 885–897.
- [13] D.W. Goldman, W.C. Pickett, E.J. Goetzl, Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid,

Biochem Biophys Res Commun 117 (1983) 282–288.

[14] T.H. Lee, J.M. Mencia-Huerta, C. Shih, E.J. Corey, R.A. Lewis, K.F. Austen, Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene-B₅ and the double lipoxygenase product, *J Biol Chem* 259 (1984) 2383–389.

[15] D. Bagga, L. Wang, R. Farias-Eisner, J.A. Glaspy, S.T. Reddy, Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 1751–1756.

[16] R.I. Sperling, A.I. Benincaso, C.T. Knoell, J.K. Larkin, K.F. Austen, D.R. Robinson, Dietary ω – 3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils, *J Clin Invest* 91 (1993) 651–660.

[17] E.B. Schmidt, J.O. Pedersen, S. Ekelund, N. Grunnet, C. Jersild, J. Dyerberg, Cod liver oil inhibits neutrophil and monocyte chemotaxis in healthy males, *Atherosclerosis* 77 (1989) 53–57.

[18] E.B. Schmidt, K. Varming, J.O. Pedersen, et al, Long term supplementation with n – 3 fatty acids. Effect of neutrophil and monocyte chemotaxis, *Scand J Clin Lab Invest* 52 (1992) 229–236.

[19] R. Luostarinen, A. Siegbahn, T. Saldeen, Effect of dietary fish oil supplemented with different doses of vitamin E on neutrophils chemotaxis in healthy volunteers, *Nutr Res* 12 (1992) 1419–1430.

[20] R. De Caterina, M.I. Cybulsky, S.K. Clinton, M.A. Gimbrone, P. Libby, The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells, *Atheroscler Thromb* 14 (1994) 1829–1836.

[21] R. De Caterina, P. Libby, Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids, *Lipids* 31 (1996) S57–63.

[22] E.S. Collie-Duguid, K.W. Wahle, Inhibitory effects of fish oil n – 3 polyunsaturated fatty acids on expression of endothelial cell adhesion molecules, *Biochem Biophys Res Commun* 220 (1996) 969–974.

[23] M. Massaro, E. Scoditti, M.A. Carluccio, R. De Caterina, Basic mechanisms behind the effects of n – 3 fatty acids on cardiovascular disease, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 79 (2008) 109–115.

[24] R. De Caterina, R. Madonna, A. Bertolotto, E.B. Schmidt, M – 3 fatty acids in the treatment of diabetic patients: biological and clinical data, *Diabetes Care* 30 (2007) 1012–1026.

[25] S.B. Eaton, M. Konner, Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications, *New Eng J Med* 312 (1985) 283–289.

[26] A.P. Simopoulos, Genetic variation and evolutionary aspects of diet, *CRC Press* (1999) 65–88.

- [27] A.P. Simopoulos, Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 60 (1999) S297–S301.
- [28] M.A. Crawford, Fatty acid ratios in free-living and domestic animals, Lancet i (1968) 1329–1333.
- [29] R.A. Riemersma, D.A. Wood, S. Butler, R.A. Elton, M. Oliver, et al., Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease, Br Med J 292 (1986) 1423–1427.
- [30] H.C. Simpson, K. Barker, R.D. Carter, E. Cassels, J.I. Mann, Low dietary intake of linoleic acid predisposes to myocardial infarction, Br Med J 285 (1982) 683–684.
- [31] J. Valek, J. Hammer, M. Kohout, D. Grafnetter, K. Vondra, V. Topinka, Serum linoleic acid and cardiovascular death in postinfarction middle-aged men, Atherosclerosis 54 (1985) 111–118.
- [32] S. Parthasarathy, J.C. Khoo, E. Miller, J. Barnett, J.L. Witztum, D. Steinberg, Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis, Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 3894–3898.
- [33] P. Reaven, S. Parthasarathy, B.J. Grasse, E. Miller, F. Almazan, F.H. Mattson, J.C. Khoo, D. Steinberg, J.L. Witztum, Feasibility of using an oleic acid diet to reduce the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in humans, Arterioscler Thromb 14 (1994) 557–566.
- [34] A.M. Louheranta, E.K. Porkkala-Sarataho, M.K. Nyssönen, R.M. Salonen, J.T. Salonen, Linoleic acid intake and susceptibility of very-low-density and low-density lipoproteins to oxidation in men, Am J Clin Nutr 63 (1996) 698–703.
- [35] S. Ylä-Herttuala, W. Palinski, M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, T.E. Carew, S. Butler, J.L. Witztum, D. Steinberg, Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man, J Clin Invest 84 (1989) 1086 – 1095.
- [36] H.C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler, G. Meier, n-3 Polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, Am J Med 112 (2002) 298–304.
- [37] S.P. Whelton, J. He, P.K. Whelton *et al.*, Meta-analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease, Am J Cardiol 93 (2004) 1119–1123.
- [38] J. Breslow, n-3 fatty acids and cardiovascular disease, Am J Clin Nutr 83 (2006) 1477S–1482S.
- [39] F.B. Hu, W.C. Willett, Optimal diets for prevention of coronary heart disease, JAMA 288 (2002) 2569–2578.
- [40] C. Wang, W.S. Harris, M. Chung *et al.*, n-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review, Am J Clin Nutr 84 (2006) 5–17.

- [41] B.A. Griffin, How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular risk? Evidence from the OPTILIP study, *Curr Opin Lipidol* 19 (2008) 57–62.
- [42] H. Nagase, J.F. Woessner Jr, Matrix metalloproteinases, *J Biol Chem* 274 (1999) 21491–21494.
- [43] M.D. Sternlicht, Z. Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol* 17 (2001) 463–516.
- [44] W.C. Parks, R.P. Mecham, Matrix Metalloproteinases, San Diego, Calif, Academic Press 1998 1–13.
- [45] D.E. Gomez, D.F. Alonso, H. Yoshiji, U.P. Thorgeirsson, Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur J Cell Biol* 75 (1997) 111–122.
- [46] K. Brew, D. Dinakarandian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim Biophys Acta* 1477 (2000) 267–283.
- [47] M. Consolo, A. Amoroso, D.A. Spandidos, M.C. Mazzarino, Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review), *Int J Mol Med* 24 (2009) 143–152.
- [48] J.A. Allan, A.J. Docherty, P.J. Barker, N.S. Huskisson, J.J. Reynolds, G. Murphy, Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components, *Biochem J* 309 (1995) 299–306.
- [49] R.T. Aimes, J.P. Quigley, Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ - and $\frac{1}{4}$ -length fragments, *J Biol Chem* 270 (1995) 5872–5876.
- [50] J.W. Becker, A.I. Marcy, L.L. Rokosz, M.G. Axel, J.J. Burbaum, P.M. Fitzgerald, P.M. Cameron, C.K. Esser, W.K. Hagmann, J.D. Hermes, Stromelysin-1, three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme, *Protein Sci* 4 (1995) 1966–1976.
- [51] W. Bode, F.X. Gomis-Rüth, W. Stöckler, Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, “metzincins”, *FEBS Lett* 331 (1993) 134–140.
- [52] H. Nagase, J.F. Woessner Jr, Minireview: Matrix Metalloproteinases, *J Biol Chem* 31 (1999) 21491–21494.
- [53] E. Morgunova, A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, K. Tryggvason, Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed, *Science*, 284 (1999) 1667–1670.
- [54] H. Cha, E. Kopetzki, R. Huber, M. Lanzendorfer, H. Brandstetter, Structural basis of the adaptive molecular recognition by MMP9, *J Mol Biol* 320 (2002) 1065–1079.

- [55] M. Stanvicca, A. Noel, I. Stoll et al, Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases, *Biochem J* 315 (1996) 953–958.
- [56] H. Nagase, J.J. Enghild, K. Suzuki, G. Salvesen, Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4aminopheny)mercuric acetate, *Biochemistry* 29 (1990) 5783–5789.
- [57] H.R. Lijnen, Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling, *Thromb Haemost* 86 (2001) 324–333.
- [58] V. Knauper, B. Smith, C. Lopes-Otin, G. Murphy, Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13), *Eur J Biochem* 248 (1997) 369–373.
- [59] S.M. Ellerbroek, Y.I. Wu, C.M. Overall, M.S. Stack, Functional interplay between type 1 collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity, *J Biol Chem* 276 (2001) 24833–24842.
- [60] K. Suzuki, J.J. Enghild, T. Morodomi, G. Salvesen, H. Nagase, Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin), *Biochemistry* 29 (1990) 10261–10270.
- [61] Z.S. Galis, J.J. Khatri, Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly, *Circ Res* 90 (2002) 251–262.
- [62] S. Ye, Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases, *Matrix Biol* 19 (2000) 623–629.
- [63] W.C. Parks, C.L. Wilson, Y.S. López-Boado, Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 617–629.
- [64] P. Xu, S.R. Meisel, J.M. Ong et al, Oxidized low density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages, *Circulation* 99 (1999) 993–998.
- [65] D.A. Siwik, D.L.F. Chang, W.S. Colucci, Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast in vitro, *Circ Res* 86 (2000) 1259–1265.
- [66] S. Uemura, H. Matsushita, L. Wei et al, Diabetes mellitus enhanced vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress, *Circ Res* 88 (2001) 1291–1298.
- [67] S. Bellosta, D. Via, M. Canavesi et al, HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 1671–1678.
- [68] A.P. Schroeder, E. Falk, Pathophysiology and inflammatory aspects of plaque rupture, *Cardiol Clin* 14 (1996) 211 – 220.
- [69] P.K. Shah, E. Falk, J.J. Badimon, A. Fernande Ortiz, A. Mailhac, G. Villareal-Levy, J.T. Fallon, J. Regnström, V. Fuster, Human monocyte-derived macrophages induce collagen

breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques, *Circulation* 95 (1995) 1565 – 1569.

[70] Z.S. Galis, G.K. Sukhova, M.W. Lark, P. Libby, Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques, *Clin Invest* 94 (1994) 2493 – 2503.

[71] D.L. Brown, M.S. Hibbs, M. Kearney, C. Loushin, J.M. Isner, Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina, *Circulation* 91 (1995) 2125 – 2131.

[72] P.K. Shah, Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis, *Vasc Med* 3 (1998) 199 – 206.

[73] M.J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Circulation* 97 (1998) 2382 – 2383.

[74] S.T. Nikkari, M. Höytyä, J. Isola, T. Nikkari, Macrophages contain 92-kD gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis, *Am J Pathol* 149 (1996) 1427 – 1233.

[75] D. Sorbi, D.L. French, G.J. Nuovo, R.R. Kew, L.A. Gruber, Elevated levels of 92-kD type IV collagenase (matrix metalloproteinase 9) in giant cell arteritis, *Arthritis Rheum* 39 (1996) 1747 – 1753.

[76] A. Kalela, T.A. Koivu, T. Sisto, J. Kanervisto, M. Höytyä, P. Sillanaukee, T. Lehtimäki, S.T. Nikkari, Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease, *Scand J Clin Lab Invest* 62 (2002) 337 – 342.

[77] T. Solakivi, Tarja Kunnas, Satu Kärkkäinen, Olli Jaakkola, Seppo T. Nikkari, Arachidonic acid increases matrix metalloproteinase 9 secretion and exposure in human monocytic MonoMac 6 cells, *Lipids in Health and Disease* 8:11 (2009).

[78] R.D. Kenagy, S.T. Nikkari, H.G. Welgus, A.W. Clowes, Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92-kD gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells, *J Clin Invest* 93(5) (1994) 1987–1993.

[79] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259) (1970) 680–685.