Kaura ja keliakia
– kauraperäisten molekyylien hyödyt ja haitat *in vitro*

Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Toukokuu 2009
Laura Airaksinen

KIITOKSET

Tämä *Pro gradu* -tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT). Tutkimuksen kokeellinen osa tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteen laitoksen Lastentautien tutkimuskeskuksen keliakiatutkimusryhmässä. Haluan kiittää Jarkko Venäläistä (Kuopion yliopisto) gliadiinin sekä Tuula Sontag-Strohmia (Helsingin yliopisto) avenantramidin lahjoittamisesta tutkimukseen.

Kiitän työn ohjaajaa Katri Lindforsia kallisarvoisista neuvoista, tuesta, hyvästä ohjauksesta läpi koko työn sekä tutkielman tarkastamisesta. Lisäksi haluan kiittää keliakiatutkimusryhmän johtajaa Markku Mäkeä kannustuksesta sekä puitteiltaan ja ilmapiiriltään innostavan tutkimusympäristön luomisesta. Suuri kiitos kuuluu myös kaikille keliakiaryhmäläisille avusta ja ystävällisyydestä. Haluan lisäksi erityisesti kiittää Tiina Rauhavirtaa, Essi Myrskyä, Satumarja Stenmania ja Jorma Kulmalaa korvaamattomista käytännön neuvoista sekä Rami Kivistöä vertaistuesta. Kiitän myös Vesa Hytöstä tutkielman tarkastamisesta.

Lopuksi haluan kiittää sydämeni pohjasta perhettäni, ystäviäni sekä aviomiestäni Juhaa tuesta koko opiskelujeni ajan.

Tampereella toukokuussa 2009

Laura Airaksinen

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Tekijä: AIRAKSINEN, LAURA MARIA
Otsikko: Kaura ja keliakia – kauraperäisten molekyylien hyödyt ja haitat *in vitro*
Sivumäärä: 62 s.
Ohjaaja: FT Katri Lindfors
Tarkastajat: FT Katri Lindfors ja professori Vesa Hytönen
Aika: Toukokuu 2009

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet
Keliakia on perinnöllinen autoimmuunisairaus, jossa vehnän, ohran ja rukiin gluteeni aiheuttaa tulehdusreaktion ohutsuolessa. Gluteeni sisältää gliadiinia, jonka on todettu olevan haitallinen ohutsuolen epiteelisoluille. Kaura kuitenkin sopii keliaakikoille ja se sisältää avenantramideja, joilla on todettu olevan antioksidanttisia, antiproliferatiivisia sekä anti-inflammatorisia ominaisuuksia. Tutkimuksen tavoitteina oli pystyttää uusia menetelmiä gliadiinin haittojen tutkimiseen sekä selvittää, voiko avenantramidi tai siitä synteettisesti johdettu lääkeaine, Tranilast, ennaltaehkäistä tai parantaa gliadiinin aiheuttamia haittavaikutuksia Caco-2-soluissa. Lisäksi tavoitteenani oli tutkia minkälaisia vaikutuksia aveniinilla, gliadiinin vastineella kaurassa, on Caco-2-soluissa.
Tutkimusmenetelmät
Caco-2-solujen apoptoosia tutkittiin FACS-menetelmällä ja proliferaatiota kaupallisen kolorimetrisen kitin avulla. Caco-2-solukerroksen läpäisevyyttä tutkittiin mittaamalla transepiteelista resistanssia (TER) sekä FITC-dekstraanivirtausta solukerroksen läpi. Kalvoröyhelöiden muodostumista analysoitiin falloidiinivärjätyistä solunäytteistä mikroskooppisesti.
Tutkimustulokset
Tutkimuksessa pystytetyt menetelmät, apoptoosi- ja proliferaatiomittaus eivät soveltuneet gliadiinin haittavaikutusten tutkimiseen *in vitro*. Tranilast ei kyennyt ehkäisemään PT-gliadiinin aiheuttamaa lisääntynyttä parasellulaarista läpäisevyyttä, eikä kalvoröyhelöiden muodostumista. PT-aveniinilla oli yhtä voimakas vaikutus solukerroksen läpäisevyyteen kuin PT-gliadiinilla, mutta se ei aiheuttanut yhtä voimakasta kalvoröyhelöiden muodostumista.
Tulosten tarkastelu
Jotkin menetelmistä eivät soveltuneet tutkittavien aineiden testaamiseen. Tutkimuksen tulokset eivät anna viitteitä Tranilastin käyttökelpoisuudesta keliakian vaihtoehtoisena hoitomuotona. Lisäksi aveniini osoittautui olevan melko haitallinen epiteelisoluille. Näin ollen on mahdollista että kaura sopii keliaakikoille muiden ainesosiensa ansiosta.
Johtopäätökset
Tranilast ei pysty estämään gliadiinin aiheuttamia haittavaikutuksia Caco-2-soluissa ja aveniini on yhtä toksinen kuin gliadiini, ainakin *in vitro*.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology (IMT)
Author: AIRAKSINEN, LAURA MARIA
Title: Oats and coeliac disease – study of oats-derived compounds *in vitro*
Pages: 62 pp.
Supervisor: Katri Lindfors PhD
Reviewers: Katri Lindfors PhD, professor Vesa Hytönen
Date: May 2009

ABSTRACT

Background and aims
Coeliac disease is an inheritable autoimmune disorder in which gluten from wheat, barley and rye induce deleterious inflammatory responses in the small intestine. Gluten contains a prolamin protein gliadin which has been shown to have toxic effects on intestinal epithelial cells. Even thought oats also contains gluten, it seems not to be harmful for celiac patients. Oats also contains avenanthramides, which are found to have antioxidant, antiproliferative and anti-inflammatory activities.. The aims of this study were to set up new methods for studying harmful effects of gliadin in Caco-2 cells and investigate whether avenanthramide or Tranilast, a synthetic derivative of avenanthramides, could prevent those effects. The last aim was to study the toxic effects of avenin, corresponding prolamin for gliadin in oats, in Caco-2 cells.
Methods
Apoptosis of Caco-2 cells was studied with FACS method and proliferation was studied by commercial colorimetric kit. The change of the cell layer permeability was analyzed by measuring transepithelial resistance (TER) and the flux of FITC dextran through the cell layer. The extent of membrane ruffling was analysed from Phalloidin-stained cells microscopically.
Results
PT-gliadin did not increase either apoptosis or proliferation in Caco-2 cells when compared to controls. In contrast, PT-gliadin significantly increased Caco-2 paracellular permeability, but Tranilast was unable to prevent the effect. Nor could it provide protection against membrane ruffling when added to the cells treated with PT-gliadin. PT-avenin had as strong effect on paracellular permeability in Caco-2 cells as PT-gliadin, but it did not cause as extensive membrane ruffling as PT-gliadin.
Discussion
Some of the tested methods were not suitable for studying the effects of PT-gliadin in Caco-2 cells *in vitro*. The results of the study do not support the usefulness of Tranilast as a future treatment form for celiac disease. In addition, avenin showed notable cytotoxicity to epithelial cells. Thus it might be that the suitability of oats to celiac patients is due to the other health-promoting agents present in oats.
Conclusions
We conclude that Tranilast is not able to prevent gliadin-induced negative changes in Caco-2 cells and avenin has similar toxic effects as gliadin to epithelial cells at least *in vitro*.

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET JA SYMBOLIT **7**

1 JOHDANTO **8**

2 KIRJALLISUUSKATSAUS **9**

2.1 Keliakia **9**
2.1.1 Yleistä keliakiasta 9
2.1.2 Keliakian historia 12
2.1.3 Keliakian prevalenssi 16
2.1.4 Keliakian patogeneesi 17
2.1.5 Keliakian hoito 21

2.2 Gluteeni **22**

2.3 Kaura **24**
2.3.1 Betaglukaani 25
2.3.2 Avenantramidi 26
2.3.3 Tranilast 27

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET **28**

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT **29**

4.1 Caco-2 -solujen viljely **29**

4.2 PT-gliadiini, PT-BSA ja PT-aveniini **29**

4.3 Apoptoosimittaus **30**

4.4 Proliferaatiomittaus **31**

4.5 Avenantramidi ja Tranilast **31**

4.6 Epiteelisolukerroksen läpäisevyyden määritys **32**
4.6.1 Transepiteelisen resistanssin määritys 32
4.6.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus 32

4.7 Kalvoröyhelöiden määritys **33**

4.8 Tilastollinen analyysi **33**

5 TULOKSET **34**

5.1 Apoptoosimittaus **34**

5.2 Proliferaatiomittaus **36**

5.3 Epiteelisolukerroksen läpäisevyyden määritys **37**
5.3.1 Transepiteelisen resistanssin määritys 37
5.3.1.1 PT-gliadiini ja Tranilast 37
5.3.1.2 PT-gliadiini ja avenantramidi 39
5.3.1.3 PT-aveniini 40
5.3.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus 41
5.3.2.1 PT-gliadiini ja Tranilast 41
5.3.2.2 PT-aveniini 43

5.4 Kalvoröyhelöiden määritys **44**
5.4.1 PT-gliadiini ja Tranilast 45
5.4.2 PT-aveniini 49

6 POHDINTA **50**

6.1 Menetelmien pystytys **50**
6.1.1 Apoptoosimittaus 50
6.1.2 Proliferaatiomittaus 51

6.2 Avenantramidi ja Tranilast **52**
6.2.1 Avenantramidi 52
6.2.2 Tranilast 52
6.2.2.1 Transepiteelisen resistanssin määritys 52
6.2.2.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus 53
6.2.2.3 Kalvoröyhelöiden määritys 54

6.3 PT-aveniini **55**
6.3.1 Transepiteelisen resistanssin määritys 55
6.3.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus 55
6.3.3 Kalvoröyhelöiden määritys 56

7 JOHTOPÄÄTÖKSET **57**

Lähdeluettelo **59**

LYHENTEET JA SYMBOLIT

APC	Antigen presenting cell, antigeenin esittelijäsolu
α-DGP antibody	Anti-deamidated gliadin peptide antibody, antideamidoitu gliadiinipeptidivasta-aine
α-TG2 antibody	Anti-transglutaminase-2 antibody, antitransglutaminaasi 2 -vasta-aine
αβ-TCR	Alpha beta T cell receptor, alfa-beta-T-solureseptori
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi
EGF	Epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi
FITC	Fluorescein isothiocyanate, fluoresoiva isotiosyanaatti
HBSS	Hank’s balanced salt solution
HLA	Human leukosyte antigen, ihmisen leukosyyttiantigeeni
PBS	Phosphate-buffered saline
PT-aveniini	Pepsiinillä ja trypsiinillä pilkottu aveniini
PT-BSA	Pepsiinillä ja trypsiinillä pilkottu BSA
PT-gliadiini	Pepsiinillä ja trypsiinillä pilkottu gliadiini
SEM	Standard error of the mean, keskiarvon keskivirhe
TER	Transepithelial resistance, transepiteelinen resistanssi
TG2	Transglutaminase-2, transglutaminaasi 2

1 JOHDANTO

Keliakiaa on aiemmin pidetty melko harvinaisena lasten suolistotautina, jonka tyyppioireita ovat olleet kasvun hidastuminen, imeytymishäiriöt sekä krooninen ripuli. Taudinkuvan laajeneminen, diagnostiikan kehittyminen ja tehokkaan hoitomenetelmän keksiminen (gluteeniton ruokavalio) ovat kuitenkin muuttaneet käsitystämme keliakiasta ja sen esiintyvyydestä merkittävästi. Nykyään keliakiaa voidaankin Suomessa pitää jo kansantautina, jota esiintyy kaikenikäisillä. Vuonna 2006 suomalaisia keliakiapotilaita oli diagnosoitu kuitenkin vain 24 000, joka osittain selittyy sillä, että taudin moni-ilmeisyys viivästyttää helposti oikean diagnoosin tekemistä. Nykyään suurin osa keliakiasta diagnosoidaankin aikuisilla, jotka ovat useimmiten 30–40-vuotiaita. Nykytiedon valossa keliakiaa voidaan siis pitää koko elimistön elinikäisenä sairautena, jota esiintyy kaikenikäisillä (Mäki ym., 2006).

Keliakiassa vehnän, ohran ja rukiin sisältämä gluteeni, ja eritoten sen sisältämä gliadiini, aiheuttaa tulehduksen ohutsuolen limakalvossa. Keliakiaan voi kuitenkin liittyä paljon muutakin kuin pelkkä suoliston limakalvovaurio. Sairaus voi esimerkiksi aiheuttaa luun tiheyden heikentymistä tai ilmentyä ihottumana (*dermatitis herpetiformis,* ihokeliakia) (Collin ym., 2002). Keliakiaan on kuitenkin olemassa tehokas hoito, tiukka gluteeniton ruokavalio, jolla suolisto- ja suoliston ulkopuoliset oireet saadaan kuriin. Gluteenittomalla ruokavaliolla suolen limakalvo paranee 1–2 vuoden aikana (Kaukinen ym., 2007a).

Vaikka kaurakin sisältää gluteenia, sen on kuitenkin osoitettu sopivan keliaakikoille. Kaurasta on löydetty useita terveydelle hyödyllisiä molekyylejä ja tämän tutkimuksen tarkoituksena onkin selvittää, voiko kauran eräs fenolinen antioksidantti, avenantramidi, tai siitä synteettisesti johdettu lääkeaine Tranilast, estää tai parantaa gliadiinin haittavaikutuksia *in vitro*. Tämän tutkimuksen toisena tavoitteena on tutkia kauran gliadiinia vastaavan prolamiinin, aveniinin, toksisuutta suolen epiteelisoluviljelmissä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

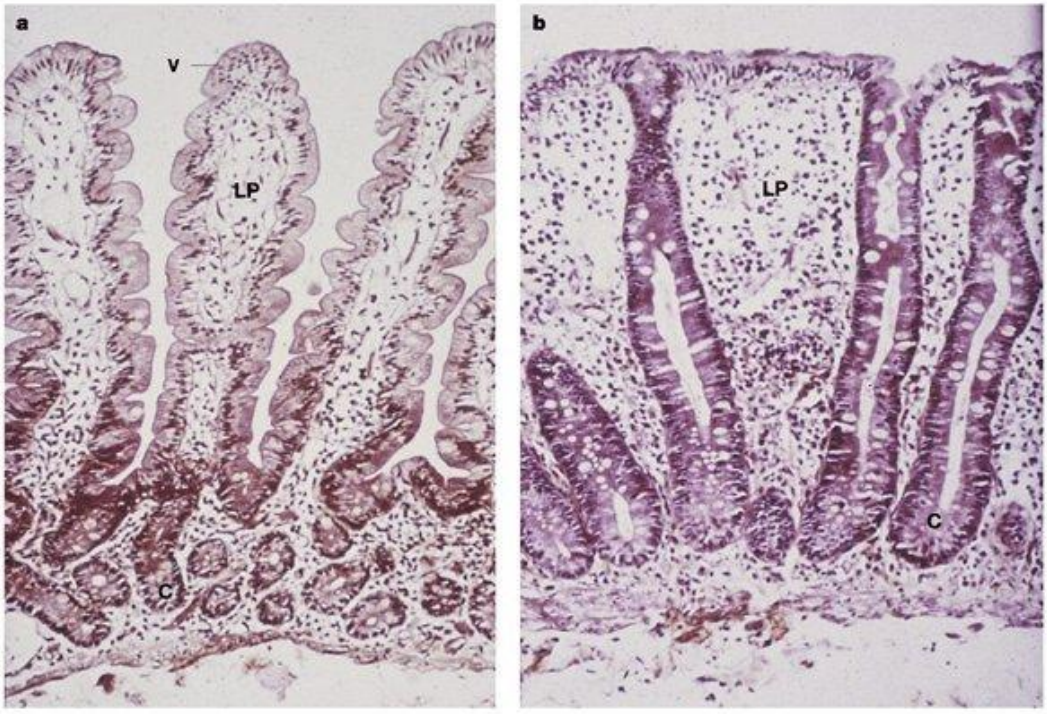
2.1 Keliakia

2.1.1 Yleistä keliakiasta

Keliakia on monimutkainen autoimmuunisairaus, joka on erityislaatuinen verrattuna muihin autoimmuunisairauksiin siksi, että taudin edellytyksenä olevat keskeisimmät geneettiset tekijät sekä ympäristötekijä on löydetty. Keliakia on siis perinnöllinen sairaus, jossa vehnän, ohran ja rukiin sisältämä gluteeni aiheuttaa kroonisen tulehduksen ohutsuolessa. Tämän tulehdusreaktion seurauksena ohutsuolen nukkalisäkkeet surkastuvat (villusatrofia) ja kuopakkeet pidentyvät (kryptahyperplasia). Näiden muutosten seurauksena limakalvo muuttuu litteäksi, kun terveessä ohutsuolessa limakalvo on voimakkaasti poimuttunut (Kuva 2.1).

Keliakiapotilaiden oireet voivat vaihdella suuresti mutta ne ovat yleensä ikäryhmään sidonnaisia, sillä tauti voidaan diagnosoida joko varhaisessa lapsuusiässä niin sanottujen klassisten oireiden perusteella tai vasta myöhemmin aikuisiässä, jolloin oireiden kirjo on paljon laajempi (Sollid 2002). Vauvoilla ja pikkulapsilla keliakian oireina esiintyy usein ripulia ja imeytymishäiriöitä, jotka edelleen johtavat kasvuhäiriöihin. Myös oksentelu, ruokahaluttomuus ja jopa ummetus ovat yleisiä. Vanhemmilla lapsilla ja nuorilla keliakia tyypillisesti ilmenee suoliston ulkopuolisina oireina kuten lyhytkasvuisuutena, neurologisina oireina tai anemiana. Keliakian tyyppioire myös aikuisilla on ripuli, johon saattaa liittyä vatsakipua. Kuitenkin vain alle puolella viime vuosikymmenen aikana diagnosoiduista aikuispotilaista ripuli on ollut ensisijainen oire. Aikuisiässä keliakia todetaankin usein esimerkiksi imeytymishäiriöistä johtuvien sivuoireiden, kuten esimerkiksi raudanpuuteanemian, osteoporoosin tai osteopenian takia. Keliakiaan liittyvät vauriot ohutsuolessa voidaan myös huomata sattumalta, kun potilaalle on tehty sisätähystys jonkun muun tautiepäilyn, esimerkiksi ruokatorvitulehduksen takia. Keliakia voi aiheuttaa myös muunlaisia, harvinaisempia oireita. Näihin oireisiin lukeutuvat muun muassa ummetus, laihtuminen, uupumus, nivel- ja lihaskivut, haavaumat (aftat) suun limakalvolla, veren proteiini- tai kalsiumpitoisuuden alentuminen sekä maksan

entsyymitasojen kohoaminen. Keliakia voi ilmetä myös iho-oireina, jolloin on kyseessä ns. ihokeliakia (*dermatitis herpetiformis*) sekä vaikeina neurologisina oireina, joista on esimerkkinä gluteeniataksia. Näin ollen keliakia ei ole pelkkä suolistosairaus, vaan koko kehon elinikäinen sairaus (Green & Cellier, 2007; Hopper ym., 2007).



Kuva 2.1. a) Kuva terveen ohutsuolen limakalvosta, jossa näkyvät normaalit villukset (V) ja kryptat (C). Lamina propria (LP) on löyhästä sidekudoksesta muodostuva ohut kerros epiteelin alapuolella, joka sisältää laajan veri- ja imusuoni-verkoston. b) Keliaakikon limakalvon tunnistaa villusatrofiasta ja kryptahyper-plasiasta, jolloin limakalvosta tulee litteä ja lymfosyyttien kertyminen lamina propriaan ja epiteeliin lisääntyy. (Mukaillen Sollid, 2002.)

Vielä 1970-luvulla keliakiaa pidettiin melko harvinaisena sairautena ja sen maailmanlaajuisen prevalenssin arvioitiin olevan 0,03 % (Lohi ym., 2007). Käsitys taudista ja sen oireista on kuitenkin muuttunut radikaalisti yli kolmessa vuosikymmenessä. Viimeisimpien kansainvälisten tutkimusten mukaan keliakian prevalenssi maailmanlaajuisesti on 0,5-1 %. Kuitenkin vain yksi yhdeksästä aikuisesta keliaakikosta tulee diagnosoiduksi, ja ”keliakian jäävuori” (Kuva 2.2) onkin yleisesti

tunnettu käsite. Keliakia on siis alidiagnosoitu sairaus ja siihen on useita syitä. Ensinnäkin monet kliinikot olettavat tunnistavansa keliaakikon lapsuusiän tyyppioireiden, esimerkiksi imeytymishäiriöiden tai siitä johtuvien seurausten, perusteella. Tosiasiassa tyypillisin keliaakikko on neljissä kymmenissä kun hänet diagnosoidaan. Lisäksi aikuisilla oireet ovat hyvin erilaisia kuin lapsilla, ja huomattavalla osalla aikuisista keliaakikoista ei ole ollenkaan gastrointestinaalisia oireita, vaan sairaus voi ilmetä muualla kehossa, aiemmin luetelluin oirein. Tämä taas johtaa siihen, että oikean diagnoosin tekeminen usein pitkittyy. Diagnoosin viiveen on raportoitu vaihtelevan 4,5 vuodesta jopa yhdeksään vuoteen (Hopper ym., 2007). Aikuisilla keliakiaa esiintyy tuntemattomasta syystä johtuen kahdesta kolmeen kertaa enemmän naisilla kuin miehillä, mutta yleisesti myös muiden autoimmuunisairauksien esiintyvyys on suurempi naisväestössä (Green & Cellier, 2007). Keliakialla on todettu olevan yhteys muista autoimmuunisairauksista ainakin tyypin 1 diabetekseen sekä autoimmuunikilpirauhastautiin, joiden sairastumiseen keliaakikoilla on lähes kymmenkertainen riski verrattuna normaaliväestöön. Myös Sjögrenin syndroomalla, primaarisella biliaarisella kirroosilla, Addisonin taudilla, sydänlihassairaudella (kardiomyopatia) sekä ääreishermon neuropatialla on todettu olevan yhteys keliakiaan. Kun potilaalla on sekä jokin edellä mainituista autoimmuunisairauksista sekä keliakia, on keliakia yleensä oireeton. Se paljastuu vasta autoimmuunisairauden toteamisen jälkeen, kun potilas on lähetetty riskiryhmään kuuluvana keliakian serologiseen seulontaan (Periolo & Chernavsky, 2006).

Kuva 2.2. Keliakian jäävuori. (Mukaillen Mäki & Collin 1997; Hopper ym., 2007.)

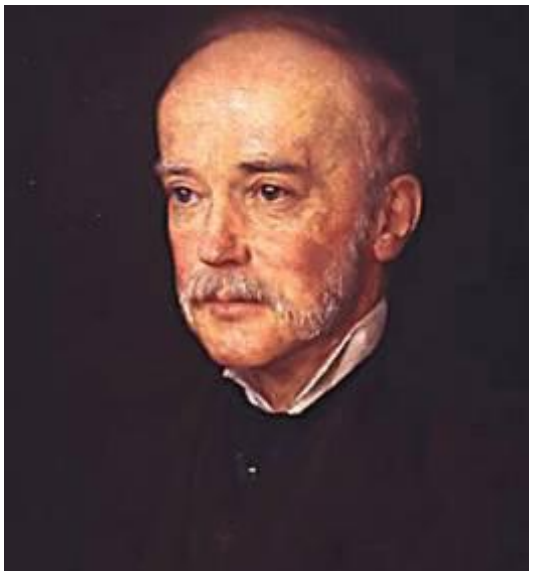
2.1.2 Keliakian historia

Vaikka keliakia saattaakin vaikuttaa melko uudelta taudilta, joka yleistyy koko ajan varsinkin läntisissä teollisuusmaissa, on sillä kuitenkin pitkä historia. Keliakian kuvasi ensi kerran kreikkalainen lääkäri Aretaios Kappadokialainen toisella vuosisadalla jKr. Tuolloin tauti sai nimen koiliakos, joka tarkoittaa kreikaksi vatsaa. Aretaioksen mukaan koliakosta esiintyi aikuisilla, erityisesti vanhoilla naisilla, ja taudin oireiksi hän kirjasi kroonisen ripulin, vaaleat ja pahanhajuiset ulosteet sekä yleisen heikkouden ja kudosten surkastumisen. Nämä Aretaioksen kuvaamat oireet sopivat hyvin vielä tänäänkin vaikean keliakian taudinkuvaan. Hoidoksi Aretaios suositteli paastoa, sillä hän katsoi oireiden johtuvan ruuansulatushäiriöistä, ja siten suolisto sai levätä (Mäki ym., 2006).

Kului noin 1700 vuotta ennen keliakian kuvauksen seuraavaa päivitystä. Vuonna 1856 englantilainen Francis Adams käänsi Aretaioksen kirjoitukset englannin kielelle ja taudin kreikankielinen nimi kääntyi muotoon coeliac diathesis, josta on peräisin myös nykyään käytetty nimi coeliac disease eli keliakia. Kolmisenkymmentä vuotta myöhemmin, vuonna 1880 lääkäri Sir Patrick Manson otti käyttöön termin tropical sprue kuvatakseen tropiikissa esiintyvää vaikeaa rasvaripulia ja ravitsemushäiriötä. Samankaltaista rasvaripulia todettiin myöhemmin myös tropiikin ulkopuolella ja tautia alettiin kutsua nimellä non-tropical sprue tai idiopathic sprue. Sprue-sana voitiin myös korvata rasvaripulin latinankielisellä sanalla steatorrhoea. Manson liittyy keliakian tarinaan siten, että myöhemmin trooppinen rasvaripuli ja keliakia todettiin samaksi taudiksi, jolloin käyttöön tuli myös termi coeliac sprue (Mäki ym., 2006).

Jotta voimme kuitenkin jatkaa keliakian historiaa kronologisessa järjestyksessä, on meidän vielä palattava takaisin 1800-luvun lopulle. Vuonna 1888 lontoolainen pediatri Samuel Gee (Kuva 2.3) julkaisi St. Bartholomew'n sairaalan raporttisarjassa kuvauksen keliakiasta otsikolla "On the Coeliac Affection", joka suurelta osin myötäili Aretaioksen havaintoja. Aretaioksen aiemmin lueteltuihin oireisiin Gee lisäsi potilaiden kalpeuden ja painotti, että ulkoisten oireiden takia potilaiden suolistovaivat saattoivat helposti jäädä huomiotta. Uutta Geen julkaisussa oli myös se, että hän kuvasi keliakiaa krooniseksi ruuansulatushäiriöksi, jota esiintyy kaikenikäisillä, kuitenkin erityisesti 1–5-vuotiailla lapsilla. Hän oli myös sitä mieltä, että jos potilasta oli mahdollista hoitaa, se onnistui ainoastaan ruokavalion avulla (Dowd & Walker-Smith, 1974). Vaikka keliakian syytä ei vielä

tiedettykään, oli Gee jo oikeilla jäljillä kiinnittäessään huomiota potilaiden ruokavalioon. Hän suositteli nauttimaan jauhoista valmistettuja ruokia suhteellisen vähän, mutta leipää potilaat saivat nauttia, kunhan se oli paahdettu molemmin puolin.

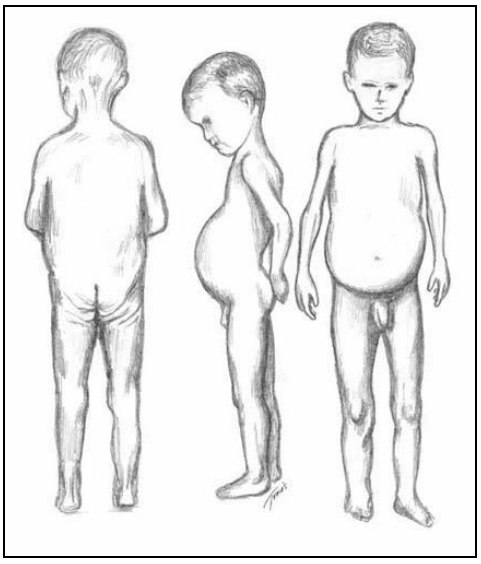


Kuva 2.3. Tohtori Samuel Gee. (Öljyvärimuotokuvan on maalannut Charles Vigor.)

Geen artikkelin myötä myös monet muut tutkijat alkoivat perehtyä keliakiaan ja julkaista kokemuksiaan taudista. 1900-luvun alussa kuuluisimmat keliakiatutkijat olivat amerikkalainen patologi C.A. Herter sekä saksalainen lastentautiopin professori Otto Heubner, joiden mukaan keliakiaa kutsuttiin Suomessakin Herter-Heubnerin taudiksi aina 1960-luvulle asti. Angloamerikkalaisissa maissa keliakia taas tunnettiin nimellä Gee-Herterin tauti. Keliakian syistä ei vielä tuolloinkaan ollut sen parempaa tietoa, vaikka useimmat lääkärit suosittelivatkin tärkkelyspitoisten ruokien, eli siis viljojen, jättämistä pois potilaiden ruokavaliosta. Hoitona käytettävät dieetit saattoivat lisäksi olla mitä kummallisimpia: Gee raportoi erään lapsipotilaan parantuneen syömällä hyvälaatuisia simpukoita ja Suomeenkin asti rantautui Haasin vuonna 1924 lanseeraama banaanidieetti, joka olikin menestys, mutta ilmeisesti siksi, että dieettiin kuului myös leivän ja kaikkien viljatuotteiden välttäminen. Kiivas keliakiatutkimus tuotti tulosta myös taudin genetiikkaan liittyen. Keliakian nimittäin huomattiin esiintyvän suvuittain ja samaisissa suvuissa näytti myös esiintyvän normaalia enemmän diabetestä.

Kesti kuitenkin kohtuullisen kauan, suunnilleen 1800 vuotta Aretaioksen päivistä, kun syy keliakiaan viimein löytyi. Hollantilainen lastenlääkäri W.K. Dicke osoitti väitöskirjassaan vuonna 1950, että vahingollinen tekijä ei ollutkaan viljan tärkkelys, jota aikaisemmin oli arveltu keliakian aiheuttajaksi. Syy löytyi vehnästä, ja kollegoidensa kemisti J.H. van de Kamerin ja lastenlääkäri H.A. Weyersin avustuksella Dicken onnistui osoittaa, että tämä vahingollinen osa oli vehnän prolamiini nimeltään gliadiini. Dicken ja hänen työryhmänsä havainnot todennettiin nopeasti myös muualla (Mäki ym., 2006).

Vaikka Aretaios alkujaan esittikin keliakiaa esiintyvän lähinnä vanhuksilla, pidettiin keliakiaa 1800-luvun lopulta aina 1970-luvulle asti melko harvinaisena lastentautina. Suomessa taudista esitti tieteellisen kuvauksen ensi kerran professori Wilhelm Pipping vuonna 1923 ja määrittelyä jatkoi Margit Edgren pitämässään esitelmässä Suomen Lastenlääkäriyhdistyksen perustavassa kokouksessa vuonna 1930. Keliakia-sana oli tuolloin kuitenkin täysin tuntematon ja taudista käytettiin nimeä intestinaalinen infantilismi, ja myöhemmin Herter-Heubnerin tauti. Lapsipotilaat olivat vaikeasti sairaita (Kuva 2.4), ja monet heistä menehtyivät tautiin, sillä hoitoa ei tunnettu. Ennuste kuitenkin parani hieman kun potilaiden pääasiallisena ravintona ryhdyttiin käyttämään äidinmaitoa tai kun heidät sittemmin määrättiin Haasin banaanidieetille.



Kuva 2.4. Piirros tyypillisestä lapsikeliaakikosta.
(www.pigur.co.il/imgceliac/celiac.jpg)

Jo 1950-luvulla Suomeenkin kantautui viestejä gluteenittoman ruokavalion tehosta taudin hoidossa, mutta dieettiin suhtauduttiin varauksella yli vuosikymmenen ajan. 1960-luvulla ruokavaliohoidon teho voitiin viimein varmistaa, vaikka olikin epäselvää, kuinka pitkään hoitoa tulisi toteuttaa. Ongelmana oli pitkään myös taudin diagnosointi. Vuonna 1962 aloitettiin suolikoepalojen otto pieniltäkin lapsilta, jolloin todettiin keliakian olevan melko yleinen tauti. Sen myös todettiin esiintyvän erityisesti alle kaksivuotiailla, ja 1960-luvun puolivälissä kansallisia pikkulasten ruokintaohjeita muutettiin siten, että alle viisikuisille lapsille ei suositeltu annettavaksi gluteenipitoisia viljatuotteita. Tämä nosti taudin puhkeamisikää ja pikkulapsipotilaat tulivat vuosi vuodelta harvinaisemmaksi. Vuonna 1969 eurooppalainen lasten gastroenterologian järjestö (nykyään ESPGHAN, European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) järjesti Interlakenissa Sveitsissä paneelikeskustelun, jossa sovittiin keliakian määritelmästä ja yhteisistä diagnostisista kriteereistä. Näitä kriteerejä on kutsuttu yleisesti ns. Interlakenin säännöiksi. Myöhemmin lasten keliakia ja aikuisten idiopaattinen rasvaripuli todettiin samaksi taudiksi ja Sir Christopher Boothin vuonna 1973 järjestämän seminaarin loppupäätelmänä olikin, että samat kriteerit soveltuvat käytettäviksi kaikissa ikäryhmissä. Viimeistään tällöin myös keliakian elämänikäisyys tuli kiistattomaksi (Mäki ym., 2006).

2.1.3 Keliakian prevalenssi

Serologisten seulontatutkimusten perusteella keliakian prevalenssi Euroopassa ja alueilla, joilla on paljon eurooppalaisten jälkeläisiä (esimerkiksi Amerikassa ja Australiassa), on aikuisväestössä suunnilleen 0,5–1 %. Suppeammat tutkimukset Pohjois-Afrikassa ja Lounais-Aasiassa viittaavat yhtä korkeaan prevalenssiin myös näillä alueilla. Itse asiassa korkein keliakian prevalenssi maailmanlaajuisest, 5,4 %, on raportoitu olevan Pohjois-Afrikan Sawahariväestössä, jossa keliakian toinen geneettinen alttiustekijä *HLA-DQ2* (human leukocyte antigen DQ2) -geeni on yleinen. Keski-Afrikassa ja Kaukoidässä ei ole tehty laajoja serologisia seulontoja, mutta ainakin oireinen keliakia on näillä alueilla hyvin harvinainen. Se tiedetään myös, että Kaukoidässä HLA-DQ2:n prevalenssi on erittäin alhainen. Perinnölliset eroavaisuudet, erityisesti HLA-tyypeissä, eri väestöjen kesken selvästi siis vaikuttavat havaittuihin keliakian prevalenssieroihin. Myös viljatuotteiden kulutus on yhteydessä keliakian prevalenssiin. Kaukoidässä ja Saharan eteläpuoleisessa Afrikassa gluteenipitoisia viljoja käytetään ravintona hyvin vähän. Lisäksi on pystytty osoittamaan, että nautitun gluteenin määrällä, varsinkin varhaislapsuudessa, olisi merkitystä henkilön alttiuteen sairastua keliakiaan elämänsä aikana. Maissa joissa vauvojen gluteenipitoisten viljojen kulutus on vähäistä (esimerkiksi Tanskassa, Eestissä ja Suomessa), myös sekä lapsuus- että aikuisiän keliakian insidenssi on matalampi kuin maissa, joissa pikkulasten gluteenin kulutus on runsasta (esimerkiksi Ruotsissa) (Dubois & van Heel, 2008). Suomessa keliakian prevalenssi on kuitenkin nykyään aikuisväestössä jo 2 % luokkaa (Lohi ym., 2007). Vanhuksilla keliakian prevalenssi on 2,5 % (Vilppula ym., 2008) ja kouluikäisillä lapsilla 1,5 % (Mäki ym., 2003).

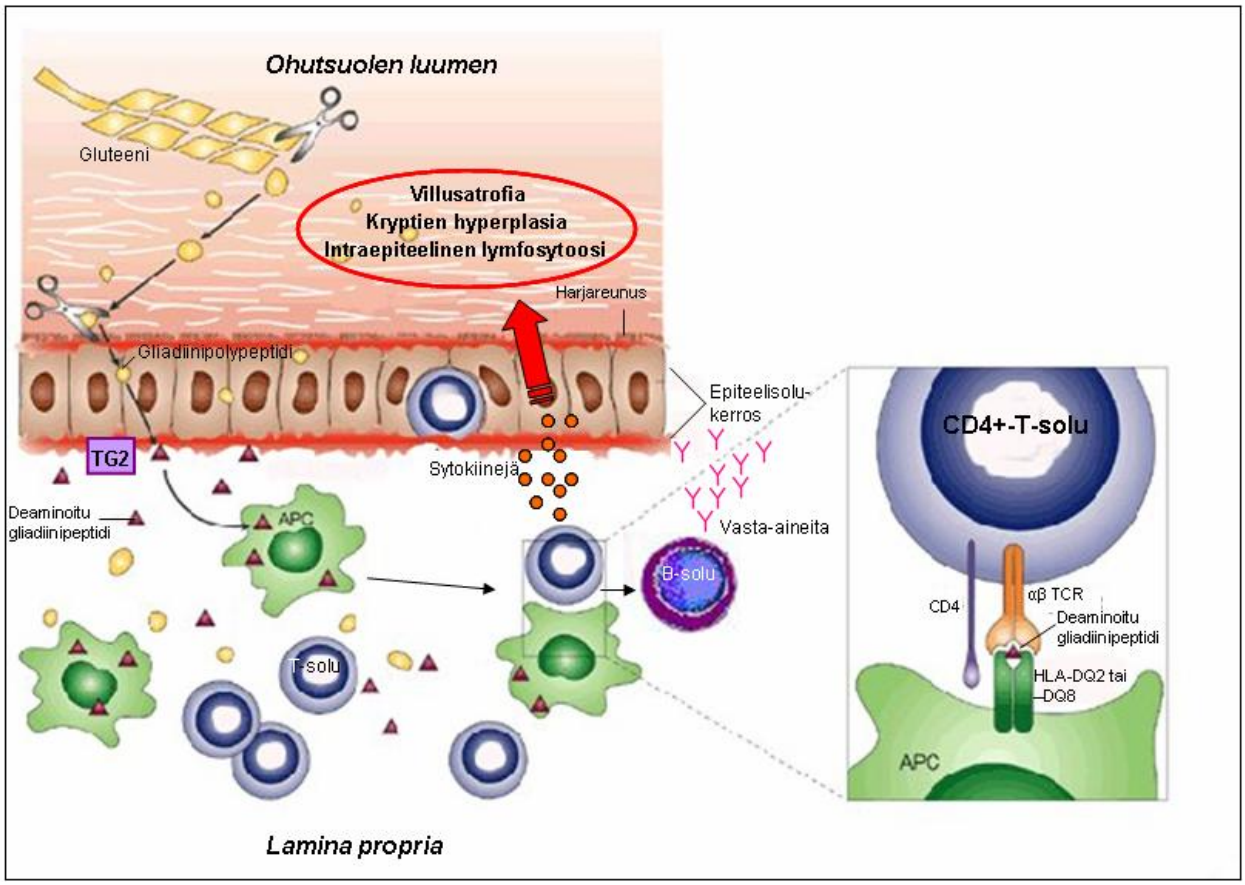
2.1.4 Keliakian patogeneesi

Keliakian, kuten muidenkin kroonisten tulehdussairauksien, etiologiaan liittyy sekä ympäristö- että geneettisiä tekijöitä. Jälkimmäisistä ovat hyvänä esimerkkinä *HLA*-geenit, joiden toiminta on tärkeässä osassa useiden kroonisten tulehdussairauksien, mukaan lukien keliakian, puhkeamisessa. Keliakian sekä muiden autoimmuunisairauksien patogeenisten mekanismien selvittämisen tekee haasteelliseksi se, että geneettisten ja ympäristötekijöiden välinen vuorovaikutus on yleensä hyvin monimutkaista. Keliakiaa voidaan kuitenkin kolmen merkittävän syyn takia pitää mallisairautena muita monimutkaisia autoimmuunisairauksia tutkittaessa. Ensinnäkin sairauden aiheuttava ympäristötekijä, gluteeni, on tunnistettu ja sen vaikutuksia voidaan tutkia poistamalla ja palauttamalla se hallitusti potilaan ruokavalioon. Toiseksi, keliakian alttiuden määräävät HLA-molekyylit on pystytty identifioimaan. Kolmas syy, miksi keliakiaa voidaan pitää muiden autoimmuunisairauksien mallitautina, on se, että keliakian tapauksessa taudin vahingoittamaan elimeen, ohutsuoleen, päästään suhteellisen helposti käsiksi. Tämä on mahdollistanut yksityiskohtaisten *in situ* -tutkimusten tekemisen ja taudin kannalta merkityksellisten solupopulaatioiden eristämisen *in* vitro -tutkimuksia varten (Sollid, 2002). Autoimmuunisairautena keliakian patogeeniset mekanismit ovat kuitenkin hyvin monimutkaisia. Ohutsuolen epiteelin ja lamina proprian välisten prosessien yksityiskohdat sekä keliakian perimmäinen syy ovat vielä selvittämättä.

Koska keliakia on perinnöllinen sairaus, on sen patogeneesin kuvailu luonnollista aloittaa sairaudelle altistavista geeneistä. HLA-kompleksi on hyvin polymorfinen 4 Mb alue kromosomialueella 6p21. Se käsittää yli 200 geeniä ja enemmän kuin 3000 tunnettua alleelia. HLA luokan II geenit, *DP, DQ* ja *DR*, osallistuvat eksogeenisten peptidiantigeenien esittelyyn T-soluille. Näiden geenien yhteys keliakiaan tuli ensi kerran esille serologisten menetelmien avulla kun variantti DR3 todettiin sairaudelle altistavaksi. DR3-molekyyliä koodaava alleeli sijaitsee 6 Mb laajentuneessa haplotyypissä (*DR3-DQ2*), joka löytyy joka kymmenenneltä pohjoiseurooppalaiselta. Tämä haplotyyppi liittyy myös muihin autoimmuunisairauksiin, kuten tyypin 1 diabetekseen sekä autoimmuunikilpirauhastautiin (Dubois & Heel, 2008). Yleisesti ottaen, suurimmalla osalla (noin 90 %) keliakiapotilaista siis ilmentyy HLA-DQ2-molekyyli, vähemmistöllä (noin 10 %) taas HLA-DQ8-molekyyli. HLA-DQ2 ja HLA-DQ8 -molekyylit voivat aiheuttaa alttiuden keliakialle joko esittelemällä keliakiaspesifejä peptidejä

immuunipuolustuksen T-soluille ohutsuolessa tai muokkaamalla kehittyviä T-soluja kateenkorvassa. Molemmista tapahtumista on seurauksena epänormaali CD4+-T-soluvälitteinen autoimmuunivaste, joka johtaa keliakian kehittymiseen. Tässä yhteydessä on kuitenkin hyvä mainita, että HLA-DQ2/8 selittää vain noin 40–50 % keliakian alttiudesta, joten keliakia onkin polygeeninen sairaus, jonka taustalla on muitakin kuin HLA-geenejä (Catassi & Fasano, 2008).

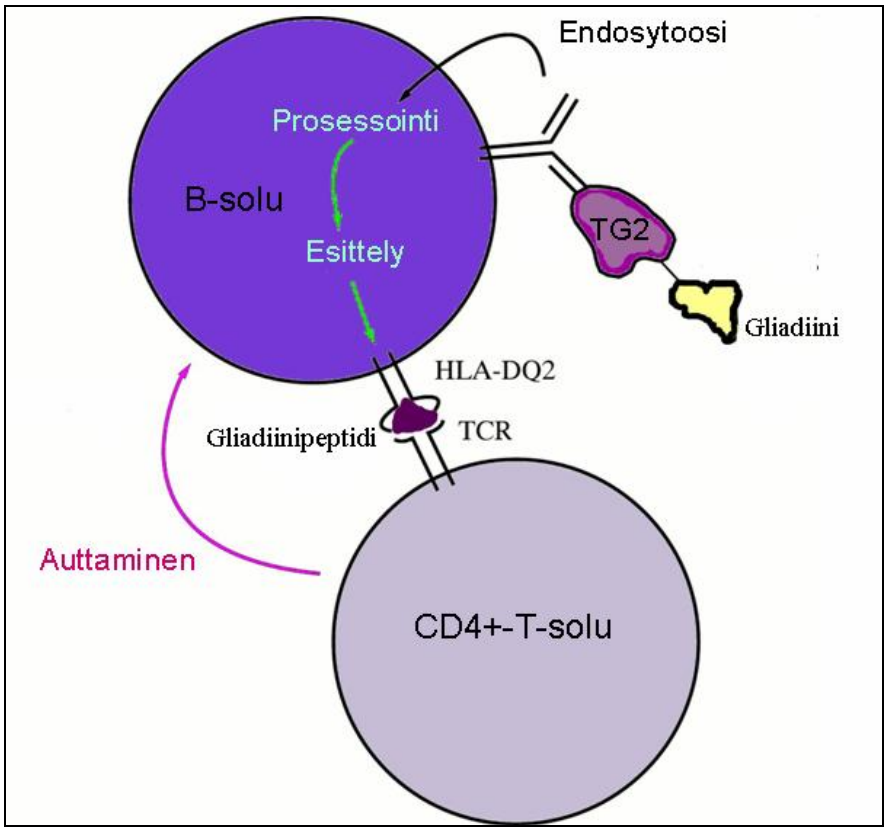
Keliakia ei kuitenkaan voi puhjeta pelkästään geneettisten tekijöiden aikaansaamana, vaan siihen tarvitaan myös ympäristötekijä, viljojen gluteeni. Gluteeni ei hajoa täydellisesti ruuansulatuskanavassa, vaan jäljelle jää erilaisia gliadiinipolypeptidejä, kuten α-gliadiinin 33-meeri, jonka on osoitettu toimivan voimakkaana antigeeninä CD4+-auttaja-T-soluille (Shan ym., 2002). Nämä gliadiinipeptidit eivät siis hajoa ohutsuolessa mahan, haiman eivätkä ohutsuolen harjareunuksen proteaasien vaikutuksesta. Jäätyään ohutsuolen luumeniin gliadiinipeptidit voivat mahdollisen ohutsuolen infektion tai lisääntyneen läpäisevyyden johdosta kulkeutua epiteelisolukerroksen läpi (Kuva 2.5). Ohutsuolen epiteelisolukerroksen toisella puolella on lamina propria, joka toimii keliakian geneettisten ja immunologisten tekijöiden näyttämönä, sillä siellä ovat immuunipuolustuksen solut. Kun gliadiinipeptidit ovat tunkeutuneet lamina proprian puolelle, ne kohtaavat transglutaminaasi 2 -entsyymin (transglutaminase-2, TG2), joka deamidoi spesifisissä peptideissä, kuten gliadiinissa, olevia glutamiinitähteitä. Gliadiinipeptidien deamidaatio lisää niiden immunogeenisyyttä. Jotta nämä peptidit voisivat aiheuttaa immunologisen vasteen, täytyy lamina propriassa kuitenkin olla myös tietynlaisia immunosyyttejä. Tässä kohtaa perimä astuu kuvaan. Suurimmalla osalla keliaakikoista antigeenin esittelijäsoluilla (antigen presenting cell, APC) on pinnallaan jo aiemmin mainittuja HLA-DQ2- tai HLA-DQ8-molekyylejä (Green & Cellier, 2007). Deaminoidut gliadiinipeptidit voivat kiinnittyä antigeenin esittelijäsolujen pinnalle HLA-DQ-molekyylien välityksellä, mikä taas mahdollistaa näiden peptidien esittelyn gliadiiniherkille CD4+-soluille ja sitä kautta hankinnaisen immuniteetin vasteiden käynnistymisen (Gianfrani ym., 2005). CD4+-solujen pinnalla deaminoitujen gliadiinipeptidien tunnistamisesta vastaavat αβ-T-solureseptorit (αβ-T-cell receptor, αβ-TCR) (Kuva 2.5) (Sollid, 2002).



Kuva 2.5. Keliakian patogeneesi. (Mukaillen Sollid, 2002.)

Gliadiinireaktiiviset CD4+-solut alkavat gliadiinipeptidien esittelyn seurauksena tuottaa tulehdusta edistäviä välittäjäaineita, kuten gamma-interferoneja. Nämä T_h1-solupopulaation tuottamat sytokiinit käynnistävät tulehduskaskadin, joka johtaa metalloproteinaasien ja muiden kudosta hajottavien entsyymien vapautumiseen ja lopulta kryptien hyperplasiaan sekä villusten surkastumiseen (Mohamed ym., 2006). Gliadiiniherkät CD4+-auttajasolut ovat vuorovaikutuksessa B-solujen kanssa, joilla on tärkeä merkitys vasta-ainevälitteisessä immuniteetissa. B-solut nimittäin tuottavat vasta-aineita, jotka keliakian tapauksessa ovat esimerkiksi vasta-aineita antideamidoituja gliadiinipeptidejä vastaan (anti-deamidated gliadin peptide antibodies, α-DGP antibodies) sekä TG2:sta vastaan (anti-transglutaminase-2 antibodies, α-TG2 antibodies)(Kaukinen ym., 2007b). Näistä jälkimmäiset ovat niin sanottuja autovasta-aineita, koska ne kohdistuvat elimistön omiin kudoksiin. Myös terveessä kehossa on B-soluja, jotka ovat spesifejä liukoisille autoantigeeneille, mutta jotta ne pystyisivät tuottamaan vasta-aineita näille antigeeneille, niiden täytyy saada apua T-soluilta. Tämä avunanto voi tapahtua sitomalla

autoantigeeni vieraan antigeenin (eli tässä tapauksessa niin sanotun kuljettajaproteiinin) T-soluepitooppiin. Keliakiassa tällainen kompleksi muodostuu TG2:n ja gliadiinipeptidin välille, ja gliadiiniherkät CD4+-solut voivat näin ollen auttaa antigeenejä esitteleviä B-soluja tuottamaan TG2-vasta-aineita (Kuva 2.6) (Jabri & Sollid, 2006). Luokan immunoglobuliini A TG2- ja DGP-vasta-aineiden herkkyyden sekä spesifisyyden on keliakiapotilailla todettu olevan jopa 95 %, ja niitä voidaankin käyttää apuna keliakian diagnostiikassa (Kaukinen ym., 2007b).



Kuva 2.6. Gliadiiniherkät CD4+-solut voivat auttaa antigeenin esittelijäsoluina toimivia B-soluja tuottamaan vasta-aineita. Jokaisella ihmisellä on B-soluja, jotka voivat tuottaa vasta-aineita autoantigeenejä vastaan, mutta ne tarvitsevat T-solujen apua aloittaakseen näiden immunoglobuliinien erityksen. Gliadiini ja TG2 muodostavat kompleksin, jossa gliadiini on kantajaproteiini. Kompleksin muodostumisen kautta gliadiiniherkät T-solut voivat auttaa B-soluja α-TG2-vasta-aine-erityksessä.(Mukaillen Mäki, 1994; Sollid, 1997.)

Gliadiinipeptidit voivat sytokiinierityksen välityksellä laukaista myös synnynnäisen immuniteetin vasteen ohutsuolen epiteelissä, mikä mahdollistaa edellä kuvatun soluvälitteisen immuniteettireaktion. Synnynnäisen immuniteetin aktivoituessa epiteelisolukon enterosyyttien interleukiini 15:n ekspressio lisääntyy (Maiuri ym., 2000; Di Sabatino ym., 2006). Tämä taas aiheuttaa epiteelinsisäisten lymfosyyttien aktivoitumisen ekspressoimaan NK-G2D-reseptoria, joka on luonnollisten tappajasolujen (nature killer cells) markkeri (Mention ym., 2003). Näin ollen lymfosyyteistä tulee sytotoksisia ja ne alkavat tappamaan enterosyyttejä, joilla on pinnallaan MICA (major histocompatibility complex class I chain related protein A) -antigeeni. MICA-antigeeni ilmentyy yleensä stressitilan, esimerkiksi infektion, seurauksena. Tarkat ja perusteelliset mekanismit epiteelin ja lamina proprian välisten prosessien taustalla ovat kuitenkin vielä selvittämättä (Di Sabatino ym., 2006; Green & Cellier, 2007).

2.1.5 Keliakian hoito

Keliakiaa voidaan tällä hetkellä hoitaa ainoastaan poistamalla gluteeni kokonaan potilaan ruokavaliosta. Tämä tarkoittaa käytännössä sitä, että keliaakikon tulee välttää vehnää, ohraa ja ruista koko loppuelämänsä ajan. Gluteenittomalla ruokavaliolla suolen limakalvo paranee yleensä 1–2 vuoden aikana (Kaukinen ym., 2007a).

Gluteenittoman ruokavalion noudattaminen ei kuitenkaan välttämättä ole potilaalle helppoa, sillä varsinkin länsimaissa viljat muodostavat merkittävän osan ihmisten nauttimasta ravinnosta. Onkin ehdottoman tärkeää, että potilas saa tarpeeksi informaatiota ruokavaliosta ja että hän kokee gluteenittoman elämäntavan mahdolliseksi arkipäivän elämässään ja saa siihen tukea (Niewinski, 2008). Keliaakikon voi kuitenkin olla vaikeaa sitoutua täysipainoisesti gluteenittomaan ruokavalioon myös siksi, että se on kalliimpi kuin normaali ruokavalio ja se koetaan usein myös sosiaalisesti rajoittavaksi. Gluteenittomien tuotteiden valikoima ja hintataso vaihtelevat maittain ja joissain maissa (kuten Suomessa) valtio tukee gluteenittomia tuotteita. Keliakian tunnettavuus sairautena sekä elintarvikkeiden merkitseminen gluteenia sisältäviksi vaihtelevat myös paljon eri maiden välillä jo pelkästään Euroopan alueella (Green & Cellier, 2007).

Keliaakikko voi korvata kielletyt päämaljat vaihtoehtoisilla viljoilla, esimerkiksi riisillä, tattarilla, maissilla, hirssillä ja kauralla. Koska edellä luetellut viljat eivät sisällä yhtä paljon B-vitamiinia kuin päämaljat, pitkään gluteenitonta ruokavaliota noudattaneilla keliakiapotilailla saattaa esiintyä vitamiinipuutosta, mutta ongelma on helposti hoidettavissa vitamiinilisien avulla (Green & Cellier, 2007).

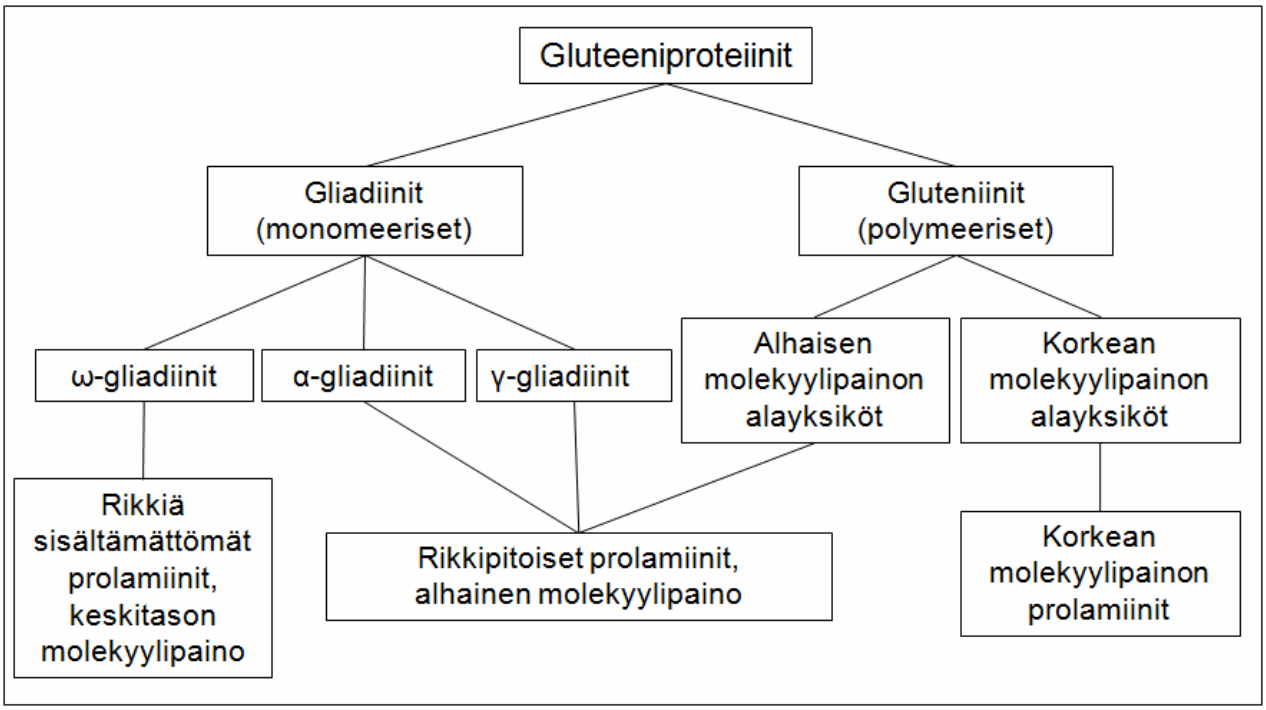
Vaikka gluteeniton ruokavalio onkin yksimielisesti hyväksytty oireisen keliakian ainoaksi hoitomuodoksi maailmanlaajuisesti, sen käyttämisestä kliinisesti oireettomien eli niin sanottujen piilevien keliaakikkojen hoidossa on vielä eriäviä mielipiteitä. Keskustelua herättävät myös henkilöt, joiden seerumista löytyy keliakiaspesifisiä vasta-aineita, mutta joiden ohutsuolessa ei toistaiseksi näy merkkejä mukoosavaurioista. On kuitenkin osoitettu, että gluteenittomasta ruokavaliosta on hyötyä tällaistenkin potilaiden kohdalla (Kurppa ym., 2009). Yhteenvetona voidaan siis sanoa, että niin kauan kuin keliakian hoitoon ei ole olemassa muita vaihtoehtoja, gluteeniton ruokavalio on suositeltava kaikentyyppisille keliaakikoille (Troncone ym., 2008).

2.2 Gluteeni

Gluteeni on proteiinifraktio, joka löytyy kaikista päämaljoistamme, vehnästä, ohrasta, rukiista ja kaurasta. Gluteeni ei siis ole yksittäinen proteiini, vaan käsittää kaikki viljanjyvän ydinosan proteiinit. Se on jäljelle jäävä sitkomassa, kun jyvän ydinosasta on poistettu tärkkelys (Mäki ym., 2006). Gluteeni sisältää paljon proliini- ja glutamiiniaminohappoja ja se voidaan edelleen jakaa erillisiin proteiiniosioihin, prolamiineihin. Vehnän gliadiini-prolamiini sisältää ne myrkylliset aineet, jotka aiheuttavat keliakian. Tosin vehnän toinenkin prolamiinin, gluteniinin, on todettu olevan myrkyllinen, mutta gliadiinia on tutkittu enemmän. Gliadiinia vastaavat prolamiinit ovat rukiissa sekaliini, ohrassa hordeiini sekä kaurassa aveniini. Tyypillisesti vehnän prolamiinifraktiot on erotettu toisistaan liukoisuuden perusteella, jolloin alkoholiin liukenevia proteiineja kutsuttiin gliadiiniksi ja alkoholiin liukenemattomia gluteniiniksi. Uudempien tutkimusten mukaan gluteniinin uuttaminen alkoholilla ei kuitenkaan tuota kahta täysin erillistä fraktiota, vaan gluteniinia löytyy gliadiinifraktiosta ja

päinvastoin. Gluteenin jaotteluun onkin esitetty parempaa, molekyylipainoon perustuvaa luokittelua (Kuva 2.7) (Howdle, 2006).

Gliadiinin myrkyllisyydestä kertovia koetuloksia on soluviljelymalleilla saatu jo 1970-luvulta alkaen. Gliadiini aiheuttaa ohutsuolen epiteelisoluissa morfologisia muutoksia (solujen tukirangan muutokset, aktiinin uudelleenjärjestäytyminen, kalvoröyhelöiden syntyminen (*membrane ruffles*) solulauttojen reunalle), muutoksia proliferaatiossa (Barone ym., 2007) sekä apoptoosin lisääntymistä (Giovannini ym., 2000). Lisäksi epiteelisolukerroksen läpäisevyys lisääntyy gliadiinin vaikutuksesta (Sander ym., 2005). Nämä kaikki haittavaikutukset on havaittu altistaessa Caco-2-soluja pepsiinillä ja trypsiinillä pilkotulle gliadiinille (PT-gliadiini). Caco-2-solulinja on ihmisen paksusuolen rauhassyövästä kehitetty solulinja, jota on käytetty paljon suolen epiteelin tutkimisessa viimeisten vuosikymmenten aikana (Sambuy ym., 2005).



Kuva 2.7. Vehnän gluteeniproteiinin jaottelu. (Mukaillen Shewry ym., 1992)

2.3 Kaura

Vaikka kaurakin sisältää gluteenia, sen on todettu kuitenkin sopivan keliaakikon ruokavalioon, sillä se ei kliinisten tutkimusten mukaan estä ohutsuolta paranemasta eikä aiheuta ohutsuolen uudelleen vaurioitumista potilaan ollessa muutoin gluteenittomalla dieetillä (Holm ym., 2006; Koskinen ym., 2008). Janatuinen ym. (2000) totesivat, ettei kaura myöskään aiheuttanut keliakialle tyypillisten vasta-aineiden tasojen nousua toipuvilla keliakiapotilailla. Viitteitä kauran turvallisuudesta keliaakikoille on saatu lisäksi *in vitro* -tutkimuksista, joissa on esimerkiksi todettu, että aveniini, vehnän gliadiinia vastaava prolamiini kaurassa, ei aiheuta endomysiumvasta-aineiden tuottumista (Picarelli ym., 2001) eikä T_h1-soluvastetta hoidettujen keliakiapotilaiden ohutsuolen limakalvon biopsioiden kudosviljelmissä (Kilmartin ym., 2003).

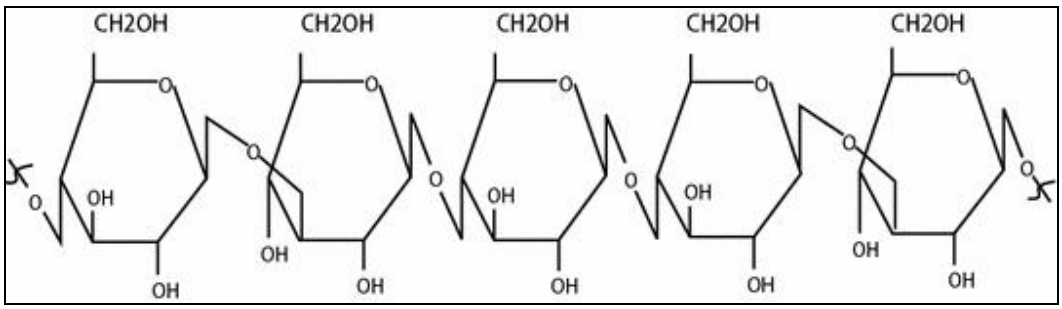
Kauran, erityisesti sen ravintokuitujen, terveysvaikutuksia on tutkittu ahkerasti viime vuosina. Sekä kauran liukoisten että liukenemattomien ravintokuitujen on todettu olevan monin tavoin tärkeitä terveyden kannalta. Liukoinen kuitu sisältää muun muassa glykosaminoglykaania, pektiiniä ja tiettyjä hemiselluloosamolekyylejä. Selluloosa, ligniini ja loput hemiselluloosat ovat liukenemattomia kuituja. Ligniini esimerkiksi pystyy absorboimaan sappihappoja. Liukenemattomilla kuiduilla on lisäksi yleensä hyvä vedensitomiskyky, mikä edistää ulosteen muodostumista. Liukoinen kuitu rakentuu ei-tärkkelyspitoisista polysakkarideista, kuten betaglukaanista, ja se voi muodostaa viskooseja liuoksia. Lisääntynyt viskositeetti ohutsuolessa hidastaa ravintoaineiden kulkeutumista limakalvon lävitse, viivästyttää suolen tyhjenemistä sekä hidastaa glukoosin ja sterolien imeytymistä. Näin ollen liukoinen kuitu alentaakin tehokkaasti veren kolesterolia ja normalisoi veren sokeritasoja.

Ravintokuitujen on todettu myös liittyvän proteiinien toimintaan ohutsuolessa, sillä nämä proteiinit voivat sitoa mineraaleja ravintokuitupartikkeleihin ja siten vaikuttaa mineraalien biologiseen hyötyosuuteen ja edelleen kehon mineraalitasapainoon (Butt ym., 2008). Kaura, kuten muutkin yksisirkkaiset viljakasvit, sisältää myös joukon fenoliryhmiä omaavia fytokemikaaleja, jotka pystyvät jäljittämään ja sitomaan vapaita radikaaleja ja näin ollen osallistuvat antioksidanttiaktiivisuuden syntymiseen *in vitro* (Chen ym., 2007).

Koska gluteenittoman ruokavalion noudattaminen on keliaakikoille haasteellista, voi kauran käyttäminen muutoin tiukasti viljattoman ruokavalion ohella olla merkittävä helpotus ja edesauttaa potilaiden sitoutumista gluteenittomaan ruokavalioon (Butt ym., 2008). Tutkimusten mukaan keliakiapotilaat ovatkin sitä mieltä, että kauran käyttö monipuolistaa gluteenitonta ruokavaliota ja parantaa sen ravintoarvoa. Lisäksi keliaakikot myös arvostavat kauran makua, hyvää saatavuutta ja alhaista hintaa (Peräaho, 2004). Jos kaurasta vielä löytyisi molekyyli, joka voisi ennaltaehkäistä tai parantaa gliadiinin aiheuttamia haittoja ohutsuolen epiteelisoluissa, olisi se erinomainen lääkeainekandidaatti keliakian hoitoon tähtäävässä tutkimuksessa, koska kaura jo lähtökohtaisestikin sopii lähes kaikille keliaakikoille.

2.3.1 Betaglukaani

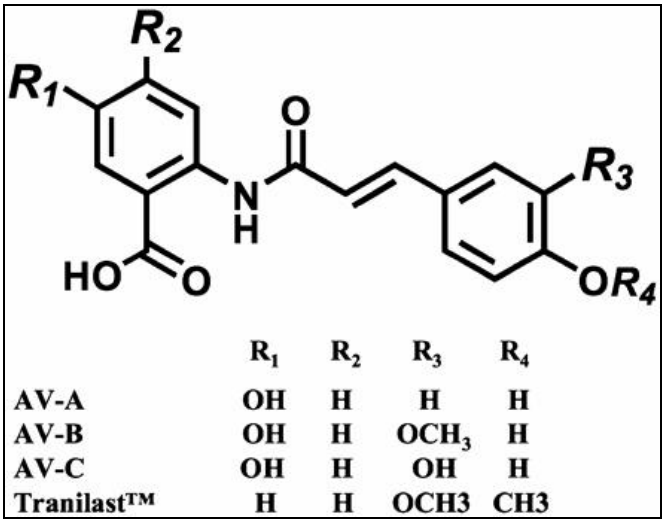
Kauran liukoisen ravintokuidun tärkein komponentti on betaglukaani. Se on lineaarinen, haarautumaton polysakkaridi, joka rakentuu β-D-glukopyranosyyliyksiköistä (Kuva 2.8). Betaglukaanilla on ainutlaatuisia toiminnallisia ja ravitsemuksellisia ominaisuuksia kuten esimerkiksi voimakas viskositeetti suhteellisen pienilläkin pitoisuuksilla. Lisäksi betaglukaanin viskositeetti pysyy muuttumattomana läpi laajan pH-alueen, mutta se vähenee lämpötilan noustessa. Betaglukaania voidaankin käyttää esimerkiksi suurusteena elintarviketeollisuudessa. Monet betaglukaanin fysiologiset ominaisuudet perustuvat nimenomaan sen viskositeettiin. Näitä fysiologisia ominaisuuksia ovat muun muassa plasman glukoositason alentaminen ja insuliinivasteen heikentäminen aterioinnin jälkeen, sappihappojen kuljetus suoliston alempiin osiin ja niiden vapauttaminen sekä seerumin kolesterolitason alentaminen (Butt ym., 2008).



Kuva 2.8. Betaglukaanin rakenne. (Butt ym., 2008.)

2.3.2 Avenantramidi

Kaurasta on myös löydetty ainutlaatuinen, alhaisen molekyylipainon omaavien liukoisten fenoliyhdisteiden ryhmä, avenantramidit, joita ei ole löydetty muista viljakasveista. Avenantramidit muodostavat ylivoimaisesti suurimman sitoutumattomien fenolisten antioksidanttien ryhmän kauran jyvässä. (Nie ym., 2006). Avenantramidit koostuvat antraniilihapon tai sen hydroksyloituneiden johdannaisten amidikonjugaateista sekä hydroksikanelihapoista, ja ne voidaan rakenteensa perusteella jakaa kolmeen ryhmään (Kuva 2.9). Avenantramideja pidetään tärkeimpinä fytoaleksiineina kauran puolustusmekanismeissa tiettyjä patogeenejä vastaan. Niillä on lisäksi todettu olevan antioksidanttisia, antiproliferatiivisia sekä anti-inflammatorisia ominaisuuksia (Chen ym., 2007).



	R_1	R_2	R_3	R_4
AV-A	OH	H	H	H
AV-B	OH	H	OCH_3	H
AV-C	OH	H	OH	H
Tranilast™	H	H	OCH3	CH3

Kuva 2.9. Avenantramidien ja Tranilastin rakenne. (Mukaillen Chen ym., 2007.)

2.3.3 Tranilast

Tranilast (*N*-(3’,4’-dimetoksisinnamonyyli)-antraniilihappo) on avenantramidista synteettisesti johdettu lääkeaine, jonka farmakologiset ominaisuudet esiteltiin ensikerran jo 1970-luvulla. Sen kemiallinen rakenne poikkeaa hiukan avenantramidin rakenteesta (Kuva 2.9). Tranilastia käytettiin alun perin dermatologisten häiriöiden, kuten liikakasvuisten arpeutumien sekä keloidien hoidossa. Koska se on myös yliherkkyysreaktioita estävä lääkeaine, sitä on käytetty lisäksi allergisen nuhan, atooppisen ihotulehduksen sekä keuhkoastman hoidossa. Yliherkkyysreaktioiden estäminen perustuu Tranilastin kykyyn hillitä syöttösolujen degranulaatiota sekä histamiinin erittämistä. Viime vuosina Tranilastin vaikutuksia on tutkittu erilaisten *in vitro* - sekä *in vivo* -mallien avulla, ja tutkimukset ovat paljastaneet, että Tranilastin vaikutukset perustuvat useisiin eri mekanismeihin. Näitä mekanismeja ovat muun muassa soluväliaineen proteiinisynteesin inhibitio, solujen proliferaation rajoittaminen sekä fibroosiin johtavien tulehdusvasteiden inhibitio (Phaf & Hocher, 2004; Pae ym., 2008). Lisäksi Tranilastilla on useissa tutkimuksissa osoitettu olevan anti-inflammatorisia vaikutuksia. Se muun muassa supressoi syklo-oksigenaasi 2 -ekspressiota interleukiini 1β -stimuloiduissa fibroblasteissa (Platten ym., 2001) sekä interleukiini 6 -eritystä tuumorinekroositekijä α -stimuloiduissa endoteelisoluissa (Spiecker ym., 2002). Tranilastin anti-inflammatorisia mekanismeja ei kuitenkaan vielä täysin ymmärretä (Pae ym., 2008).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimukseni tavoitteena oli pystyttää uusia menetelmiä, joilla voitaisiin tutkia PT-gliadiinin haittavaikutuksia suolen epiteelisoluviljelmissä, Caco-2-soluissa. Lisäksi tavoitteena oli selvittää, voiko kauran avenantramidi tai siitä synteettisesti johdettu lääkeaine, Tranilast, ennaltaehkäistä tai parantaa gliadiinin aiheuttamia haitallisia muutoksia Caco-2-soluilla. Kolmantena tavoitteenani tässä tutkimuksessa oli tutkia minkälaisia vaikutuksia kauran prolamiini aveniinilla on yksinään suolen epiteelisoluviljelmissä.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Caco-2 -solujen viljely

Caco-2-soluja (HTB-37, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) viljeltiin MEM-kasvatusliuoksessa (Minimum Essential Medium, GIBCO Invitrogen, Paisley, Iso-Britannia), johon oli lisätty 20 % naudan sikiön seerumia (Fetal Bovine Serum, FBS, GIBCO Invitrogen), 50 U / ml penisilliini-streptomysiiniä (GIBCO Invitrogen), ei-välttämättömiä aminohappoja (GIBCO Invitrogen), 0,1 M natriumpyruvaattia (Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) sekä natriumbikarbonaattia (GIBCO Invitrogen). Soluja viljeltiin inkubaattorissa (Sanyo MCO-17AIC CO_2 Incubator, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japani) soluviljelyolosuhteissa (37 °C, 5 % CO_2). Solut siirrostettiin kahdesti viikossa, aina 10^4 solua / cm^2, eli 750 000 solua / soluviljelypullo (CELLSTAR® Standard Cell Culture Flask, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Saksa).

4.2 PT-gliadiini, PT-BSA ja PT-aveniini

Kokeissa käytetyt gliadiini, BSA (kontrolli) ja aveniini olivat kaikki pepsiinillä ja trypsiinillä pilkottuja (PT-gliadiini, PT-BSA ja PT-aveniini). Nämä kaikki aineet oli valmistettu Kuopion yliopiston Farmakologian ja toksikologian laitoksella, josta ne saatiin lahjana FT Jarkko Venäläiseltä. Kaikki aineet liuotettiin näännytyskasvatusliuokseen siten, että niiden lopullinen konsentraatio soluilla olisi 1 mg /ml. Näännytyskasvatusliuos oli kuten normaali kasvatusliuos, mutta se sisälsi vain 1 % FBS:ia 20 % sijaan.

4.3 Apoptoosimittaus

Soluja kasvatettiin 12-kuoppalevyllä (12 Well Cell Culture Cluster, Corning B.V. Lifesciences, Schiphol-Rijk, Alankomaat, 100 000 solua / kuoppa) 1–3 vuorokautta, jonka jälkeen ne pestiin kerran HBSS:lla ja niille vaihdettiin näännytyskasvatusliuos. Kun soluja oli inkuboitu yön yli näännytyskasvatusliuoksessa, ne altistettiin PT-BSA:lle ja PT-gliadiinille 4 tai 24 tunnin ajaksi. Sitten solut pestiin kaksi kertaa HBSS:lla ja irrotettiin kuoppalevyltä 0,25 % trypsiini-EDTA:lla (Sigma-Aldrich). Apoptoosimittauksessa käytettiin fluoresenssiin perustuvaa solujen erottelua (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). Solut värjättiin fluoresenssi-isotiosyanaatti (Fluorescence isothiocyanate, FITC) -leimatulla anneksiini V:llä ja propidiumjodidilla kaupallisen kitin (Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit, Calbiochem, EMD Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) protokollan mukaan. Apoptoottisten solujen määritykseen käytettiin virtaussytometriä (Coulter Epics XL-MCL Flow Cytometer, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Soluja laskettiin noin 5000 / näyte ja data analysoitiin EXPO 32 ADC Analysis -ohjelmalla (Applied Cytometry Systems, Sheffield, Englanti).

4.4 Proliferaatiomittaus

Proliferaatiomittausta varten soluja kasvatettiin 96-kuoppalevyllä (TC Microwell 96F, Nunc, Roskilde, Tanska, 5000, 10 000 tai 15 000 solua / kuoppa). Soluille vaihdettiin näännytyskasvatusliuos vuorokauden kuluttua siirrostuksesta. Kun soluja oltiin inkuboitu yön yli näännytyskasvatusliuoksessa, ne altistettiin ensin menetelmän optimoimiseksi PT-gliadiinille, PT-BSA:lle sekä pelkälle näännytyskasvatusliuokselle (kontrolli). Vuorokauden kuluttua altistuksesta elävien solujen määrä näytteissä määritettiin kaupallisen kitin (CellTiter 96® AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA) ohjeen mukaan. Kolorimetrinen määritys tehtiin aallonpituudella 492 nm (51118300 Multiskan Ascent®, 230 V, Thermo Labsystems, Helsinki, Suomi).

4.5 Avenantramidi ja Tranilast

Avenantramidi saatiin lahjana ETT Tuula Sontag-Strohmilta Helsingin yliopiston elintarviketeknologian laitokselta. Avenantramidin (100 mg / ml) laimennusliuos oli 0,1 % kaliumsorbaatti liuotettuna 50 % vesi-glyseroliliuokseen. Avenantramidin loppukonsentraatio soluilla oli 5 µg / ml. Tranilast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) laimennettiin dimetyylisulfoksidiin (dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich) pitoisuuteen 10 mg / ml. Tranilastin konsentraatio epiteelisolukerroksen läpäisevyyttä määrittävissä kokeissa oli 100 µg / ml ja kalvoröyhelökokeissa 10, 50 ja 100 µg / ml. Tranilastin ja avenantramidin vaikutuksia tutkittiin altistamalla solut ensin joko Tranilastille tai avenantramidille ja 24 tuntia myöhemmin PT-gliadiinille sekä siten, että solut altistettiin PT-gliadiinille ja Tranilastille tai avenantramidille yhtä aikaa.

4.6 Epiteelisolukerroksen läpäisevyyden määritys

4.6.1 Transepiteelisen resistanssin määritys

Soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyllä (Multidish 24 Wells, Nunc, Roskilde, Tanska), jossa solut kasvoivat irrallisissa kupeissa puoliläpäisevän kalvon päällä (Millicell Culture Plate Inserts, Millipore Corporate, Billerica, MA, USA, 100 000 solua / kuppi). Kasvatusliuosta pipetoitiin sekä kuppiin että sen ulkopuolelle. Soluja kasvatettiin niin kauan, kunnes niiden transepiteelinen resistanssi oli yli 1000 ohmia/cm^2. Resistanssia mitattiin pinsettielektrodimittarilla (Millicell-ERS, Millipore Corporate).

Kun solujen transepiteelinen resistanssi ylitti 1000 ohmia/cm^2, solut pestiin kerran HBSS:lla, jonka jälkeen niille vaihdettiin näännytyskasvatusliuos ja kasvatusta jatkettiin yön yli. Tämän jälkeen ne joko altistettiin ensin tutkittavalle aineelle ja vasta 24 h myöhemmin PT-gliadiinille, tai ne altistettiin tutkittavalle aineelle ja PT-gliadiinille samanaikaisesti. Transepiteelista resistanssia mitattiin ensin puolen tunnin ja tunnin kuluttua PT-gliadiini-altistuksesta, ja tämän jälkeen tunnin välein viiteen tuntiin saakka. Jokaisesta käsittelystä tehtiin kaksi rinnakkaista määritystä ja koe toistettiin ainakin kahdeksan kertaa.

4.6.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus

FITC-dekstraani -virtausmittaus tehtiin rinnakkain transepiteelisen resistanssin määrityksen kanssa. Kun solut altistettiin PT-gliadiinille, niille pipetoitiin samanaikaisesti myös FITC-dekstraania (Fluorescent Isothiosyanate Dextran, 4 kDa, Sigma-Aldrich), jonka loppukonsentraatio soluilla oli 1 mg / ml. Irtokupin ulkopuolella olevasta kasvatusliuoksesta otettiin 100 µl:n näyte 96-kuoppalevylle, josta mitattiin fluoresenssi (Victor^2 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer/Wallac oy, Turku). Mittaukset tehtiin samoissa aikapisteissä kuin yllä ja koe toistettiin ainakin kahdeksan kertaa.

4.7 Kalvoröyhelöiden määritys

Soluja kasvatettiin 8-kuoppalaseilla (BD Falcon™ 8 Chamber Polystyren Vessel Tissue Culture Treated Glass Slide, BD Biosciences, Erembodegem, Belgia, 20 000–50 000 solua / kuoppa). Kolmen vuorokauden kuluttua siirrostamisesta soluille vaihdettiin näännytyskasvatusliuos ja kasvatusta jatkettiin yön yli. Tämän jälkeen ne joko altistettiin ensin tutkittavalle aineelle ja vasta 24 h myöhemmin PT-gliadiinille, tai ne altistettiin tutkittavalle aineelle ja PT-gliadiinille samanaikaisesti. Vuorokauden kuluttua PT-gliadiinialtistuksesta solut fiksattiin inkuboimalla niitä 10 minuutin ajan 4 % paraformaldehydissä (Merck). Solut permeabilisoitiin inkuboimalla niitä 10 minuuttia Triton-X100:ssa (Sigma-Aldrich), jonka jälkeen ne pestiin PBS:lla (1 x Phosphate-buffered Saline). Sitten solut värjättiin FITC-leimatulla falloidiinilla (15 min, 1:300, Phalloidin-Fluorescein Isothiocyanate, Sigma-Aldrich). Lopulta pesujen jälkeen solut pedattiin (Vectashield Mounting medium for Fluorescence with DAPI, Vector Laboratories Inc., Peterborough, Englanti) ja päälle asetettiin peitinlasi (Mentzel-Gläser, Braunschweig, Saksa). Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista määritystä ja koe toistettiin ainakin kolme kertaa.

Näytteet analysoitiin mikroskooppisesti (BX60, Olympus, Hampuri, Saksa) ottamalla viisi kuvaa joka kuopasta. Kuvista mitattiin sitten solulautan reunan pituus sekä reunalla esiintyvien kalvoröyhelöiden pituudet erillisellä analysointiohjelmalla (AnalySIS, Olympus Soft Imaging System GmbH, Münster, Saksa). Lopuksi määritettiin kalvoröyhelöiden kokonaispituuden prosentuaalinen osuus koko solulautan reunan pituudesta.

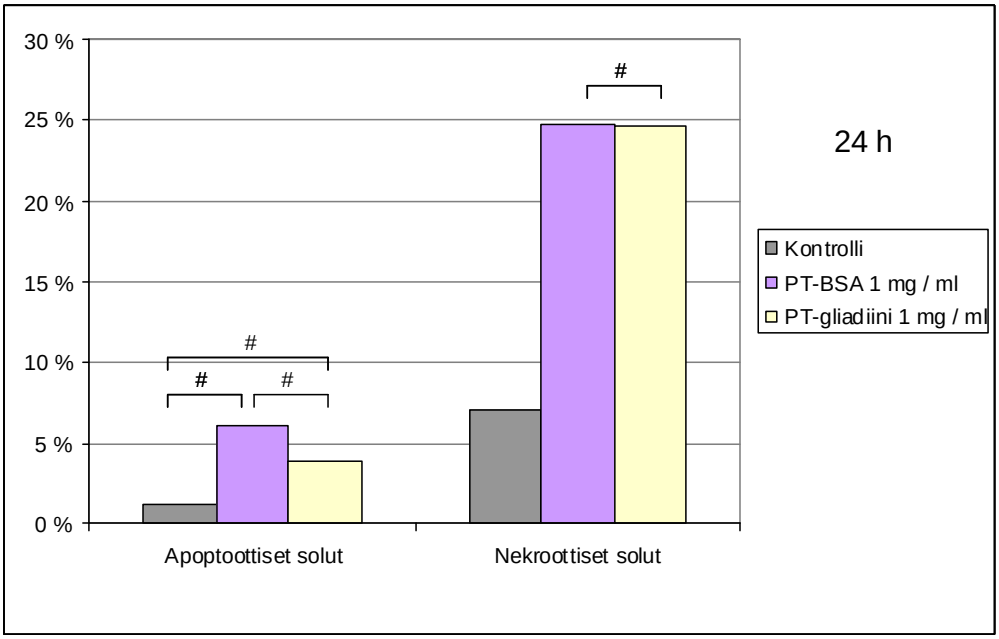
4.8 Tilastollinen analyysi

Tilastollista merkittävyyttä arvioitiin käyttämällä Mann-Whitneyn u-testiä. Ero näytteiden välillä oli tilastollisesti merkittävä, kun $p < 0,05$. Tulokset on esitetty kuvissa keskiarvoina ja kokeesta riippuen on ilmoitettu myös joko keskihajonnat tai keskiarvon keskivirheet (standard error of the mean, SEM) sekä p-arvot.

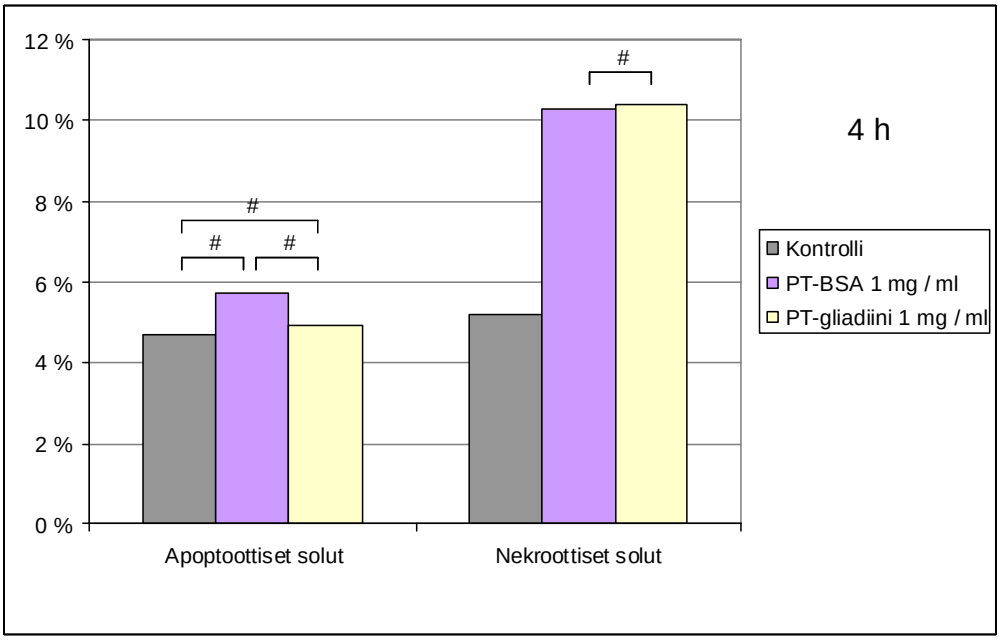
5 TULOKSET

5.1 Apoptoosimittaus

Caco-2-solujen apoptoosia tutkittiin kaupallisen kitin, Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit, ja FACS-menetelmän avulla. Menetelmää optimoitiin ensin vain kontrolli-, PT-BSA- ja PT-gliadiininäytteillä. PT-gliadiini ei lisännyt apoptoottisten solujen määrää näytteissä tilastollisesti merkittävästi verrattuna PT-BSA- ja kontrollinäytteeseen (kuvat 5.1 ja 5.2). 24 h PT-gliadiinialtistuksen jälkeen apoptoottisten solujen määrä näytteissä oli kuitenkin jonkin verran suurempi kuin kontrollissa. Sen sijaan PT-gliadiini ja PT-BSA molemmat lisäsivät merkittävästi nekroottisten solujen määrää näytteissä verrattuna kontrolliin sekä neljän että 24 tunnin altistuksen seurauksena. PT-gliadiini ja PT-BSA eivät tosin eronneet toisistaan tässäkään tapauksessa, vaan ne lisäsivät nekroottisten solujen määrää yhtä paljon. Koska PT-BSA- ja PT-gliadiininäytteiden välille ei tullut riittävää eroa optimoinnin yhteydessä apoptoosimittausta ei voitu käyttää varsinaisten näytteiden analysoimiseen. Syitä tähän on esitetty pohdintaosiossa.



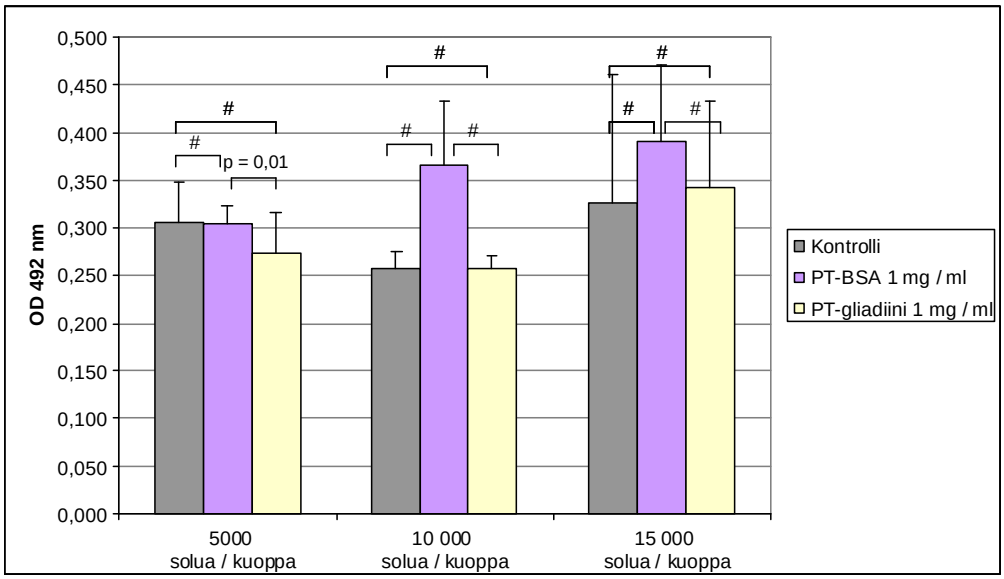
Kuva 5.1. Apoptoottisten ja nekroottisten solujen keskimääräiset prosentti-osuudet Caco-2-solunäytteissä, kun solut altistettiin tutkittaville aineille 24 h ajaksi. Pylväät esittävät keskiarvoja. # $p > 0,05$.



Kuva 5.2. Apoptoottisten ja nekroottisten solujen keskimääräiset prosentti-osuudet Caco-2-solunäytteissä, kun solut altistettiin tutkittaville aineille 4 h ajaksi. Pylväät esittävät keskiarvoja. # $p > 0,05$.

5.2 Proliferaatiomittaus

Caco-2-solujen proliferaatiota tutkittiin kaupallisen kitin (CellTiter 96® AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) avulla. Kitin avulla on mahdollista määrittää elävien solujen määrä näytteessä kolorimetrisesti, aallonpituudella 492 nm. Menetelmää optimoidessa kontrolli-, PT-BSA- ja PT-gliadiininäytteet eivät kuitenkaan eronneet riittävästi toisistaan (kuva 5.3). Ainoa tilastollisesti merkittävä ero oli PT-BSA- ja PT-gliadiininäytteiden välillä, kun soluja oli lähtötilanteessa 5000 / kuoppa, mutta tulos oli ennakko-oletusten vastainen, koska soluja oli PT-gliadiininäytteessä PT-BSA-näytettä vähemmän. Asiaa on käsitelty tarkemmin pohdintaosiossa.



Kuva 5.3. Elävien solujen määrä (suoraan verrannollinen optiseen tiheyteen) Caco-2-solunäytteissä 24 h kuluttua tutkittavien aineiden lisäämisestä, kun näytteissä oli Caco-2-soluja lähtötilanteessa 5000, 10 000 tai 15 000 / kuoppa. Kuvassa pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskihajontoja. # $p > 0,05$.

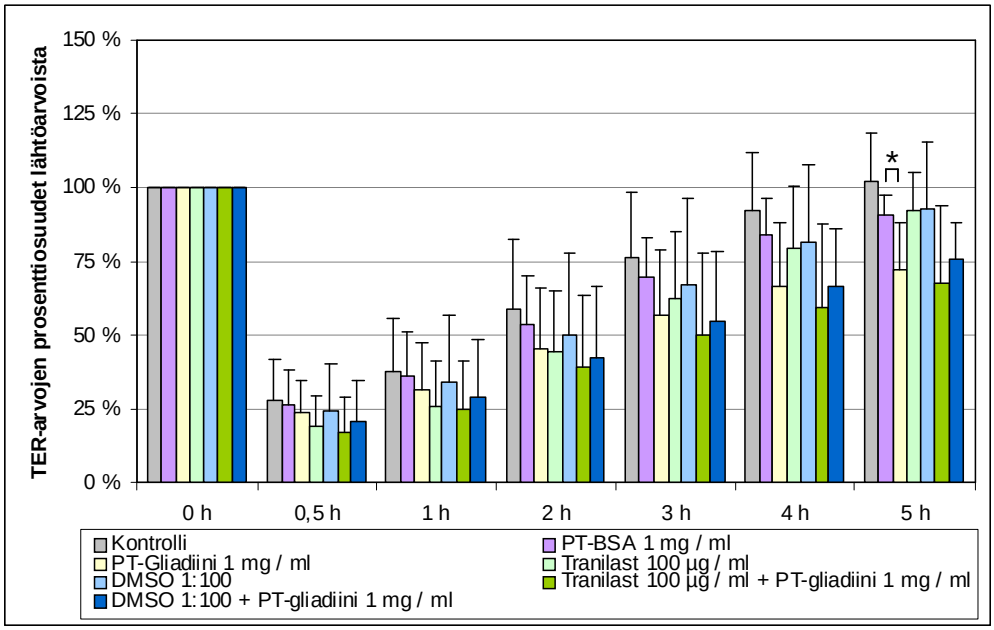
5.3 Epiteelisolukerroksen läpäisevyyden määritys

5.3.1 Transepiteelisen resistanssin määritys

5.3.1.1 PT-gliadiini ja Tranilast

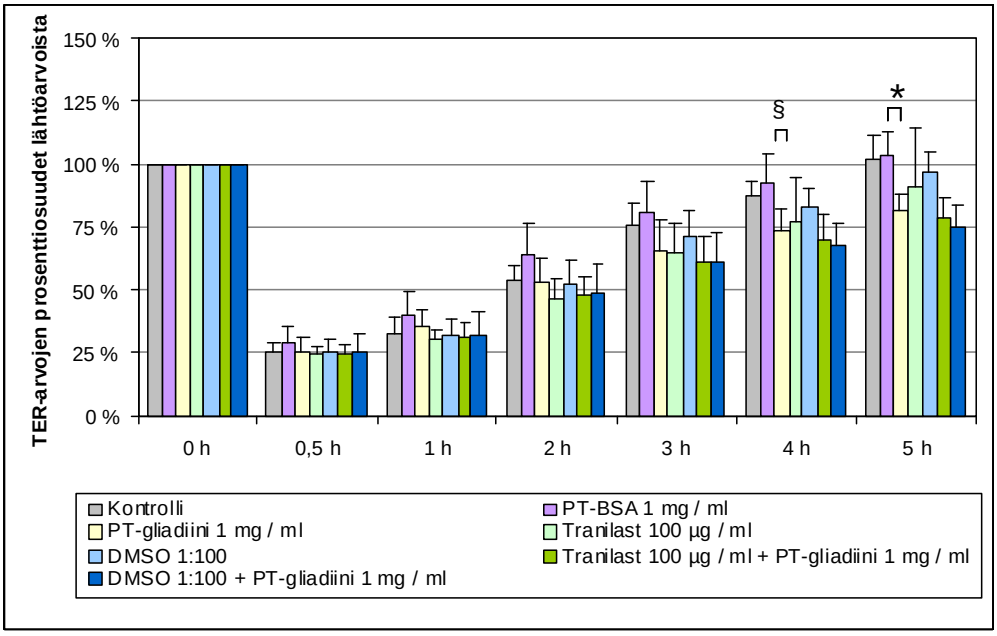
Jokaisessa kokeessa kaikkien näytteiden TER-arvot putosivat alle puoleen lähtötilanteesta jo puolen tunnin kuluttua kokeen alkamisesta, jolloin soluille oli vaihdettu testattavat aineet liuotettuina näännytyskasvatusliuokseen. Myös kontrollien (pelkkä näännytysmedium ja PT-BSA) TER-arvot laskivat. Ajan kuluessa solut alkoivat kuitenkin pikkuhiljaa toipua ja TER-arvot olivatkin näännytysmedium- ja PT-BSA-kontrollissa palautuneet lähtötasolle viimeistään viiden tunnin kuluttua. Gliadiininäytteiden TER-arvot palautuivat selkeästi hitaammin, ja jäivät merkittävästi alle PT-BSA-kontrollin kokeen loppuessa.

Kuvassa 5.4 nähdään TER- kokeen tulokset eksperimenteistä, joissa Tranilast ja laimennusliuos DMSO on pipetoitu soluille 24 h ennen PT-gliadiinialtistusta. PT-gliadiinin ja PT-BSA:n välille tuli tilastollisesti merkittävä ero viiden tunnin kohdalla. Tranilast ei ollut soluille haitallista, mutta se ei kuitenkaan auttanut ennaltaehkäisemään PT-gliadiinin haitallisuutta.



Kuva 5.4. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus transepiteeliseen resistanssiin Caco-2-solulinjalla kun solut altistettiin Tranilastille 24 h ennen PT-gliadiini-altistusta. Kuvassa pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskihajontoja.
* p = 0,003.

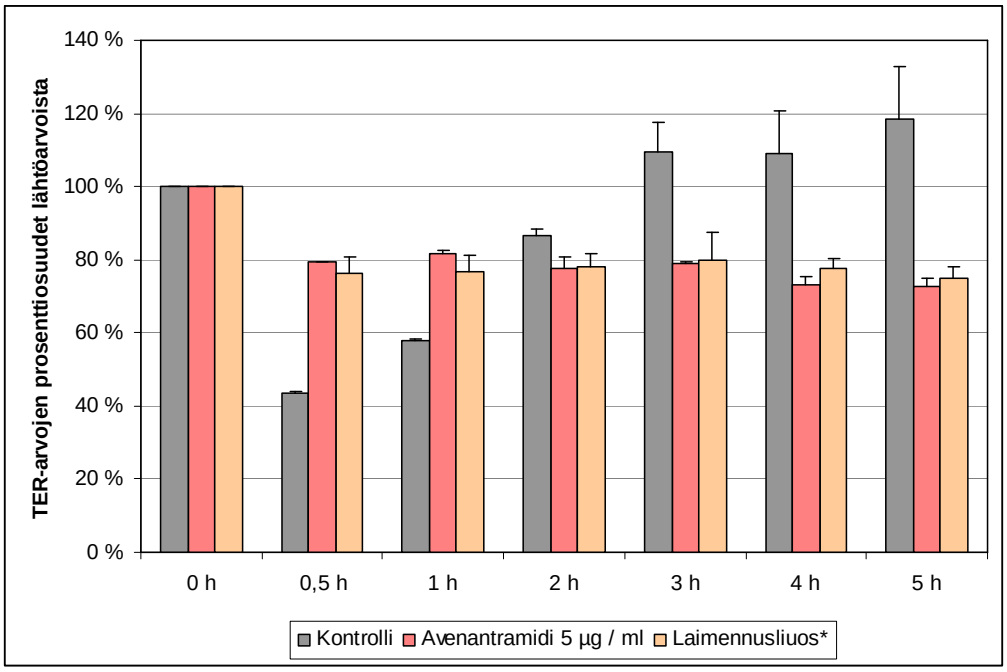
Kuvassa 5.2 on esitetty tulokset TER-eksperimenteistä, joissa Tranilast ja PT-gliadiini pipetoitiin soluille yhtä aikaa. Tulokset ovat samankaltaisia verrattuna eksperimentteihin, joissa soluille pipetoitiin Tranilast etukäteen. Tässäkin tapauksessa PT-gliadiini oli soluille haitallinen, mutta tilastollisesti merkittävä ero PT-BSA:iin oli nähtävissä jo neljän tunnin kuluttua altistuksesta. Tämäkin koe osoitti, ettei Tranilast yksinään ollut soluille myrkyllistä, mutta se ei myöskään auttanut torjumaan PT-gliadiinin myrkyllisyyttä.



Kuva 5.5. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus transepiteeliseen resistanssiin Caco-2-solulinjalla kun solut altistettiin Tranilastille ja PT-gliadiinille samanaikaisesti. Kuvassa pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskihajontoja.
* p = 0,001; § p = 0,002.

5.3.1.2 PT-gliadiini ja avenantramidi

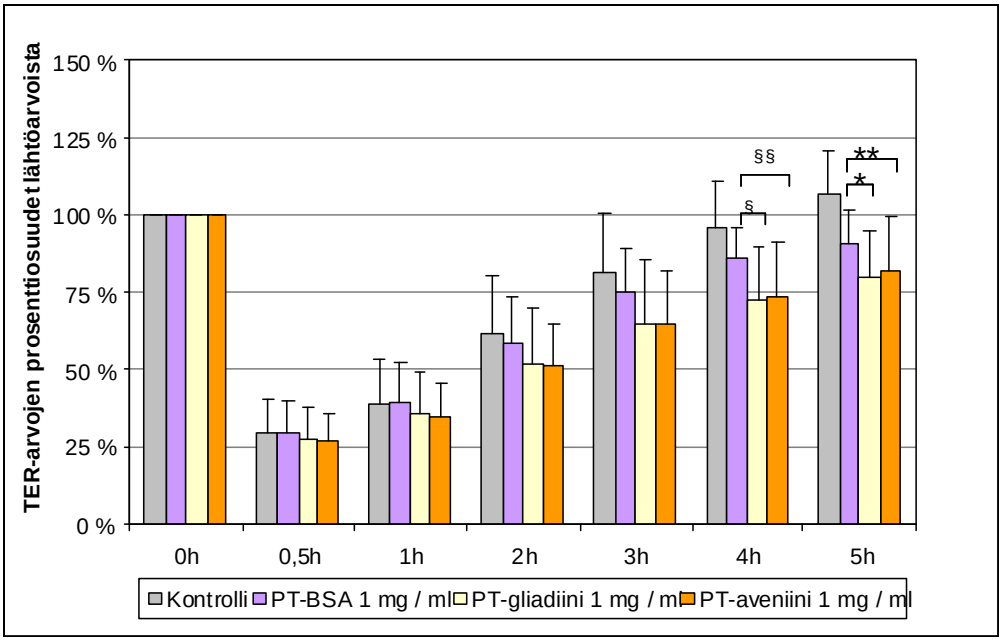
Avenantramidia testattiin ensin eksperimentissä, jossa näytteinä olivat pelkkä avenantramidi sekä sen laimennusliuos, 0,1 % kaliumsorbaatti liuotettuna 50 % vesi-glyseroliliuokseen. Tämän kokeen tulokset on esitetty kuvassa 5.6. Avenantramidi- sekä laimennusliuosnäytteiden TER ei laskenut kuten muiden näytteiden TER 0,5 h kuluttua eksperimentin aloittamisesta, vaan laskua oli ainoastaan 20 % lähtöarvoista. Lisäksi TER pysytteli näiden näytteiden osalta samalla tasolla (noin 80 % lähtöarvoista) koko kokeen ajan.



Kuva 5.6. Avenantramidin vaikutus transepiteeliseen resistanssiin Caco-2-solulinjalla. Kuvassa pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskihajontoja.
* 0,1 % kaliumsorbaatti liuotettuna 50 % vesi-glyseroliliuokseen.

5.3.1.3 PT-aveniini

PT-aveniinieksperimenttien tulokset on esitetty kuvassa 5.7. Näissä kokeissa PT-aveniini haittasi transepiteelisen resistanssin palautumista yhtä voimakkaasti kuin PT-gliadiini. Näiden kahden näytteen välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa, kun taas molemmat erosivat merkittävästi PT-BSA:sta.

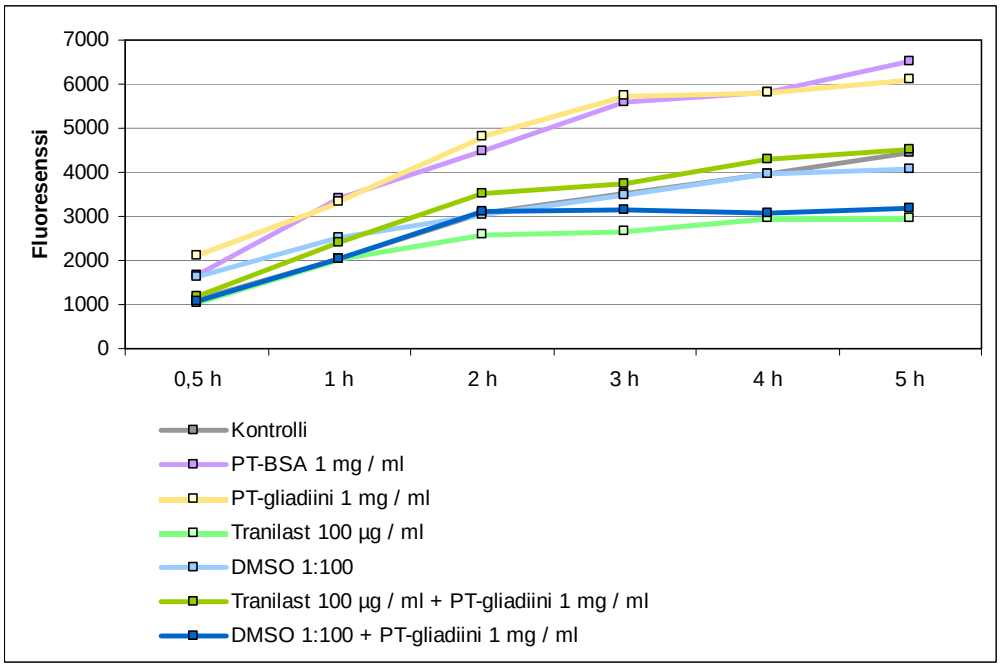


Kuva 5.7. PT-aveniinin vaikutus transepiteeliseen resistanssiin Caco-2-solulinjalla. Kuvassa pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskihajontoja. § = 0,017; §§ = 0,021; * p = 0,007; ** p = 0,016.

5.3.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus

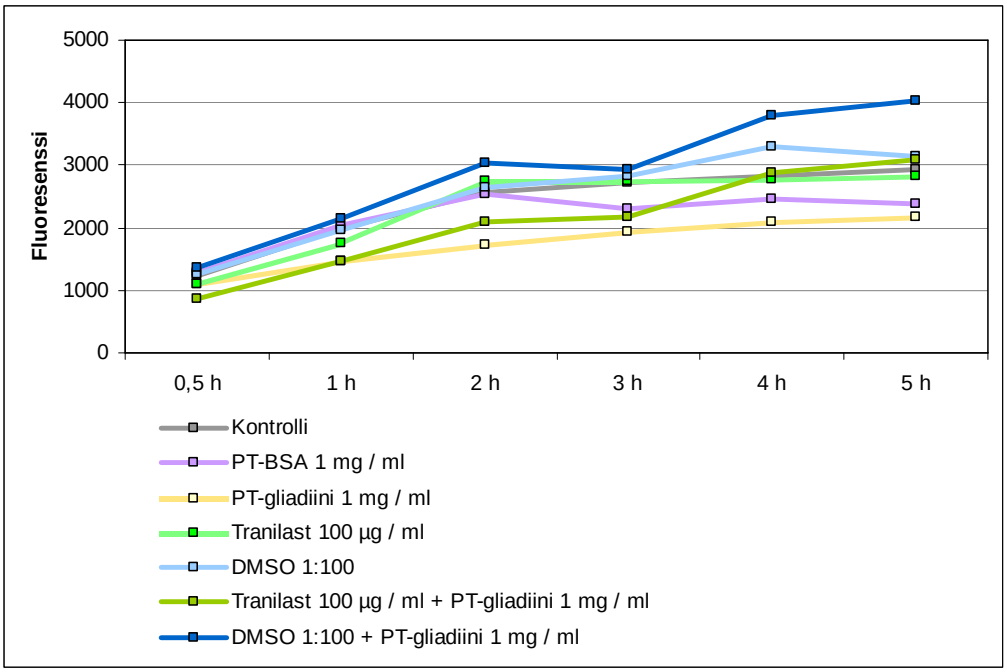
5.3.2.1 PT-gliadiini ja Tranilast

FITC-dekstraanin parasellulaarinen virtaus eksperimenteissä, jossa solut altistettiin Tranilastille 24 h aiemmin PT-gliadiinia, näkyy kuvassa 5.8. PT-gliadiini aiheutti parasellulaarisen FITC-dekstraanivirtauksen lisääntymistä huomattavasti verrattuna kontrolliin, muttei PT-BSA:han. Tranilast ja sen laimennusliuos DMSO molemmat ehkäisivät PT-gliadiinin aiheuttamaa lisääntyvää parasellulaarista FITC-dekstraanivirtausta. Koska näytteiden välinen vaihtelu oli suurta, erot eivät olleet merkitseviä.



Kuva 5.8. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus parasellulaariseen FITC-dekstraanivirtaukseen Caco-2-solulinjalla kun solut altistettiin Tranilastille 24 h ennen PT-gliadiinialtistusta. Kuvassa on keskiarvot.

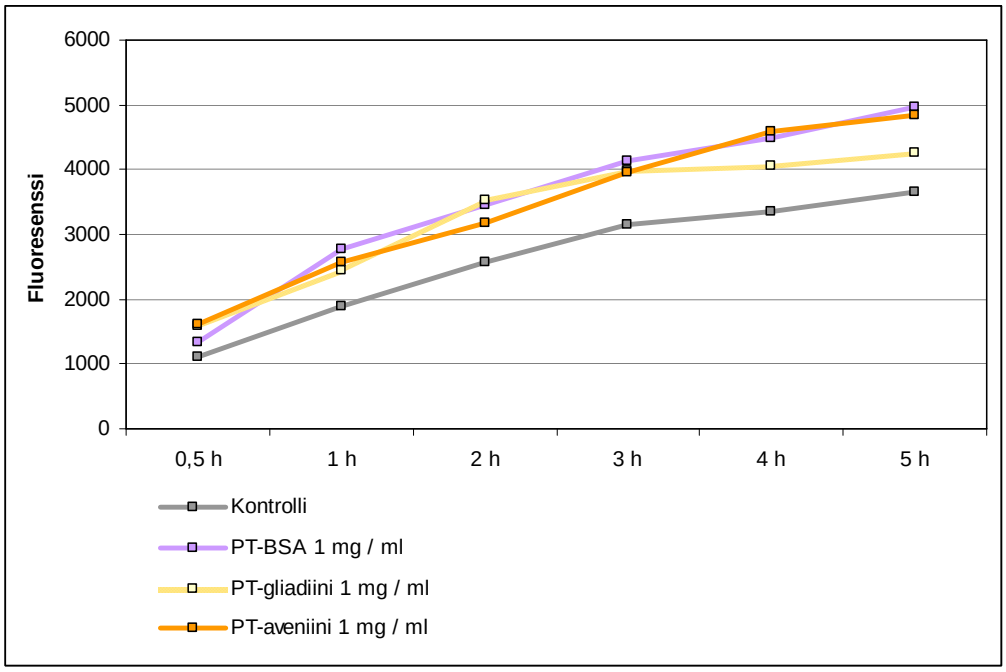
Kuvassa 5.9 on esitetty tulokset FITC-dekstraanivirtauskokeista, joissa Tranilast ja PT-gliadiini pipetoitiin soluille yhtä aikaa. Eri näytteiden välille ei juurikaan syntynyt eroja. DMSO + PT-gliadiini -näyte aiheutti FITC-dekstraanivirtausta hieman muita näytteitä enemmän, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä.



Kuva 5.9. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus parasellulaariseen FITC-dekstraanivirtaukseen Caco-2-solulinjalla kun solut altistettiin Tranilastille ja PT-gliadiinille yhtä aikaa. Kuvassa on keskiarvot.

5.3.2.2 PT-aveniini

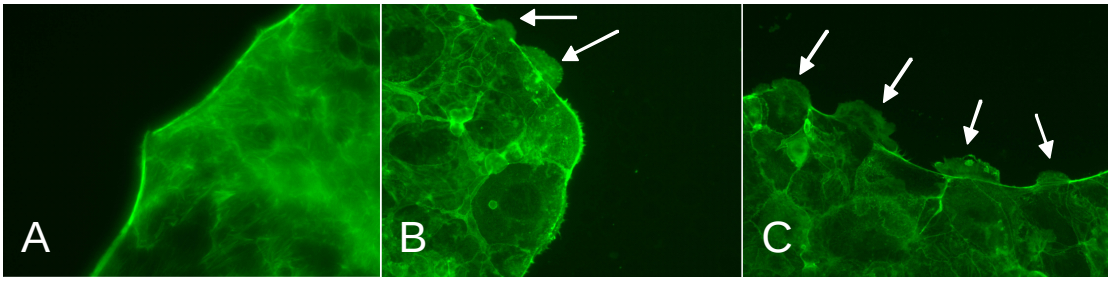
Kuvassa 5.10 on esitettynä tulokset FITC-dekstraanin parasellulaarisesta virtauksesta PT-aveniinieksperimenteissä. PT-aveniini aiheutti samantasoista FITC-dekstraanivirtausta kuin PT-gliadiini. Kuten aiemmissakin eksperimenteissä, myös PT-BSA-näytteissä virtausta tapahtui suunnilleen saman verran (erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä) kuin PT-gliadiini- ja PT-aveniininäytteissä. Kasvatusliuoskontrollinäytteissä FITC-leimattu dekstraani ei kuitenkaan siirtynyt epiteelisolukerroksen läpi yhtä tehokkaasti.



Kuva 5.10. Aveniinin vaikutus parasellulaariseen FITC-dekstraanivirtaukseen Caco-2-solulinjalla. Kuvassa on keskiarvot. n = 14.

5.4 Kalvoröyhelöiden määritys

Kalvoröyhelöiden määrittämiskokeissa PT-gliadiini aiheutti voimakkaampaa kalvoröyhelöiden muodostumista kuin pelkkä kasvatusliuoskontrolli tai PT-BSA (Kuva 5.11).

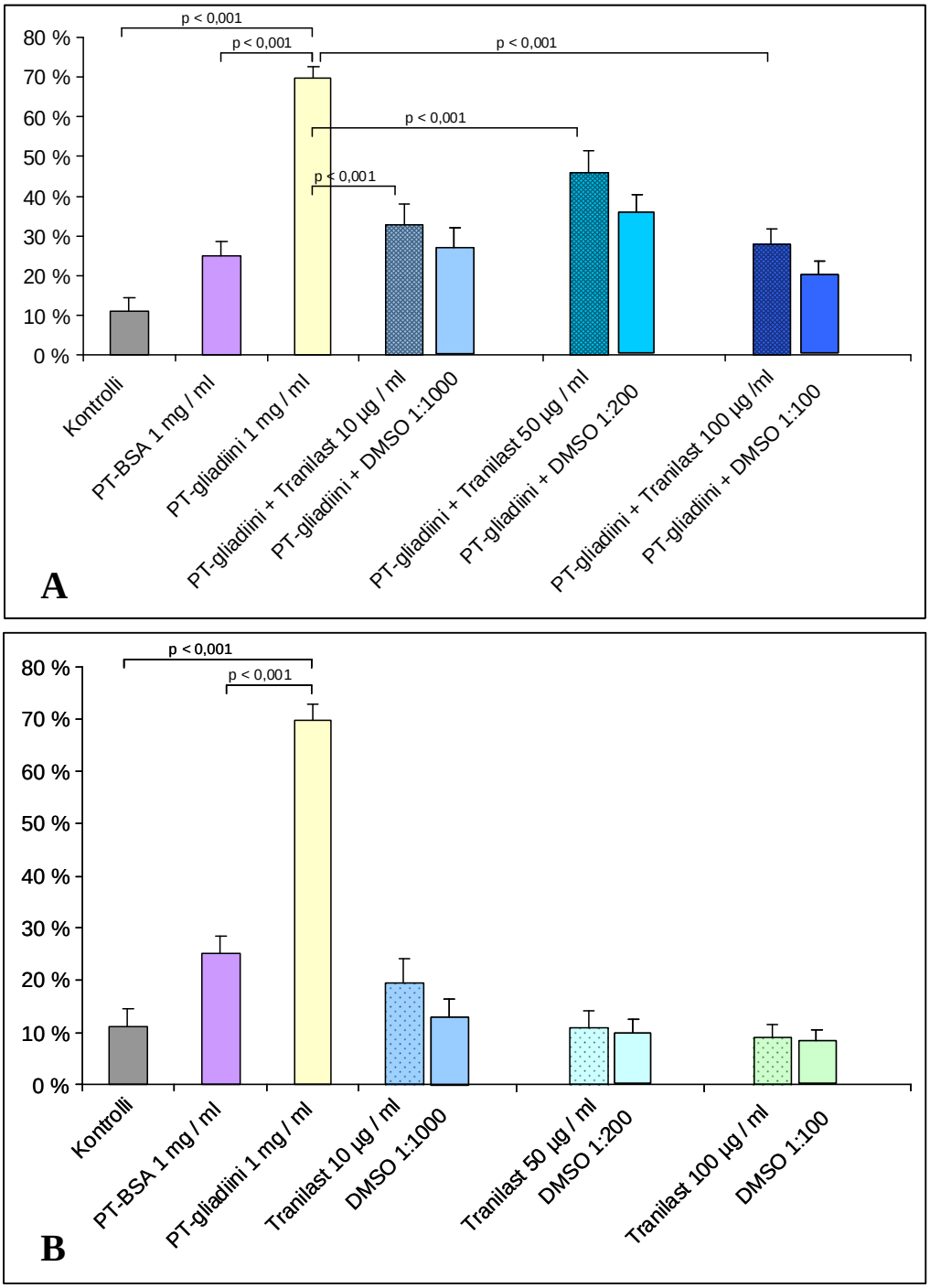


Kuva 5.11. PT-gliadiinin vaikutus kalvoröyhelöiden muodostumiseen Caco-2-solulauttojen reunoille. (A) Kontrolli; (B) PT-BSA 1 mg / ml; (C) PT-gliadiini 1 mg / ml.

5.4.1 PT-gliadiini ja Tranilast

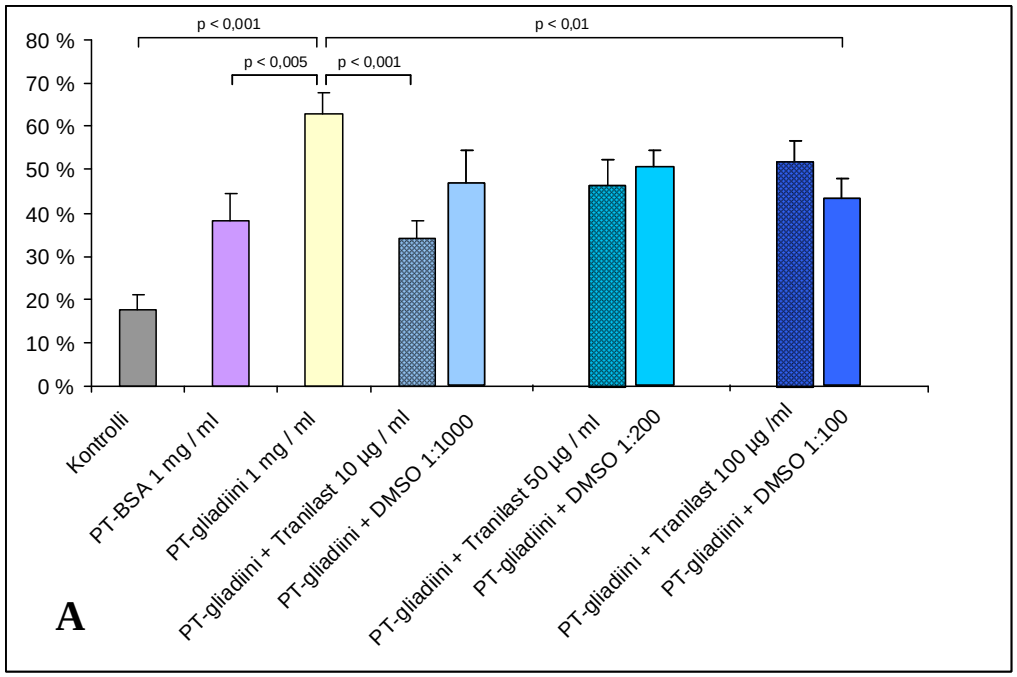
Tranilastista testattiin kolmella eri pitoisuudella, 10, 50 ja 100 µg / ml. Lisäksi kontrollinäytteiksi otettiin kolme vastaavaa pitoisuutta laimennusliuos DMSO:sta, 1:1000, 1:200 ja 1:100.

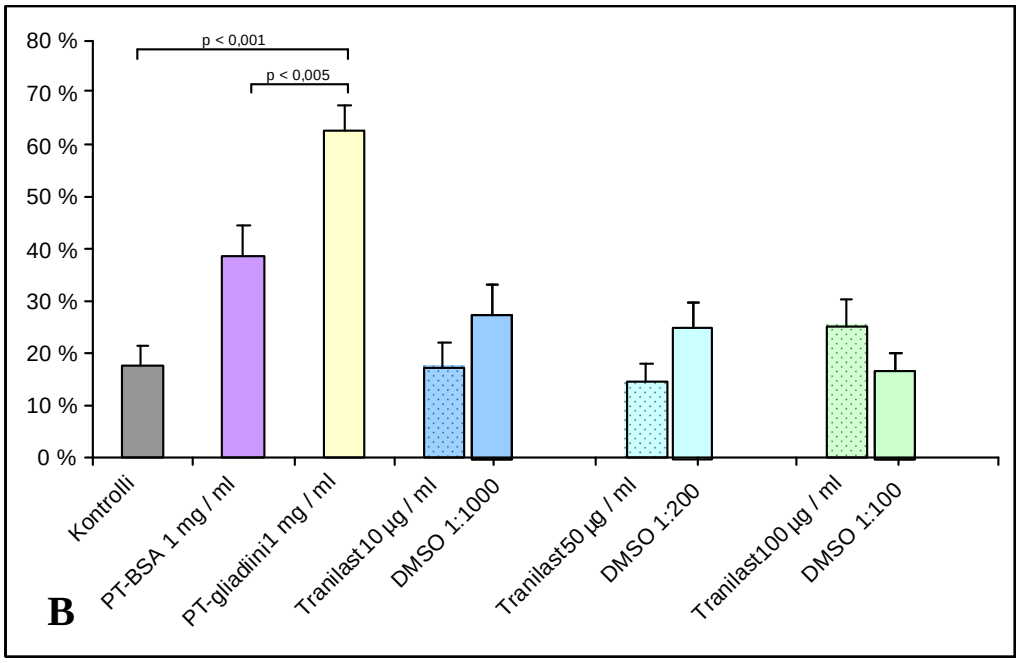
Kuvassa 5.12. on esitetty tulokset kokeista, joissa Tranilast pipetoitiin soluille 24 h ennen PT-gliadiinia. PT-gliadiini aiheutti merkittävästi lisääntynyttä kalvoröyhelöiden muodostumista solulauttojen reunoille kontrolliin ja PT-BSA:han verrattuna. PT-gliadiininäytteissä kalvoröyhelöjen osuus solulautan reunasta oli keskimäärin 70 %, kun se PT-BSA-näytteissä oli 25 % ja kontrollinäytteissä 11 %. Tranilast vähensi PT-gliadiinin aiheuttamaa kalvoröyhelöiden muodostumista tilastollisesti merkittävästi kaikilla Tranilastin pitoisuuksilla, mutta sama vaikutus oli myös DMSO:lla. Tranilast ja DMSO yksin eivät aiheuttaneet röyhelöiden muodostumista.



Kuva 5.12. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus kalvoröyhelöiden muodostumiseen Caco-2-solulinjalla, kun solut altistettiin Tranilastille 24 h ennen PT-gliadiinialtistusta. A) PT-gliadiini + Tranilast / DMSO -näytteet. B) Kontrollinäytteet. Kuvissa on esitetty kalvoröyhelöiden osuudet solulautan reunan pituudesta keskiarvoina, SEM-arvot sekä tilastollisesti merkittävät p-arvot.

Kuvassa 5.13 on esitetty tulokset kalvoröyhelöiden värjäyskokeista, joissa PT-gliadiini ja Tranilast on pipetoitu soluille yhtä aikaa. PT-gliadiini aiheutti lisääntynyttä kalvoröyhelöiden muodostumista solulauttojen reunoille. PT-gliadiininäytteissä kalvoröyhelöjen osuus solulautan reunasta oli keskimäärin 63 %, kun se PT-BSA-näytteissä oli 39 % ja kontrollinäytteissä 18 %. Tranilast vähensi PT-gliadiinin aiheuttamaa kalvoröyhelöiden muodostumista tilastollisesti merkittävästi ainoastaan pitoisuudella 10 µg / ml. DMSO näytti vähentävän kalvoröyhelöiden muodostumista pitoisuudella 1:100, tosin vähemmän kuin Tranilast pitoisuudella 10 µg / ml. Näytteet, joissa oli pelkästään Tranilastia tai DMSO:ia, jäivät kontrollin tasolle.

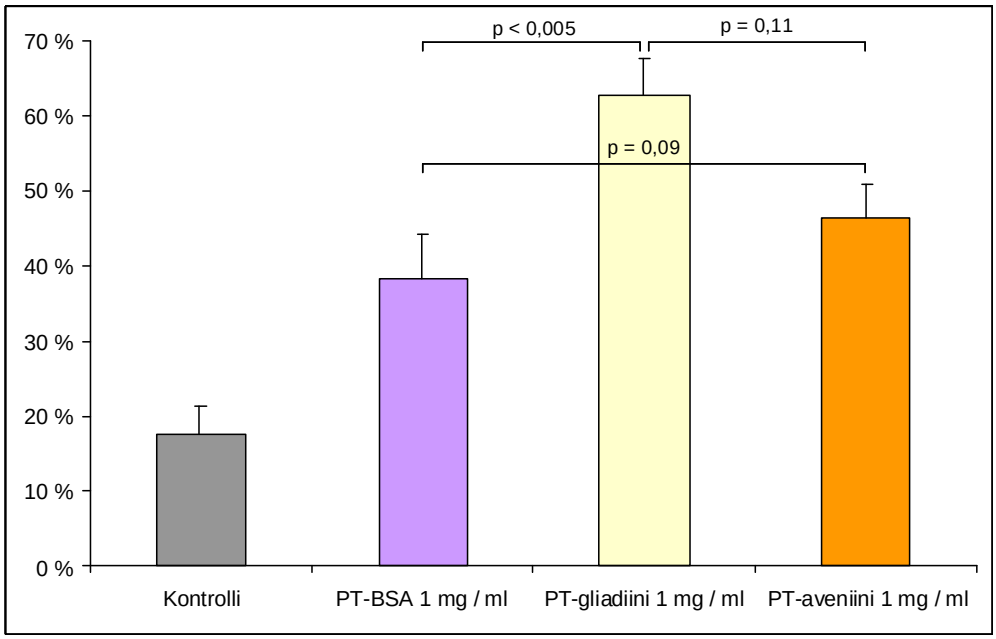




Kuva 5.13. PT-gliadiinin ja Tranilastin vaikutus kalvoröyhelöiden muodostumiseen Caco-2-solulinjalla, kun solut altistettiin PT-gliadiinille ja Tranilastille yhtä aikaa. A) PT-gliadiini + Tranilast / DMSO -näytteet. B) Kontrollinäytteet. Kuvissa on esitetty kalvoröyhelöiden osuudet solulautan reunan pituudesta keskiarvoina, SEM-arvot sekä tilastollisesti merkittävät p-arvot.

5.4.2 PT-aveniini

Tulokset kalvoröyhelöeksperimenteistä PT-aveniinilla on esitetty kuvassa 5.14. PT-aveniinin ja PT-BSA:n välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa ($p = 0,09$), vaikka prosenttiosuuksia vertaamalla pieni eroavaisuus onkin nähtävissä. Kalvoröyhelöitä muodostui keskimäärin 8 prosenttiyksikköä enemmän PT-aveniininäytteissä kuin PT-BSA-näytteissä. Näissäkin kokeissa kalvoröyhelöiden muodostuminen oli kuitenkin kaikkein voimakkainta PT-gliadiininäytteissä, joiden ero PT-aveniininäytteisiin oli keskimäärin 17 prosenttiyksikköä. Tämäkään ero ei tosin ollut tilastollisesti merkittävä p-arvon ollessa 0,11.



Kuva 5.14. PT-aveniinin vaikutus kalvoröyhelöiden muodostumiseen Caco-2-solulinjalla. Kuvassa on esitetty kalvoröyhelöiden osuudet solulautan reunan pituudesta keskiarvoina, SEM-arvot sekä p-arvot.

6 POHDINTA

6.1 Menetelmien pystytys

6.1.1 Apoptoosimittaus

Apoptoosimittaus otettiin mukaan tämän tutkimuksen menetelmiin, sillä gliadiinin on todettu lisäävän Caco-2-solujen apoptoosia *in vitro* (Giovannini ym., 2003; Mazzarella ym., 2008). Koska apoptoosin mittausta ei ollut aikaisemmin käytetty PT-gliadiinin tutkimiseen keliakiatutkimusryhmässä, menetelmää optimoitiin aluksi käyttämällä vain PT-gliadiini- ja PT-BSA-näytteitä sekä kontrolleja. PT-gliadiini ei tilastollisesti merkittävästi lisännyt apoptoottisten solujen määrää näytteissä verrattuna PT-BSA- ja kontrollinäytteeseen, vaikka apoptoottisia soluja olikin jonkin verrran enemmän PT-gliadiini- ja PT-BSA-näytteissä verrattuna kontrolliin (kuvat 5.1 ja 5.2). Tämä tulos on linjassa muiden tutkimusryhmien (esimerkiksi Giovannini ym., 2003) tulosten kanssa. Lisäksi sekä PT-gliadiini että PT-BSA lisäsivät nekroottisten solujen määrää verrattuna kontrolliin. Syy siihen, miksi PT-gliadiini- ja PT-BSA-näytteissä kuolleitten solujen määrä oli suurempi verrattuna kontrolliin, voi olla pepsiinissä ja trypsiinissä, joita PT-näytteet saattoivat sisältää pieniä määriä. Tämä selittäisi myös muiden tutkijoiden julkaisemat tulokset. Lisäksi kaikkien näytteiden käsittelyssä käytettiin trypsiiniä irrottamaan solut kuopilta kasvatuksen jälkeen. Vaikka trypsiini luonnollisesti inaktivoitiin heti kun solut olivat irronneet, oli sitä saattanut jäädä pieniä määriä näytteisiin, jolloin pitkittynyt trypsiini-inkubaatio oli voinut tappaa soluja.

6.1.2 Proliferaatiomittaus

Barone ym. (2007) ovat tutkimustensa perusteella epäilleet gliadiinipeptideillä olevan epidermaalisen kasvutekijän (epidermal growth factor, EGF) kaltaisia vaikutuksia, jotka voisivat aiheuttaa kalvoröyhelöiden muodostumisen lisäksi myös solujen proliferaatiota. Kyseistä oletusta päätettiin testata myös tässä tutkimuksessa. Proliferaatiomittauksen optimointi aloitettiin PT-gliadiini-, PT-BSA- sekä kontrollinäytteellä. Kolmen eri näytteen solumäärät eivät kuitenkaan eronneet toisistaan, vaikka optimointieksperimenttiä toistettiin. Optimointikokeita tehtiin myös eri solumäärillä lähtötilanteen suhteen, eli soluja siirrostettiin 96-kuoppalevylle 5000, 10 000 tai 15 000 solua / kuoppa. Tässäkin tapauksessa solunäytteitä kokeiltiin myös inkuboida eri aikoja näyteliuoksissa ja eksperimenttiä testattiin lisäksi jättämällä näytteiden pesuvaihe kokonaan pois. Silti eri näytteiden solumäärät pysyivät samalla tasolla. PT-gliadiini ei siis näyttänyt vaikuttavan Caco-2-solujen proliferaatioon millään tavalla. Baronen ym. työssä (2007) proliferaation lisääntymistä tosin tutkittiin ja todettiin tapahtuvan NIH3T3-fibroblasteissa sekä keliaakikkojen ohutsuolikoepaloista peräisin olevissa soluissa, jotka kummatkaan eivät välttämättä ole täysin verrattavissa Caco-2-soluihin. Toinen seikka, joka voi selittää ristiriidan tämän tutkimuksen tulosten ja Baronen hypoteesin välillä on menetelmään liittyvä. Barone ym. nimittäin tutkivat gliadiinipeptidien EGF:n kaltaisia vaikutuksia bromideoksiuridiini (bromodeoxyuridine, BrdU) -inkorporaatioanalyysin avulla. Tässä menetelmässä BrdU kiinnittyy solujen DNA:han, joten menetelmä mittaa todellisuudessa DNA:n replikaatiota. Eli jos esimerkiksi solusykli pysähtyy G2-vaiheeseen, BrdU:ta detektoidaan enemmän. Tämän tutkimuksen proliferaatiomittaus taas perustui puhtaasti solujen lukumäärään.

On myös hyvä huomioida, että solujen määrään kudoksessa tai näytteessä vaikuttavat proliferaation lisäksi niiden adheesio, eli se, kuinka hyvin ne kiinnittyvät toisiinsa ja ympäristöön, sekä apoptoosi. Joten vaikka solujen proliferaatio olisikin lisääntynyttä, voivat samanaikaisesti lisääntynyt adheesio ja apoptoosi kumota solujen lukumäärän kasvun. Tämä on luultavimmin syy proliferaatiokokeen epäonnistumiseen, sillä apoptoosimittauksen tulokset osoittivat sekä PT-BSA:n että PT-gliadiinin aiheuttavan ainakin kohtalaista apoptoosin lisääntymistä. Solujen lukumäärän määrittäminen ei siis menetelmänä ollut sopiva tutkittaessa PT-gliadiinin vaikutusta Caco-2-solujen proliferaatioon.

6.2 Avenantramidi ja Tranilast

6.2.1 Avenantramidi

Kuten tulosten esittelyn yhteydessä jo mainittiin, eksperimentit avenantramidilla eivät onnistuneet toivotulla tavalla. TER ei muuttunut ollenkaan avenantramidi- eikä sen laimennusliuosnäytteessä koko eksperimentin aikana, vaan pysytteli samalla tasolla mittauspisteestä toiseen (Kuva 5.3). Täten solujen kasvua ja hyvinvointia näissä näytteissä oli mahdotonta arvioida. Syy oli mitä todennäköisimmin liuos, johon avenantramidi oli liuotettuna. Kirjallisuudessa on viitteitä avenantramiditutkimuksista, joissa avenantramidi on liuotettu DMSO:iin (Nie ym., 2005 ja Guo ym., 2008), mutta avenantramidi, joka saatiin käyttöön tätä tutkimusta varten, oli liuotettuna 0,1 % kaliumsorbaattiliuokseen. Kaliumsorbaattiliuos oli valmistettu liuottamalla kaliumsorbaatti 50 % vesi-glyseroliliuokseen. Näin ollen glyserolin loppukonsentraatio soluilla oli 2,5 %, kun esimerkiksi Tranilastin tapauksessa DMSO:in loppukonsentraatio soluilla oli vain 1 %. Mahdollisesti juuri liian korkea glyserolipitoisuus aiheutti transepiteelisen resistanssin lukittumisen paikalleen, jolloin avenantramidin vaikutusta Caco-2-epiteelisolukerroksen läpäisevyyteen ei voitu määrittää. Valitettavasti tämän tutkimuksen aikataulun puitteissa ei ollut mahdollista saada avenantramidia liuotettuna johonkin muuhun liuottimeen, joten eksperimenttejä avenantramidilla ei voitu jatkaa.

6.2.2 Tranilast

6.2.2.1 Transepiteelisen resistanssin määritys

Caco-2-soluja kasvatettiin TER-kokeita varten aina niin kauan, kunnes solujen transepiteelinen resistanssi oli vähintään 1000 ohmia / cm^2. Sitten soluille vaihdettiin näännytyskasvatusliuos ja tästä voidaan ajatella varsinaisen eksperimentin alkaneen. Caco-2-solut eivät kuitenkaan jokaisen koekerran aikana kasvaneet samaan tahtiin, vaan 1000 ohmia / cm^2 TER-arvon saavuttamiseen kului 5-14 päivää.

Keskimäärin solut saavuttivat minimiresistanssin noin viikossa. Koska koko TER-eksperimentin suorittamiseen meni 4-5 päivää riippuen siitä, lisättiinkö soluille Tranilast etukäteen vai yhtä aikaa PT-gliadiinin kanssa, ei koetta aina pystytty aloittamaan heti kun solut saavuttivat 1000 ohmia / cm^2 resistanssin. Myös saman levyn eri kuoppien välillä saattoi olla suuria eroja transepiteelisen resistanssin kehittymisen suhteen. Tällöin solujen altistaminen näännytyskasvatusliuokselle arvioitiin sen perusteella, mikä oli keskimääräinen TER-arvo suurimmassa osassa kuoppia, ääripäät pois jättäen. Näin ollen solujen todelliset TER-arvot olivat välillä 450–3900 ohmia / cm^2 TER-kokeiden alkaessa. Tämä hajonta otettiin huomioon jakamalla jokaisen aikapisteen todellinen TER-arvo nollahetken TER-arvolla, eli sillä arvolla, joka näytteellä oli näännytyskasvatusliuoksessa inkuboimisen jälkeen, ennen tutkittavien aineiden lisäämistä. Näin eri näytteistä tuli vertailukelpoisia niiden lähtöarvoista huolimatta ja tulosten perusteella (Kuvat 5.4 ja 5.5) melko suuret erot näytteiden TER-arvoissa alkuhetkellä eivät vaikuttaneet eksperimentin onnistumiseen. Tranilast ei pelastanut TER:iä etukäteen eikä samaan aikaan PT-gliadiinin kanssa lisättynä.

6.2.2.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus

PT-gliadiinin on todettu aiheuttavan myös lisääntyvää parasellulaarista molekyylivirtausta, jota on tutkittu FITC-leimatun dekstraanin avulla (Sander ym., 2005). PT-gliadiininäytteiden FITC-dekstraanivirtaus olikin kasvatusliuoskontrolleja voimakkaampaa kaikissa muissa eksperimenteissä paitsi niissä, joissa solut altistettiin PT-gliadiinille ja Tranilastille yhtä aikaa. Tranilastin onnistui heikentää FITC-dekstraanivirtausta kokeissa, joissa se pipetoitiin soluille 24 h PT-gliadiinia aikaisemmin. Myös Sander ym. (2005) käyttivät vastaavissa eksperimenteissä kontrollina PT-BSA:ia, jonka lisääminen soluille ei aiheuttanut lisääntynyttä FITC-dekstraanivirtausta. Tässä tutkimuksessa PT-BSA kuitenkin aiheutti kaikissa eksperimenteissä vähintään yhtä voimakasta FITC-dekstraanivirtausta kuin PT-gliadiini, mikä on ristiriidassa aikaisempien tutkimusten kanssa. Lisäksi kokeet, joissa PT-gliadiini ja Tranilast pipetoitiin soluille yhtä aikaa, PT-gliadiininäytteiden Caco-2-solukerroksen läpi kulkeutui kaikkein vähiten FITC-leimattua dekstraania, joten tulokset näistä eksperimenteistä menettivät merkityksensä. Kaiken kaikkiaan FITC-dekstraanivirtauskokeiden tulokset eivät kuitenkaan kumoa TER-kokeista saatuja tuloksia, sillä tulokset näistä eri menetelmistä eivät ole täysin verrannollisia. On tärkeää huomata, että TER-menetelmä mittaa transepiteelista resistanssia,

jonka aiheuttavat epiteelisolukerroksen läpi kulkevat ionit. FITC-dekstraanimenetelmässä taas epiteelisolukerroksen läpi kulkevat fluorokromileimatut dekstraanimolekyylit, jotka ovat kooltaan (4 kDa) paljon suurempia kuin ionit, joten niiden siirtyminen tapahtuu oletettavasti eri mekanismilla. Lisäksi FITC-dekstraanikokeissa näytteiden autofluoresenssi saattoi aiheuttaa artefaktin, eikä absorbanssiarvoja voitu autofluoresenssin takia myöskään normalisoida lähtöarvoilla. Joten vaikka kaikki FITC-dekstraanieksperimentit eivät onnistuneetkaan, voidaan onnistuneiden eksperimenttien perusteella kuitenkin sanoa, että PT-gliadiini lisäsi parasellulaarista FITC-dekstraanivirtausta.

6.2.2.3 Kalvoröyhelöiden määritys

Kuten aiemmissakin tutkimuksissa on havaittu (Barone ym., 2007), PT-gliadiini aiheutti kalvoröyhelöiden muodostumista Caco-2-solulauttojen reunoille. PT-BSA-näytteissäkin kalvoröyhelöitä tosin muodostui kontrollinäytteitä enemmän, mutta PT-gliadiini lisäsi solulauttojen reunan ”röyhelöitymistä” selkeästi eniten.

Tranilast ja DMSO yksinään aiheuttivat kalvoröyhelöiden muodostumista PT-BSA-näytettä vähemmän, mikä oli luonnollisesti oletuskin. Kun soluille pipetoitiin Tranilast etukäteen, kalvoröyhelöiden muodostuminen oli kaikilla Tranilastin pitoisuuksilla tilastollisesti merkittävästi vähäisempää kuin PT-gliadiininäytteissä. Kun soluille pipetoitiin Tranilast ja PT-gliadiini yhtä aikaa, kalvoröyhelöiden voitiin huomata merkittävästi vähentyneen Tranilastin vaikutuksesta ainoastaan pitoisuudella 10 µg / ml. Tulos oli yllättävä, koska olisi ollut oletettavaa, että myös Tranilastin korkeammilla pitoisuuksilla (50 µg / ml ja 100 µg / ml) kalvoröyhelöiden osuus solulautan reunan pituudesta olisi vähentynyt ainakin saman verran, tai jopa enemmän kuin pitoisuudella 10 µg / ml. Varsinkin kun Tranilast ei yksinään näillä suuremmilla pitoisuuksilla aiheuttanut lisääntynyttä kalvoröyhelöiden muodostumista. Tälle tulokselle on hankala löytää muuta selitystä kuin että vaikutuksen on saanut aikaan Tranilastin laimennusliuos, DMSO, joka tässä näytteessä oli pitoisuudessa 1:1000. Toinen hämmentävä tulos kokeista, joissa solut altistettiin PT-gliadiinille ja Tranilastille yhtä aikaa, oli nimittäin se, että DMSO näytti tilastollisesti merkittävästi hillitsevän PT-gliadiinin aiheuttamaa kalvoröyhelöiden muodostumista pitoisuuksilla 1:1000 ja 1:100. Se, että DMSO:lla todella olisi tällainen vaikutus, on täysin hypoteesimme vastaista. Toisaalta, DMSO:lla on

raportoitu olevan paljon erilaisia farmakologisia ominaisuuksia ja vaikutuksia, liittyen muun muassa solukalvon läpäisemiseen, kalvoliikenteeseen ja anti-inflammatorisiin mekanismeihin. Lisäksi sen on myös havaittu tehostavan tai vähentävän muiden lääkkeiden vaikutuksia epäspesifisesti (Jacob & Herschler, 1986). On siis mahdollista, että DMSO:lla olisi tässä tapauksessa pieninä pitoisuuksina ollut positiivinen vaikutus Caco-2-soluihin, vaikka yleisesti ottaen se onkin suuremmilla pitoisuuksilla sytotoksinen kemikaali. Voi myös olla, että näytteiden väliset erot olisivat tulleet vielä selkeämmiksi, jos koetta olisi toistettu lisää.

6.3 PT-aveniini

6.3.1 Transepiteelisen resistanssin määritys

Tulokset kokeista, joissa tutkittiin PT-aveniinin vaikutusta TER:iin Caco-2 soluilla, olivat jokseenkin yllättäviä. PT-aveniini nimittäin näytti haittaavan solujen transepiteelisen resistanssin palautumista yhtä paljon kuin PT-gliadiini. Koska keliaakikot kuitenkin voivat käyttää kauraa gluteenittoman ruokavalion rinnalla ilman että se vahingoittaisi ohutsuolen epiteeliä, on mahdollista että jokin muu kauran ainesosa suojaa ohutsuolen epiteelisoluja aveniinin sytotoksisilta vaikutuksilta.

6.3.2 FITC-dekstraanivirtausmittaus

PT-aveniini vaikutti saman ominaisuuden valossa olevan yhtä sytotoksinen kuin PT-gliadiini. Nämä havainnot myös tukevat TER-tuloksia.

6.3.3 Kalvoröyhelöiden määritys

Vaikka TER- ja FITC-dekstraanivirtauskokeiden perusteella PT-aveniini vaikutti olevan yhtä sytotoksinen kuin PT-gliadiini, aktiinivärjäykset eivät täysin tukeneet samaa päätelmää. PT-aveniini nimittäin asettui PT-BSA:n ja PT-gliadiinin puoliväliin, kun vertailtiin näiden näytteiden vaikutusta kalvoröyhelöiden muodostumiseen Caco-2-solulauttojen reunoille. Vaikka PT-aveniini ei aiheuttanutkaan yhtä voimakasta kalvoröyhelöiden syntymistä kuin PT-gliadiini, poikkesi vaikutus silti PT-BSA-kontrollista. Kun näiden kolmen menetelmän, TER-, FITC-dekstraani- ja aktiinivärjäyskokeiden, tulokset otetaan huomioon, voidaan PT-aveniinin sytotoksisten vaikutusten Caco-2-soluilla todeta olevan PT-gliadiinin vaikutusten tasolla. TER-tulosten pohdintaosiossa mainittiin jo mahdollisuudesta, että jokin muu kauran ainesosa saattaisi suojata keliaakikkojen ohutsuolen epiteeliä aveniinin haittavaikutuksilta, koska suurin osa keliaakikoista kuitenkin voi nauttia kauraa osana gluteenitonta ruokavaliota. Toinen mahdollinen selitys voisi olla se, että kauran proteiineista aveniinia on vain 5-15 %, kun vehnän, rukiin ja ohran vastaava prolamiiniosuus on keskimäärin 50 %. Tutkijoiden kesken onkin vielä erimielisyyttä siitä, onko aveniinin toksisuudelle jokin tietty kynnysarvo kulutuksen suhteen, jolloin toksiset ominaisuudet tulisivat esiin vasta suuremmilla pitoisuuksilla tai määrillä (Garsed & Scott, 2007).

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimukseni tavoitteena oli pystyttää uusia menetelmiä, joilla voitaisiin tutkia PT-gliadiinin haittavaikutuksia suolen epiteelisoluviljelmissä, Caco-2-soluissa. Lisäksi tavoitteena oli selvittää, voiko kauran avenantramidi tai siitä synteettisesti johdettu lääkeaine, Tranilast, ennaltaehkäistä tai parantaa gliadiinin aiheuttamia haitallisia muutoksia Caco-2-soluissa. Kolmantena tavoitteenani tässä tutkimuksessa oli tutkia minkälaisia vaikutuksia kauran prolamiini aveniinilla, on yksinään suolen epiteelisoluviljelmissä.

Apoptoosi- ja proliferaatiomittaus eivät osoittautuneet toimiviksi menetelmiksi tutkittaessa PT-gliadiinin vaikutuksia Caco-2-soluilla. Apoptoosimittauksessa näytteiden mahdolliset pepsiini- ja trypsiinijäämät saattoivat itsessään aiheuttaa apoptoosia, jolloin menetelmän tulokset eivät olleet luotettavia. Proliferaatiomittaus taas ei ollut menetelmänä sopiva, koska pelkän solumäärän mittaaminen ei ottanut huomioon esimerkiksi solujen adheesiota ja apoptoosia, jotka luonnollisesti vaikuttavat solujen lukumäärään.

Avenantramidin osalta kunnollisia tuloksia ei saatu, koska todennäköisesti sen laimennusliuos aiheutti solujen epänormaalia käyttäytymistä, joka ilmeni transmembraanisen sähköisen resistanssin jämähtämisenä paikalleen. Tämän vuoksi solujen kasvua ja hyvinvointia oli mahdoton arvioida ja tutkimukset avenantramidilla jäivät kesken.

Tranilastilla ei ollut vaikutusta gliadiinin hidastamien TER-arvojen palautumiseen, eikä myöskään FITC-dekstraanivirtaukseen Caco-2-soluilla. Kalvoröyhelöiden muodostuminen näytti Tranilastia lisättäessä vähenevän tilastollisesti merkittävästi joissakin kokeissa, mutta Tranilastin pelkällä laimennusliuoksella, DMSO:lla, oli sama vaikutus. Näin ollen DMSO oli hyvin todennäköisesti vaikutuksen takana. Tranilast ei siis ennaltaehkäissyt eikä parantanut gliadiinin aiheuttamia haitallisia muutoksia Caco-2-soluissa *in vitro*.

PT-aveniinilla oli PT-gliadiinin kaltaiset vaikutukset Caco-2-solukerroksen läpäisevyyteen sekä TER- että FITC-dekstraanimenetelmällä mitattuna. Kalvoröyhelöitä muodostui PT-aveniininäytteissä kuitenkin PT-gliadiininäytteitä vähemmän. Kalvoröyhelöiden muodostuminen oli kuitenkin PT-aveniininäytteissä kontrolleja voimakkaampaa. Näiden tulosten valossa aveniini näyttäisi olevan yhtä sytotoksinen kuin gliadiini, ainakin *in vitro*. Tutkimuksia on siis vielä jatkettava, jotta löydettäisiin tekijä, joka selittää miksi kaura soveltuu keliaakikkojen ruokavalioon, eikä aiheuta vaurioita ohutsuolen epiteelisolukossa kuten muiden pääviljojen prolamiinit.

Lähdeluettelo

Barone MV, Gimigliano A, Castoria G, Paolella G, Maurano F, Paparo F, Maglio M, Mineo A, Miele E, Nanayakkara M, Troncone R, Auricchio S. Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. Gut 2007; 56:480–488.

Butt MS, Tahir-Nadeem M, Khan MKI, Shabir R, Butt MS. Oat: unique among the cereals. Eur J Nutr 2008; 47:68–79.

Catassi C, Fasano A. Celiac disease. Curr Opin Gastroenterol 2008; 24:687–691.

Chen CY, Milbury PE, Collins FW, Blumberg JB. Avenanthramides are bioavailable and have antioxidant activity in humans after acute consumption of an enriched mixture from oats. J Nutr 2007; 137:1375–1382.

Collin P, Kaukinen K, Välimäki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. Endocr Rev 2002; 23:464–483.

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. Gut 2006; 55:469–477.

Dowd B, Walker-Smith J. Samuel Gee, Aretaeus, and The Coeliac Affection. Br Med J 1974; 2:45–47.

Dubois PC, van Heel DA. Translational Mini-Review Series on the Immunogenetics of Gut Disease: Immunogenetics of coeliac disease. Clin Exp Immunol 2008; 153:162–173.

Garsed K, Scott BB. Can oats be taken in a gluten-free diet? A systematic review. Scand J Gastroenterol 2007; 42:171–178.

Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. Immunol Lett 2005; 99:141–145.

Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. Toxicology 2000; 145:63–71.

Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Varí R, D'Archivio M, Straface E, Masella R, Malorni W, De Vincenzi M. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. FEBS Lett 2003; 540:117–24.

Green PHR, Cellier C. Celiac disease. N Engl J Med 2007; 357:1731–1743.

Guo W, Wise ML, Collins FW, Meydani M. Avenanthramides, polyphenols from oats, inhibit IL-1beta-induced NF-kappaB activation in endothelial cells. Free Radic Biol Med 2008; 44:415–429.

Holm K, Mäki M, Vuolteenaho N, Mustalahti K, Ashorn M, Ruuska T, Kaukinen K. Oats in the treatment of childhood coeliac disease: a 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. Aliment Pharmacol Ther 2006; 23:1463–1472.

Hopper AD, Hadjivassiliou M, Butt S, Sanders DS. Adult celiac disease. BMJ 2007; 335:558–562.
Howdle PD. Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18:703–706.

Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of Disease: immunopathogenesis of celiac disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2006; 3:516–525.

Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. Cryobiology 1986; 1:14–27.

Janatuinen EK, Kemppainen TA, Pikkarainen PH, Holm KH, Kosma V-M, Uusitupa MIJ, Mäki M, Julkunen RJK. Lack of cellular and humoral immunological responses to oats in adults with coeliac disease. Gut 2000; 46:327–331.

Kaukinen K, Peräaho M, Lindfors K, Partanen J, Woolley N, Pikkarainen P, Karvonen AL, Laasanen T, Sievänen H, Mäki M, Collin P. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. Aliment Pharmacol Ther 2007(a); 25:1237–1245.

Kaukinen K, Collin P, Laurila K, Kaartinen T, Partanen J, Mäki M. Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. Scand J Gastroenterol 2007(b); 42:1428–1433.

Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, Wieser H, Feighery C. Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture. Gut 2003; 52:47–52.

Koskinen O, Villanen M, Korponay-Szabo I, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. Oats does not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. Painossa J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008.

Kurppa K, Collin P, Viljamaa M, Haimila K, Saavalainen P, Partanen J, Laurila K, Huhtala H, Paasikivi K, Mäki M, Kaukinen K. Diagnosing Mild Enteropathy Celiac Disease: A Randomized, Controlled Clinical Study. Painossa Gastroenterology 2009.

Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, Lohi O, Bravi E, Gasparin M, Reunanen A, Mäki M. Increasing prevalence of coeliac disease over time. Aliment Pharmacol Ther 2007; 26:1217–1225.

Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quaratino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. Mol Immunol 2005; 42:913–918.

Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Sette A, Troncone R, Gianfrani C. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. Gastroenterology 2008; 134:1017–1027.

Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quaratino S, Londei M. Interleukin 15 Mediates Epithelial Changes in Celiac Disease. Gastroenterology 2000; 119:996–1006.
Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterology 2003; 125:730–745.

Mohamed BM, Feighery C, Kelly J, Coates C, O'Shea U, Barnes L, Abuzakouk M. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. Dig Dis Sci 2006; 51:1862–1868.

Mäki M. Autoantibodies as Markers of Autoimmunity in Coeliac Disease Pathogenesis kirjassa Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease. Proceedings of the Sixth International Symposium on Coeliac Disease held at Trinity College, Dublin in July 1992. Editors: Feighery C, O'Farrelly C. Oak Tree Press 1994; 246–252.

Mäki M, Collin P. Coeliac disease. Lancet 1997; 349:1755–1759.

Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Höpfl P, Knip M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. N Engl J Med 2003; 348:2517–2524.

Mäki M, Collin P, Kekkonen L, Visakorpi J, Vuoristo M. Keliakia. Kustannus Oy Duodecim 2006.

Nie L, Wise ML, Peterson DM, Meydani M. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. Atherosclerosis 2006; 186:260–266.

Niewinski MM. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. J Am Diet Assoc 2008; 108:661–672.

Pae HO, Jeong SO, Koo BS, Ha HY, Lee KM, Chung HT. Tranilast, an orally active anti-allergic drug, up-regulates the anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression but down-regulates the pro-inflammatory cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2008; 371:361–365.

Pfab T, Hocher B. Tranilast and hypertensive heart disease: further insights into mechanisms of an anti-inflammatory and anti-fibrotic drug. J Hypertens 2004; 22:883–886.

Periolo N, Chernavsky AC. Coeliac disease. Autoimmun Rev 2005; 5:202–208.

Peräaho M, Collin P, Kaukinen K, Kekkonen L, Miettinen S, Mäki M. Oats can diversify a gluten-free diet in celiac disease and dermatitis herpetiformis. J Am Diet Assoc 2004; 104:1148–1150.

Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Mastracchio A, Silano M, De Vincenzi M. Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. Am J Clin Nutr 2001; 74:137–140.

Platten M, Wick W, Wischhusen J, Weller M. N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (tranilast) suppresses microglial inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and activity induced by interferon-gamma (IFN-gamma). Br J Pharmacol 2001; 134:1279–1284.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol Toxicol 2005; 21:1–26.

Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. FEBS Lett 2005; 579:4851–4855.

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. Science 2002; 297:2275–2279.

Shewry PR, Tatham AS, Kasarda DD. Cereal proteins and coeliac disease kirjassa Coeliac disease. Blackwell Scientific Publications 1992; 305–348.

Spiecker m, Lorenz I, Marx N, Darius H. Tranilast inhibits cytokine-induced nuclear factor κB activation in vascular endothelial cells. Mol Pharmacol 2002; 62:856–863.

Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? Gut 1997; 41:851–852.

Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex disorder. Nat Rev Immunol 2002; 2:647–655.

Troncone R, Auricchio R, Granata V. Issues related to gluten-free diet in celiac disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2008; 11:329–333.

Vilppula A, Collin P, Mäki M, Valve R, Luostarinen M, Krekelä I, Patrikainen H, Kaukinen K, Luostarinen L. Undetected coeliac disease in the elderly. A biopsy-proven population-based study. Dig Liver Dis 2008; 40:809–813.