

# **Matriksin metalloproteinaasi 8 terveillä ja sairailta**

Katriina Viola Elisabeth Niemi

Hammaslääketieteen kandidaatti

Suu- ja leukasairauksien osasto

1.painos 2020

Helsinki 19.9.2020

Syventävä tutkielma

[katriina.niemi@helsinki.fi](mailto:katriina.niemi@helsinki.fi)

Ohjaajat:

Aino Salminen, yliopistonlehtori, HLT

Pirkko Pussinen, dosentti

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

## HELSINGIN YLIOPISTO - HELSINGFORS UNIVERSITET

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty<br>Lääketieteellinen tiedekunta   |  | Laitos – Institution – Department<br>Clinicum     |  |
| Tekijä – Författare – Author<br>Katriina Viola Elisabeth Niemi   |  |   |  |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title<br>Matriksin metalloproteinaasi 8 terveillä ja sairaila   |  |   |  |
| Oppiaine – Läroämne – Subject<br>Parodontologia  |  |   |  |
| Työn laji – Arbetets art – Level<br>Syventävä tutkielma  |  | Aika – Datum – Month and year<br>19.9.2020        |  |
|  |  | Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages<br>49 + 1 |  |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract   |  |   |  |
| <p>Matriksin metalloproteinaasi 8 on kollageenia hajottava ihmisen elimistön erittämä entsyymi. Se osallistuu normaaliin kudosten muokkaamiseen ja tulehduksellisiin sairauksiin, kuten syöpään, parodontiittiin ja sydän- ja verisuonitauteihin.</p> <p>Tässä tutkimuksessa aineistona ovat Pubmedistä haetut artikkelit ja FINRISK-tutkimuksessa vuonna 1997 kerätty aineisto 8349 henkilöltä. MMP-8-pitoisuus määritettiin tutkimushenkilöiden seerumista IFMA-menetelmällä. FINRISK-tutkimusaineistoa analysoitiin IMB SPSS Statistics-ohjelman avulla.</p> <p>Tulokseksi saatiin, että seerumin matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuus on terveillä korkeampi kuin sairaila, kun tarkastellaan koko väestöä. Ikäryhmittäin tarkasteltuna ikäryhmien sisällä pitoisuus on kuitenkin sairaila korkeampi kuin terveillä. Matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuus laskee iän myötä. Erot pitoisuudessa terveiden ja sairaiden välillä pienentyvät iän myötä. Viitearvot määritettiin tässä tutkimuksessa, ja ne ovat 5,33-241,2 ng/ml kaikille, naisille 5,61-250,1 ng/ml ja miehille 4,96-217,9 ng/ml.</p> <p>Terveillä ja sairaila tupakoitsijoilla pitoisuudet ovat käytännössä samat. Tupakoinnin lopettaneilla erot pitoisuudessa ovat terveiden ja sairaiden välillä suhteellisen suuret. Henkilöillä, joilla on metabolinen oireyhtymä, on matala matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuus. Pitoisuus on tilastollisesti merkitsevästi matalampi myöhemmin puhkeavan diabeteksen suhteen. Tässä tutkimuksessa MMP-8:n pitoisuudet olivat sydän- ja verisuonisairauksia sairastavilla tutkittavilla henkilöillä matalat. Matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuus korreloi positiivisesti CRP:n ja erityisen voimakkaasti fibrinogeenin kanssa.</p> <p>Vaikuttaa siltä, että kroonisesti sairaila pitoisuudet ovat matalat, akuutissa tilanteessa pitoisuudet nousevat ja ajan kuluessa laskevat takaisin mataliksi. Tämä koskee erityisesti sydän- ja verisuonitauteja. Hypoteesi tarvitsisi lisää tutkimusta, jotta pystyisimme MMP-8:n avulla seuraamaan ja ennustamaan taudinkulkua paremmin.</p> <p>(212 sanaa)</p> |  |   |  |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords<br>MMP-8, collagenase 2, neutrophil collagenase , cardiovascular disease, diabetes, cancer   |  |   |  |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited<br>Terveystieteiden keskuskirjasto, Helda   |  |   |  |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information  |  |   |  |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Johdanto .....   | 1  |
| 2       | Kirjallisuuskatsaus .....  | 2  |
| 2.1     | Matriksin metalloproteinaasit .....                                | 2  |
| 2.1.1   | Rakenne .....  | 2  |
| 2.1.2   | Jaottelu .....   | 3  |
| 2.1.3   | Toiminta .....   | 4  |
| 2.1.4   | MMP:iden aktiivisuuden säätely .....                               | 6  |
| 2.2     | Matriksin metalloproteinaasi 8 .....                               | 7  |
| 2.2.1   | Rakenne .....  | 8  |
| 2.2.2   | Toiminta .....   | 9  |
| 2.2.3   | Seerumin matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuudet sairauksissa | 10 |
| 2.2.3.1 | Sydän- ja verisuonitaudit.....                                     | 10 |
| 2.2.3.2 | Muut sairaudet .....   | 12 |
| 3       | Tutkimuksen tavoitteet .....                                       | 14 |
| 4       | Aineisto .....   | 14 |
| 5       | Menetelmät .....   | 15 |
| 5.1     | Biokemialliset mittaukset .....                                    | 15 |
| 5.2     | Tilastollinen analyysi .....                                       | 15 |
| 6       | Tulokset .....   | 17 |
| 7       | Pohdinta .....   | 30 |
| 8       | Yhteenveto .....   | 37 |
|         | Lähdeluettelo .....  | 39 |

# 1 Johdanto

MMP-8 on merkittävä biomarkkeri ihmiskehossa. Tässä tutkielmassa kerromme matriksin metalloproteinaasi 8:sta ja myös matriksin metalloproteinaaseista yleisesti. Luku 2 on kirjallisuuskatsaus ja luvuissa 3-8 kerrotaan FINRISK 1997 kohorttiin pohjautuvasta tilastollisesta tutkimuksestamme. Tutkielman tavoitteena on selvittää, miten demografiset eli väestötieteelliset muuttujat, fyysisen aktiivisuuden määrä, tupakointitottumukset, lihavuus, verenpaine, lääkitykset, diabetes, verensokeri ja inflammaatiomarkkerit, kuten CRP, yhdistyvät MMP-8-pitoisuuteen ja määrittää viitearvot seerumin MMP-8:lle.

Kirjallisuuskatsauksessa kerrotaan ensin yleisesti matriksin metalloproteinaasien rakenteesta, jaottelusta, toiminnasta ja toiminnan säätelystä luvussa 2.1. Sitten kerrotaan matriksin metalloproteinaasi 8:sta eli sen rakenteesta, toiminnasta ja seerumipitoisuudesta eri sairauksissa luvuissa 2.2.

Tämän jälkeen kerrotaan tutkielman tavoitteista luvussa 3, aineistostamme luvussa 4, biokemiallisista ja tilastollisista menetelmistä luvussa 5, tuloksista luvussa 6 ja luku 7 on pohdinta tuloksista. Lopuksi on luku 8 eli yhteenveto tuloksista ja viimeisenä lähdeluettelo viitteistä.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Matriksin metalloproteinaasit

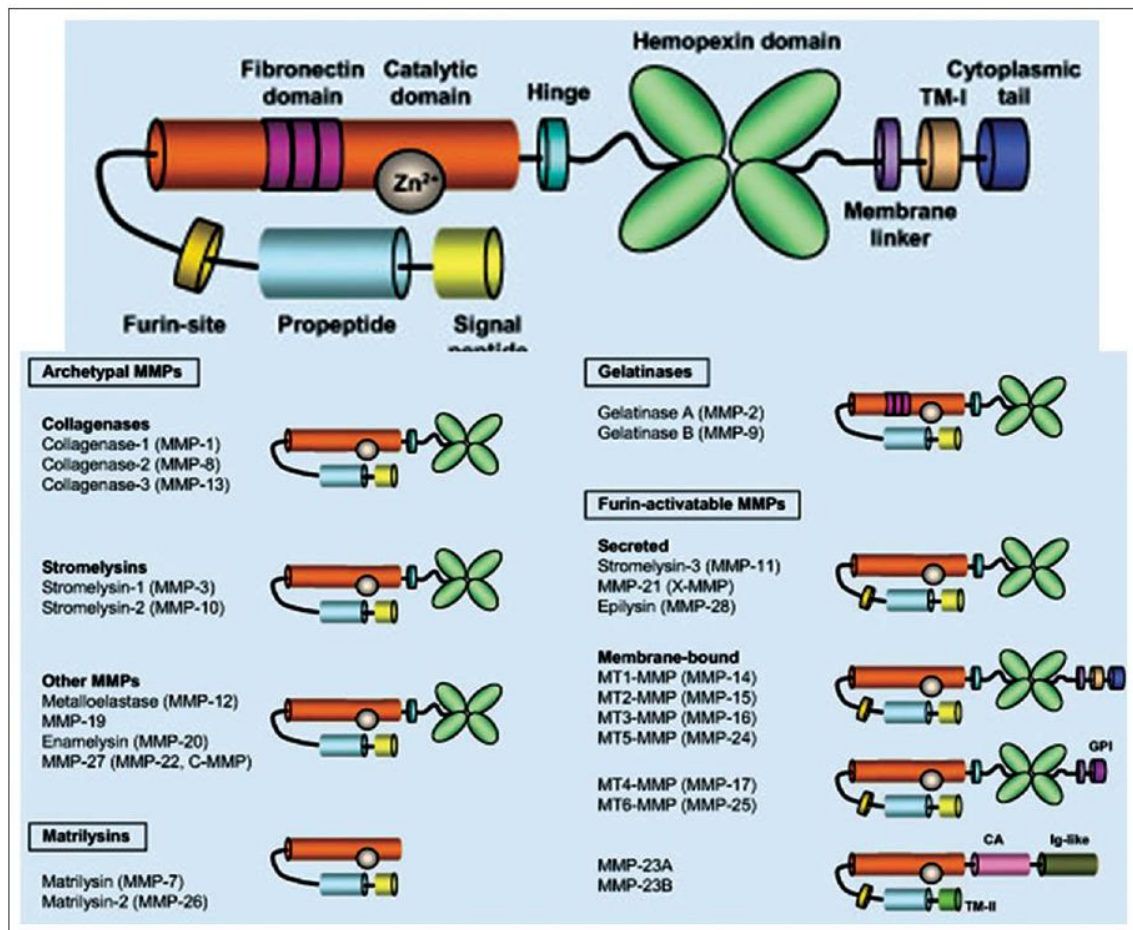
#### 2.1.1 Rakenne

Matriksin metalloproteinaasit eli MMP:t ovat rakenteeltaan samankaltaisten 25 endoproteinaasin ryhmä ja niiden aktiivisessa kohdassa on sinkki-ioni  $Zn^{2+}$ , jonka toiminnasta ne ovat riippuvaisia (1,2). Selkärankaisilta on löydetty 24 erilaista MMP:tä, ja niistä 23 on löydetty ihmiseltä (3). MMP:t syntetisoidaan inaktiivisina proentsyymeinä eli entsyymien esiasteina eli tsymogeeninä, jotka vaativat aktivoinnin (4). MMP:n inaktiivisessa perusrakenteessa on hemopeksiini-osa, proliinirikas (5) sarana-alue, katalyyttinen osa ja pro-domeeni eli yhteen laskostuneen polypeptidiketjun osa (6). Inaktiivisessa muodossa katalyyttisen osan sinkki on sitoutunut pro-domeenin kysteiniiniin (6). Aktivoituminen tapahtuu, kun pro-domeeni on poistettu, jolloin aktiivinen kohta paljastuu ja pystyy toimimaan katalyyttisesti (6).

MMP:n katalyyttinen osa sisältää erittäin konservoituneen eli evoluution aikana muuttumattomana säilyneen sinkkiä sitovan kohdan, HEXXHXXGXXH, jossa on kolme histidiiniä (H) sitoutuneena sinkin aktiiviseen kohtaan (2,5). Katalyyttisen osan nukleofiilinen glutamaatti (E) hajottaa substraatin peptidisidoksen (5). Hemopeksiiniosa, joka on kaikissa muissa paitsi MMP-7:ssä, on osallinen vuorovaikutukseen muiden MMP:iden ja TIMP:ien, eli kudoksen matriksin metalloproteinaasien inhibiittorien (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases), kanssa (7).

## 2.1.2 Jaottelu

MMP:itä on ihmisellä yli 20 erilaista, ja ne jakautuvat alaryhmiin (8,9). Alaryhmät ovat kollageenaasit, gelatinaasit, stromelysiinit, matrilysiinit, solukalvolla sijaitsevat MMP:t ja muut MMP:t (5,7,8). Seitsemännessä ryhmässä on metalloelastaasi eli MMP-12 (5). Jaottelu on tehty entsyymien sijainnin solussa tai kudoksessa ja substraattispesifisyyden mukaan (3). Substraattispesifisyys määräytyy yleensä MMP:iden erilaisten domeenien mukaan (5).



Kuva 1. Ihmisen MMP:iden rakenteellinen luokittelu perustuen domeenien järjestäytymiseen. Kuva lainattu viitteestä (10).

### 2.1.3 Toiminta

Matriksin metalloproteiinaasit ovat avainasemassa tulehdusprosesseissa, ja ne kykenevät hajottamaan kaikkia solun ulkoisia proteiineja (1,11,12). MMP:t osallistuvat solujen välisen ja solujen sisäisenkin kommunikoinnin säätelyyn (12). MMP:t säätelevät solujen apoptoosia, migraatioita, vuorovaikutusta ja erilaistumista, eli ne osallistuvat kudosten ja elinten kehitykseen ja kasvuun, normaaliin kudoksen muokkaamiseen ja haavan paranemiseen (3,8,13). MMP:t osallistuvat alkion kehittymiseen eli embryogeneesiin (8), hampaiden kehittymiseen (14), epiteelin proliferaatioon ja verisuonten muodostumiseen eli angiogeneesiin (12,15).

MMP:t ovat tärkeitä myös tulehduksellisissa sairauksissa, kuten artriitissa (7,13) eli niveltulehduksessa, reumankaltaisessa artriitissa (16), parodontiitissa (17), periimplantiitissa (17), haavaumissa ja sepsiksessä (18) eli vakavassa yleistulehduksessa. Parodontiittipotilailla on plasma- ja seeruminäytteissä kohonneet MMP-tasot (19). MMP on päävastuussa parodontiitin kudostuhosta (20). MMP:t edistävät tulehdusta hajottamalla bioaktiivisia molekyyliä, kuten kasvutekijöitä, sytokiinejä ja kemokiineja, sekä aktivoimalla muita MMP:itä toimimaan (6,8).

MMP:n säätelyn häiriöt voivat johtaa fibroosiin, eli tiiviin sidekudoksen muodostumiseen muun kudoksen tilalle, ja tuumorin metastasointiin (13). MMP:t tuhoavat kudosten välisiä esteitä ja mahdollistavat kasvaimen invaasion eli kudoksiin tunkeutumisen ja metastasoinnin eli etäpesäkkeiden lähetyksen (21). MMP:t säätelevät tuumorin syöpäsolujen kasvua vapauttamalla solukalvoon sitoutuneita kasvutekijöiden esiasteita, moduloimalla solunulkoiseen matriksiin sitoutuneiden kasvutekijöiden vapautumista ja säätelemällä epäsuorasti integriinien kautta kulkevia proliferatiivisia signaaleja (7). MMP:illä on kyky säädellä tuumorin mikroympäristöä, ja MMP:iden ilmentyminen ja aktivaatio on kasvanut lähes kaikissa ihmisten syövässä verrattuna normaaleihin kudoksiin (7).

Useilla MMP:illä on kuitenkin antituumorigeeninen vaikutus, sillä ne esimerkiksi tuottavat antiangiogeenisiä eli verisuonten kasvua estäviä solunulkoisen matriksin fragmentteja (1). MMP:t myös inhiboivat syövän kasvua aktivoimalla TGF- $\beta$ :aa ja tuottamalla apoptoosia edistäviä molekyylejä kuten Fas-ligandia ja TNF- $\alpha$ :aa (7). MMP:t eivät osallistu vain tuumorin invaasioon ja metastasointiin tai myöhäisvaiheen karsinogeneesiin, vaan ovat osallisina myös syövän kehityksen varhaisvaiheessa sekä suotuisalla että epäsuotuisalla tavalla (7).

Yksittäistä MMP:tä ei voida luokitella yksiselitteisesti hyväksi tai pahaksi, kun ajatellaan tulehdusta kokonaisuutena, koska proteolyyttisen aktiivisuuden nettovaikutus on riippuvainen tilanteesta (12). Tämän vuoksi jossain yhteydessä tietyn MMP:n aktivoituminen voi olla eduksi, ja jossain toisessa yhteydessä haitaksi, riippuen mitä muut molekyylit ympärillä tekevät, miten ne reagoivat kyseisen MMP:n aktiivisuuden muutoksiin ja mikä on toiminnan nettovaikutus. Esimerkiksi MMP-9 edistää koliittia eli paksusuolitulehdusta, mutta vaikuttaa kuitenkin myös tuumorien suppressorina (12). Samoin esimerkiksi MMP-10-geenin polymorfia edistää COPD:tä eli keuhkohtaumatautia, mutta toisaalta MMP-10:lla on tärkeä rooli infektoituneen tai vahingoittuneen keuhkon tai paksusuolen paranemisessa (12).



## 2.1.4 MMP:iden aktiivisuuden säätely

MMP:iden aktiivisuutta säädellään monella tasolla: RNA:n transkriptiossa, proentsyymien aktivaatiossa ja entsyymi-inhibitiiossa (7,22). Tämän lisäksi tehdään hienosäätöä proteiinisynteesin tasolla, solun eri osiin ja eri soluihin sijoittamisessa, solun pintaan kiinnittymisessä, erityksessä, substraattien kohdistamisessa, soluun sisäännotossa ja autolyysillä (22). MMP:iden transkriptiota solussa ja sekreetioita solusta ulos säätelevät inflammatoriset sytokiinit, kuten TNF- $\alpha$  ja interleukiini IL-1 $\beta$ , kasvutekijät ja hormonit (4,22). IL-1 $\beta$  stimuloi ja TGF- $\beta$  inhiboi MMP-geenien ilmentymistä eli ekspressiota (7).

Sekä endogeeniset eli elimistön tuottamat että bakteerien tuottamat proteinaasit kykenevät aktivoimaan pro-MMP:itä, eli poistamaan propeptididomeenin (7,23). Useimmat MMP:t aktivoidaan solua ympäröivässä tilassa kudoksen tai plasman proteinaaseilla, bakteerien proteinaaseilla tai toisilla MMP:illä (7). Näistä poiketen MMP-11, -23 ja -28 ja solukalvolla sijaitsevat MMP:t aktivoidaan solunsisäisesti ennen eritystä Golgin laitteeseen liittyvällä furiini-proteinaasilla (7). Jotkut MMP:t vaativat toisen MMP:n toimintaa saavuttaakseen täyden aktiivisuuden (23). Pro-MMP:iden aktivaatio plasmiinilla on tärkeä reitti, ja toinen mekanismi on aktivoitua solujen pintaan kiinnittyneiden MMP:iden kautta (7). MMP:t voivat aktivoitua myös elohopeayhdisteistä, tiolireagensseista tai reaktiivisista happi- tai typpiryhmistä (5), mikä luultavasti johtuu siitä, että nämä yhdisteet häiritsevät kysteiinin sulfahydrylin (5) ja katalyyttisen osan sinkin sidosta, mikä johtaa pro-domeenin autoproteolyttiseen irtoamiseen (24,25).

Tärkeimmät endogeeniset inhibiittorit MMP:ille ovat spesifiset kudoksen inhibiittorit metalloproteinaaseille eli TIMP:t (tissue inhibitor of metalloproteinase) -1, -2, -3 ja -4 (7). TIMP:t sitovat MMP:itä stoikiometrisessä suhteessa 1:1 (7,22). Näiden lisäksi on epäspesifisiä endogeenisiä inhibiittoreita, kuten  $\alpha$ 1-proteinaasi-inhibiittori (7),  $\alpha$ 2-makroglobuliini (7) ja seriiniproteinaasi-inhibiittori (26). Kemiallinen tapa inhiboida MMP:iden toimintaa on Zn<sup>2+</sup>-ionin kelatointi (22).

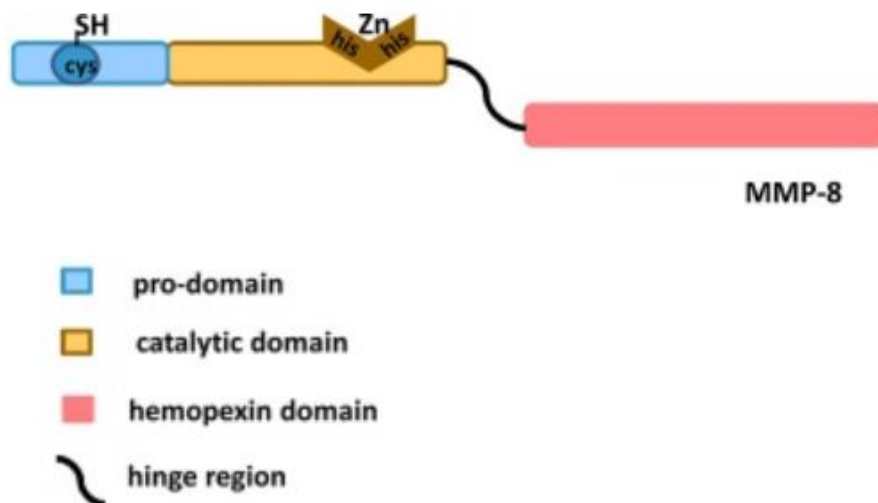
## 2.2 Matriksin metalloproteinaasi 8

MMP-8, joka tunnetaan myös nimillä neutrofiilikollagenaasi ja kollagenaasi 2 (1), erittyy pääasiassa polymorfonukleaarista (PMN) eli liuskatumaisista neutrofiileistä (5,27-29). Muita soluja, joissa MMP-8 esiintyy *de novo* -synteesin eli geeniekspression aktivoitumisen seurauksena ovat makrofagit (30), plasmakivärsolut (31), epiteelisolut (32,33), fibroblastit (34), sileälihassolut (30) ja endoteelisolut (34). MMP-8:a esiintyy myös aktivoituneissa monosyyteissä, lymfosyyteissä, keuhkojen epiteelisoluissa, kielen levyepiteelisyövän soluissa (21), fibrosyyteissä, dentriittisoluissa, NK-soluissa (natural killer eli luonnollinen tappaja) ja mesenkymaalisissa kansasoluissa (5).

On eriäviä mielipiteitä siitä, pitäisikö MMP-8:n systeemisen pitoisuuden mittaauksessa käyttää plasmaa (veren nestemäistä osaa ilman soluja) vai seerumia (verta, josta on poistettu solujen lisäksi fibrinogeeni ja eräät muut hyytymistekijät). Seerumin eristyksen aikana tapahtuvan hyytymisen tiedetään vapauttavan MMP:tä leukosyyteistä. Proteinaasin mittaaminen seerumista siis kuvastaa myös neutrofiilien potentiaalia degranuloida solujyväset ja vapauttaa MMP:tä, ja nämä ominaisuudet vaihtelevat geneettisestä variaatiosta johtuen (35). Tutkimusten vertailu saattaa tämän takia olla vaikeaa. Kuitenkin on havaittu, että seerumin ja plasman MMP-8-tasot korreloivat vahvasti keskenään. (11)

## 2.2.1 Rakenne

MMP-8 eritetään soluista inaktiivisena pro-entsyyminä, joka on aktivoitava ennen kuin se voi toimia (28,29). Tämä MMP-8:n esimuoto sisältää MMP:ille tyypillisesti hemopeksiiniosan (6), sarana-alueen (6) ja N-päätteisen (1) pro-domeenin, jossa kysteiniipääte vaikuttaa aktiivisen kohdan sinkki-ioniin, niin että toiminta estyy (1,6). Tämän vuorovaikutuksen häirintä mahdollistaa pro-entsyymin muuttumisen aktiiviseksi proteinaasiksi, ja se tapahtuu ottamalla proteolyttisesti pro-domain pois tai muokkaamalla kysteiniin tioliryhmää. Tämä muuntuminen voi tapahtua aktivoituneista neutrofiileista vapautuneilla happiryhmillä, katepsiini G:llä, kymotrypsinillä, MMP-3:lla, MMP-7:llä, MMP-10:llä, MMP-14:sta, useilla bakteerien proteinaaseilla ja monilla muilla proteinaaseilla. Tämä osoittaa sitä, että MMP-8:n aktivaatio on voimakkaasti säädelty ja useimmiten aktivoituminen rajoittuu tulehdusalueelle. (1)



Kuva 2. MMP-8:n rakenne. Kuva pohjautuu viitteeseen (36).

## 2.2.2 Toiminta

MMP-8 on keskeinen välittäjä sekä akuuteissa että kroonisissa tulehduksissa (1). MMP-8:n pääsubstraatti on tyypin 1 kollageeni, joka on suurimmassa osassa kudoksia ekstrasellulaarimatriksin pääproteiini, ja lisäksi sen substraatteja ovat myös tyypin II ja III kollageeni (1,37). Tyypin IV ja V kollageenia MMP-8 ei pysty pilkkomaan (37). MMP-8 varastoituu inaktiivisena pro-entsyyminä kypsien neutrofiilien sekundaarisiin granuloihin (1), ja sitä vapautuu suuriakin määriä nopeasti vasteena tulehdusärsykkeelle (27). Tämä mahdollistaa neutrofiilien kemotaksiksen eli järjestäytymisen kemiallisen ärsykkeen mukaan ja liikkumisen kudoksissa niin, että ne voivat suorittaa tehtävänsä ensilinjan puolustuksessa (38,39). MMP-8 vapautuu neutrofiilien intrasellulaarisista granuloista, kun neutrofiilit aktivoidaan proinflammatorisella signaalilla tai DAMP:eilla (damage-associated molecular patterns) (40), jotka vapautuvat esimerkiksi kuolevista soluista (41).

MMP-8:a säädellään pääasiassa vaikuttamalla sen vapautumiseen neutrofiileistä eikä niinkään uudismuodostumiseen eli *de-novo* biosynteesiin (1). Vapauttamista indusoivat esimerkiksi interleukiinit, TNF- $\alpha$  ja bakteerien virulenssitekijät (42-45). Samat tulehdusvälittäjäaineet, jotka stimuloivat neutrofiilien degranulaatioita indusoivat MMP-8:n synteesiä ja ilmentämistä myös ei-PMN-linjan soluissa (34,46,47). Osassa soluja säädellään MMP-8:a transkription tasolla (5). Fibroblasteissa transkriptioita voimistavat TNF- $\alpha$  ja TGF- $\beta$ 1 ja mononukleaarissa fagosyyteissa IL-1 $\beta$  ja CD40-ligandi (5). MMP-8:a erittyy myös makrofageista (30), plasma- (31), epiteeli- (32,33), endoteeli- (34) ja sileälihassoluista (30). MMP-8:n systeeminen pitoisuus korreloi positiivisesti CRP-pitoisuuden kanssa (48).

MMP-8 hajottaa eniten kollageeni 1:tä, mutta myös kollageeni 2:ta ja 3:a (1,37). Muita substraatteja ovat reseptorit ja proteinaasien inhibiittorit, esimerkiksi seriiniproteinaasi-inhibiittori ja kemokiinit (1). MMP-8:n substraatteja ovat myös substanssi P, angiotensiini I ja II (49). Se hajottaa myös solun adheesioproteiineja ja sytokiinejä kuten CXCL5:ttä, IL-8:a ja CXCL9:ä (40). MMP-8 pystyy siis vaikuttamaan monen molekyylin aktiivisuuteen (1).

## **2.2.3 Seerumin matriksin metalloproteinaasi 8:n pitoisuudet sairauksissa**

MMP-8 on välittäjä sekä akuuteissa että kroonisissa tulehdustiloissa. Jos sitä vapautuu liikaa neutrofiileistä, se johtaa liialliseen kudostuhoon, kuten sairauksissa reuma (16), parodontiitti (17) ja sepsis (40). MMP-8:lla on yhteys myös syövän etenemiseen (21), artroosiin (50), haavan paranemiseen ja moniin muihin patologisiin ja fysiologisiin tiloihin (13).

### **2.2.3.1 Sydän- ja verisuonitaudit**

Seerumin matriksin metalloproteinaasi-8:aa voidaan pitää biomarkkerina insidenteille eli tuleville sydän- ja verisuonitaukeille ja kuolemille (11,51). Seerumin MMP-8 assosioituu prevalenttiin eli olemassa olevaan sepelvaltimotautiin, akuuttiin sepelvaltimotautikohtaukseen ja tuleviin sydän- ja verisuonitautitapahtumiin miehillä ja yleisesti väestöllä, jolla ei ole diagnosoitu sydän- ja verisuonitautia ennestään (52-55). MMP-8-tasot ovat kontrollihenkilöihin verrattuna huomattavasti korkeammat potilailla, joilla on kaulavaltimossa ateroskleroosia, riippumatta tupakoinnista, sukupuolesta, statiinien käytöstä, kohonneesta verenpaineesta ja liitännäissairauksista (48).

Sydänlihaksen infarkti ja iskeeminen aivohalvaus johtuvat useimmiten valtimonseinämään kehittyneen rasvapitoisen plakin repeämisestä (56-58). Sepelvaltimotaudissa verisuonen seinämän plakit ovat muodostuneet osin erilaisten tulehdusvälittäjien vaikutuksesta (11,59,60). Plakin repeäminen vapauttaa plakin sisässä ollutta materiaalia, ja plakin repeäminen panee alulle veren koagulaation eli hyytymisprosessin, joka johtaa veritulppaan. Tämä saattaa johtaa akuuttiin tilanteeseen kuten akuuttiin sepelvaltimotautikohtaukseen tai aivohalvaukseen (60). Sepelvaltimotauti eli koronaaritauti johtuu siitä, että plakin muodostuminen ahtauttaa sepelvaltimoita (60), eli sydämen seinämään verta vieviä aortan haaroja. Tyypillinen oire sepelvaltimotaudista on sydänperäinen rintakipu eli angina pectoris.

*In vivo* -tutkimuksissa MMP-8 tasojen on osoitettu olevan korkeampia hauraassa valtimonseinämän plakissa kuin stabiilissa plakissa (30,51,55,61,62). Plakin repeämisen syyksi epäillään paikallista epätasapainoa proteolyttisessä aktiivisuudessa (63). Hauraassa plakissa on myös kasvanut määrä aktivoitunutta MMP-8:aa (51). MMP-8, varsinkin aktiivinen muoto, myötävaikuttaa plakin repeämiseen ja akuuttiin sydän- ja verisuonitautitapahtumaan (51,64). Oireettomilla potilailla, joilla plakki kehittyi haitallisesti, oli enemmän plakinsisäistä aktiivista MMP-8:a, kuin oireettomilla potilailla, joilla plakki ei kehittynyt (62). Normaaleihin valtimoihin verrattuna MMP-8:aa on löydetty ateroskleroottisen leesioista erityisesti makrofageista, sileälihassoluista ja endoteelisoluista (1,30).

Suurin osa ateroskleroottisen leesioista sidekudoksesta on kollageenia, erityisesti tyypin 1 kollageenia (65-72). MMP-8 hajottaa kollageenia ja solunulkoista matriksia, mikä lisää plakin haurautta ja edesauttaa plakin repeämistä (51). Kohonnut plasman MMP-8-taso korreloi sepelvaltimotaudin vakavuuden kanssa ja assosioituu kaulavaltimon plakin haurauteen (51,62). Häiriöt MMP-8:n säätelyssä linkittyvät myös valtimonseinämän plakin muodostukseen ja kypsymiseen (51,73-75). Epätasapaino MMP-8:n ja TIMP-1:n välillä osoittaa ateroskleroottisen plakin riskiä repeytyä (54).

Kormi ym. havaitsivat tutkimuksessaan, että seerumin MMP-8:n konsentraatiot olivat huomattavasti matalammat yksilöillä, joille myöhemmin tuli sydän- ja verisuonitautitapahtuma ( $p=0,005$ ) tai aivohalvaus ( $p=0,003$ ). MMP-8/TIMP-1 suhde oli huomattavan matala yksilöillä, joille tuli seuranta-aikana sydän- ja verisuonitautitapahtuma, sepelvaltimotauti, aivohalvaus tai jotka kuolivat ( $p<0,001$ ). Näiden biomarkkereiden lisääminen nykyiseen sydän- ja verisuonitautien riskien profilointiin, Framinghamin riskipisteykseen (76), paransi huomattavasti riskiryhmien erottelua ja uudelleenluokittelua sydäninfarktien ja kuolemien suhteen, eli lisäsi ennusteiden luotettavuutta. (11)

### 2.2.3.2 Muut sairaudet

MMP-8:lla on yhteys syövän etenemiseen (13). Useat tutkimukset osoittavat, että MMP-8 edistää tuumorin kasvua ja metastasointia eli etäpesäkkeiden lähetystä (1). Toisaalta joidenkin tutkimusten mukaan MMP-8:lla on onkosuppressiivisia eli syöpää hillitseviä ominaisuuksia useissa eri syöpätyypeissä (21,77-79). MMP-8:n onkosuppressiivisia vaikutuksia on raportoitu pahanlaatuisissa muutoksissa melanoomassa (77,80), ihossa (81), rinnoissa (79,82-84), keuhkoissa (77) ja kielessä (21,85).

Munasarjasyövässä MMP-8:n tasot korreloivat heikon ennusteen, tuumorin erilaistumisasteen ja pahanlaatuisen kasvaimen leviämisen laajuutta kuvaavan luokituksen kanssa (86,87). Kuitenkin MMP-8:n ilmenemistasot korreloivat negatiivisesti rintasyövästä peräisin olevien syöpäsolujen metastasointikykyyn (83).

MMP-8 ilmenee esimerkiksi pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövissä ja potilaiden seerumitasot korreloivat positiivisesti tuumorin levinneisyysasteen kanssa (88,89). Suun ja kielen levyepiteelisyövissä MMP-8:n yliekspressointi vähensi invaasiota ja haittasi migraatioita, mutta ei edistänyt apoptoosia (21). Matala MMP-8 taso yhdessä korkean VEGF-C-tason kanssa on itsenäinen ennustava tekijä aggressiiviselle suun ja kielen levyepiteelisyöväälle ja heikolle selviytymiselle tästä syövästä (21). Suun ja kielen levyepiteelisyövissä tuumorin korkea MMP-8:n ekspressio on assosioitunut parantuneeseen selviytymiseen tästä syövästä (21).

Korkeat MMP-8:n seerumitasot ovat assosioituneet huonompaan selviytymiseen ja lisääntyneeseen systeemiseen inflammaatioon kolorektaalisyövässä (40,90). Kolorektaalisyövän vaiheessa IV eli vaikeaa etäpesäkkeitä lähettänyttä syöpää sairastavilla potilailla oli korkeimmat MMP-8 seerumipitoisuudet, mutta hieman yllättäen vaiheessa III seerumitaso oli matalampi kuin vaiheissa II ja I (90). MMP-8:n seerumitasot nousevat kolorektaalisyövässä ja korreloivat etäisiin metastaaseihin (90). Potilaat, joilla on korkea seerumin MMP-8-taso, on heikompi selviytyminen tästä syövästä riippumatta iästä, immunohistokemiasta, imukudoksiin invasoitumisesta, tuumorin asteesta ja levinneisyydestä (40). Korkeat MMP-8-tasot ovat assosioituneet tuumorin nekroosiin (90).

Kolorektaalisyövässä systeeminen tulehdusvaste on yhdistynyt huonompaan selviytymiseen, ja seerumin MMP-8 on tiiviisti yhteydessä systeemisiin tulehdusmarkkereihin viitaten fysiologiseen linkkiin MMP-8:n ja systeemisen inflammaation välillä. Kohonnut MMP-8-taso assosioituu kohonneeseen CRP-tasoon ja useisiin sytokiineihin, kuten interleukiineihin IL-1ra, IL-7 and IL-8. (40)

Tyyppin 1 kollageeni on vallitseva ihon arpikudoksessa (91), ja MMP-8:n vaikutus on tehostunut kudoksen muokkauksessa, esimerkiksi kohdun palautumisessa synnytyksen jälkeen (92). Parantuissa haavoissa on lähes pelkästään inaktiivista MMP-8:a (93). MMP-8:n pitoisuudet ovat korkeammat ja varsinkin aktivoitunutta MMP-8:a on huomattavasti enemmän kroonisissa kuin parantuissa haavoissa (93), ja tämä ero liittyy neutrofiilien suureen määrään kroonisissa haavoissa (94).



### 3 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimme, miten demografiset eli väestötieteelliset muuttujat, lääkitykset, diabetes, lihavuus, verenpaine, tupakointitottumukset, fyysisen aktiivisuuden määrä, verensokeri ja inflammaatiomarkkerit, kuten CRP, yhdistyvät seerumin MMP-8-pitoisuuteen. Tavoitteena on määrittää MMP-8:n seerumipitoisuuden viitearvot terveessä väestössä. Tässä tutkimuksessa määrittelemme terveen yksilön niin, että hänellä ei ole ennen tutkimusta eikä seurantajakson aikana todettu diabetesta, syöpää eikä sydän- ja verisuonitauteja, eikä hän ole kuollut seurantajakson aikana. Seurantajakso oli syöväälle, kuolemalle ja sydän- ja verisuonitaudeille 15 vuotta ja diabetekselle 13 vuotta.

### 4 Aineisto

Tutkimuksen aineistona on FINRISK-tutkimuksesta saatu aineisto, joka on väestöpohjainen tutkimus kansantaudeista. Sillä on eettisen toimikunnan sekä Kansanterveyslaitoksen (nykyinen Terveyden ja hyvinvoinnin laitos) hyväksyntä. FINRISK-tutkimus toteutetaan viiden vuoden välein viidellä maantieteellisellä alueella. Siihen kuuluu kliininen tutkimus, laboratoriokokeita ja kyselylomake. Esimerkiksi nykyiset sydän- ja verisuonitautia sairastavat löydetään lääkärin analysoitua kyselylomakkeen, KELA:sta saadun sydän- ja verisuonitauteihin liittyvän lääkityksen lääkekorvausrekisterin avulla tai kansallisesta sairaaloiden hoitoilmoitusrekisteristä saadulla tiedolla sairaalahoitajaksoista. Tutkimukseen kuuluu 15 vuoden seuranta KELA:n lääkekorvausrekisterin, kansallisen hoitoilmoitusrekisterin ja kuolemansyyrekisterin avulla. Tutkielmani aineisto on vuodelta 1997. MMP-8 mitattiin FINRISK 1997 kohortissa 8349:ltä henkilöltä kerätyistä seeruminäytteistä.

## 5 Menetelmät

### 5.1 Biokemialliset mittaukset

MMP-8 mitattiin FINRISK 1997 kohortissa 8349:ltä henkilöltä kerätyistä seeruminäytteistä immunofluorometrisellä menetelmällä (IFMA), eli menetelmällä, jossa joko antigeeniin tai vasta-aineeseen liitettyä fluoresoivaa väriainetta käytetään antigeeni-vasta-ainereaktion määrittämiseen. Analyysi tehtiin Suomessa Kauniaisissa Medix Biochemicassa valmistajan ohjeiden mukaan. Mittausten välinen variaatiokerroin (CV %) on 7,3 % ja mittausten havaintoraja 0,08ng/ml.

### 5.2 Tilastollinen analyysi

Tilastotieteellinen analyysi tehtiin IBM SPSS Statistics-ohjelman avulla. Ryhmien välisiä vertailuja tehtiin käyttäen Mann-Whitney U-testiä jatkuville muuttujille, ja  $\chi^2$  eli chiin neliö-testiä luokkamuuttujille.

Muutamia jatkuvia muuttujia, esim. ikä ja painoindeksi, muutettiin myös luokkamuuttuja-analyysiin sopiviksi. Ikä saatiin luokkamuuttujaksi ryhmittelemällä koehenkilöt ikäryhmiin 24-34-, 35-44-, 45-54-, 55-64- ja 65-74-vuotiaat, ja painoindeksi luokittelemalla 0-24,99 kg/m<sup>2</sup> normaalipainoisiksi, 25-29,99 kg/m<sup>2</sup> ylipainoisiksi ja yli 30 kg/m<sup>2</sup> lihaviksi.

Liikunnan määrässä inaktiivisten ryhmään luokiteltiin ne henkilöt, jotka kyselyssä vastasivat liikkuvansa vapaa-ajalla erittäin vähän ja kertoivat vapaa-aikanaan pääasiassa katsovansa televisiota tai lukevansa, niin ettei ruumiillista rasitusta tule paljoakaan. Aktiivisten liikkujien ryhmään määritettiin ne, jotka eivät kuuluneet inaktiivisten ryhmään, eli ne, joiden vapaa-aikaan kuului vähintään hieman kevyttä liikuntaa, kuten kävelyä tai puutarhanhoitoa.

Jatkuvista muuttujista normaalijakautuneiden arvojen kuvaamiseen käytettiin keskiarvoa ja standardideviaatiota eli keskihajontaa. Vinosti jakautuneiden jatkuvien muuttujien arvojen kuvaamiseen käytettiin mediaania ja IQR:ää (interquartile range), eli sitä, kuinka paljon kahteen keskimmäiseen kvartiiliin kuuluvat enintään poikkeavat mediaanista.

Kun MMP-8:n pitoisuutta verrattiin muihin biomarkkereihin, tehtiin lineaarinen regressiomalli, jota varten MMP-8:n, CRP:n ja triglyseridien pitoisuus muutettiin logaritmiseksi, koska ne eivät jakautuneet normaalijakauman mukaisesti vaan vinosti. Malli vakioitiin iällä ja sukupuolella eli ne eivät olleet sekoittavina tekijöinä tässä lineaarisessa regressiomallissa. Linearisessa regressioanalyysissä estimoidaan tarkasteltavan vastemuuttujan lineaarista riippuvuutta selittävistä muuttujista.

Korrelaatioanalyysissä käytettiin Spearmanin korrelaatiotestiä, jossa korrelaatiokertoimen arvot ovat väliltä -1 ja +1. -1 tarkoittaa voimakasta negatiivista riippuvuutta, eli toisen muuttujan arvon kasvaessa toisen arvo pienenee. +1 tarkoittaa voimakasta positiivista riippuvuutta, eli muuttujien arvot muuttuvat samaan suuntaan, toisen kasvaessa toinenkin kasvaa, ja toisen pienentyessä toinenkin pienenee. Korrelaatiokertoimen lähestyessä nollaa keskinäinen riippuvuus vähenee ja arvo 0 merkitsee, ettei lineaarista riippuvuutta ole lainkaan.

Lääkityksen vaikutusta seerumin MMP-8-pitoisuuteen tutkittiin Kruskal-Wallis-testillä. Otoksemme väestön terveydellistä taustaa tutkittiin t-testin avulla normaalisti jakautuneiden muuttujien osalta.

Tilastollista merkitsevyyttä kuvaa p-arvo. P-arvo on todennäköisyys sille, että otannassa havaittu poikkeama oletetusta nollassa oletuksesta johtuu vain otantavirheestä ja sattumasta. Jos p-arvo on alle 5 %, on alle viiden prosentin mahdollisuus, että havaittu poikkeama olisi vain sattumaa tai otantavirheestä johtuvaa. Tässä tutkimuksessa tilastollisen merkitsevyyden rajaksi asetettiin  $p < 0,050$ .

## 6 Tulokset

Tässä tutkimuksessa määrittelemme terveen yksilön niin, että hänellä ei ole ennen tutkimusta eikä 15 vuoden seurantajakson aikana todettu syöpää eikä sydän- ja verisuonitauteja, eikä hänellä ei ole ennen tutkimusta eikä 13 vuoden seurantajakson aikana todettu diabetesta, eikä hän ole kuollut 15 vuoden seurantajakson aikana.

Taulukossa 1 on esitetty tutkimusaineistomme kuvaus. Kaikki taulukossa 1 mainitut muuttujat eroavat terveiden ja sairaiden henkilöiden välillä tilastollisesti erittäin merkitsevästi. Sairaot henkilöt ovat siis keskimäärin vanhempia, painavampia, fyysisesti inaktiivisempia ja heistä useammalla on kohonnut verenpaine kuin terveillä. Terveissä on enemmän aina tupakoimatta olleita. Sairaissa on enemmän nykyisiä tupakoitsijoita tai aiemmin tupakoineita kuin terveissä. Keskimäärin sairaat ovat 14,5 vuotta vanhempia ja heidän painoindeksinsä on 2,65 yksikköä korkeampi terveisiin verrattuna. Terveillä kohonnut verenpaine on neljällä kymmenestä ja sairailta kahdella kolmasosalla. Terveissä naisia on hieman yli puolet, mutta sairaisissa miehiä on yli 60 %. MMP-8:n pitoisuus on sairailta hieman matalampi kuin terveillä, ja sairailta hajonta on kapeampi. Sairaiden MMP-8:n pitoisuuden mediaani on 27,40 ng/ml ja IQR 38,72, terveillä mediaani on 29,50 ng/ml ja IQR 43,26.

**Taulukko 1.** Tutkimusaineiston kuvaus

|                           | terveet                        | sairaat                        | p         |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|
|                           | keskiarvo (SD)                 |                                |           |
| ikä                       | 43,1 (11,8)                    | 57,6 (11,2)                    | < 0.001*  |
| BMI                       | 25,70 kg/m <sup>2</sup> (4,05) | 28,35 kg/m <sup>2</sup> (4,88) | < 0.001*  |
|                           | n (%)                          |                                |           |
| miessukupuoli             | 2285 (43,7)                    | 1968 (61,3)                    | < 0.001** |
| tupakointi                |                                |                                |           |
| ei tupakoi                | 2961 (56,6)                    | 1650 (51,4)                    | < 0.001** |
| lopettanut<br>tupakoinnin | 1075 (20,5)                    | 816 (25,4)                     |           |
| tupakoi                   | 1196 (22,9)                    | 746 (23,2)                     |           |
| fyysinen<br>inaktiivisuus | 1080 (20,6)                    | 763 (23,8)                     | <0,001**  |
| kohonnut verenpaine       | 2080 (39,8)                    | 2078 (64,7)                    | <0,001**  |
|                           | mediaani (IQR)                 |                                |           |
| MMP-8                     | 29,50 ng/ml (43,26)            | 27,40 ng/ml (38,72)            | <0,001*** |

\* t-testi

\*\*  $\chi^2$  testi

\*\*\*Mann-Whitney U testi

Taulukossa 2 on tarkasteltu erilaisia tekijöitä, jotka voisivat vaikuttaa siihen, miksi MMP-8:n pitoisuus vaihtelee yksilöiden välillä. Tupakoinnin, iän, kohonneen verenpaineen ja metabolisen oireyhtymän suhteen eri ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevät erot sekä terveillä että sairailta. Tupakoivilla pitoisuudet ovat käytännössä samat sekä terveillä että sairailta, ja tupakoivien pitoisuudet ovat korkeammat kuin aina tupakoimatta olleilla ja tupakoinnin lopettaneilla. Tupakoimattomilla ja tupakoinnin lopettaneilla pitoisuudet ovat terveillä korkeammat kuin sairailta. Terveillä matalin pitoisuus on aina tupakoimatta olleilla, mutta sairailta aina tupakoimatta olleilla ja sairailta tupakoinnin lopettaneilla pitoisuus on melko samansuuruinen. MMP-8:n pitoisuus laskee selkeästi iän myötä, ja kaikissa ikäluokissamme pitoisuus on terveillä matalampi kuin sairailta. Erotus terveiden ja sairaiden ryhmien pitoisuuksissa on suurin 24-34-vuotiaalla eli 3,39 ng/ml, ja erotus pienenee vanhempiin ikäluokkiin mennessä ollen pienin 55-64-vuotiaalla eli 0,66 ng/ml. 65-74-vuotiaisiin tämä kehityskulku terveiden ja sairaiden pitoisuuksien samankaltaistumisesta ei enää pädekään, ja erotus onkin isompi eli 2,03ng/ml. Kohonneesta verenpaineesta kärsivillä pitoisuus on matalampi kuin niillä, joiden verenpaine on normaali. Samoin metabolisesta oireyhtymästä kärsivillä pitoisuus on matalampi kuin niillä, joilla ei ole metabolista oireyhtymää.

Molemmissa ryhmissä, sekä terveillä että sairailta, naisilla MMP-8-pitoisuus on korkeampi kuin miehillä. Naisten ja miesten pitoisuuksien ero on sairailta selkeästi kapeampi, ja sukupuolten välillä on tilastollisesti merkitsevä ero vain terveillä.

Sairaassa väestössä pitoisuudet eroavat tilastollisesti merkitsevästi fyysisen aktiivisuuden ja painoindeksin mukaan. Sairailta vähäisesti aktiivisilla pitoisuus on korkeampi kuin niillä sairailta, jotka liikkuvat edes jonkun verran. Terveillä liikunnan määrä ei juurikaan vaikuta pitoisuuteen, eikä ero ryhmien välillä ole tilastollisesti merkitsevä. Normaalipainoisilla pitoisuus on käytännössä sama riippumatta siitä, ovatko he terveitä vai sairaita, mutta painon noustessa, eli ylipainoisia ja lihavia vertaillaessa, pitoisuus laskee sairailta jyrkemmin ja terveillä loivemmin. Ilmeisesti erot pitoisuuden laskun jyrkkyydessä tekevät sen, että vain sairailta pitoisuus eroaa tilastollisesti merkitsevästi eri painoindeksien välillä.

Taulukon 2 vertailuissa pitoisuus on terveillä korkeampi ja sairaila matalampi, paitsi ikävertailussa päinvastoin, painovertailussa normaalipainoisilla terveillä keskimäärin vain 0,01 ng/ml korkeampi kuin sairaila ja nykyisillä terveillä tupakoitsijoilla vain 0,12 ng/ml korkeampi kuin nykyisillä sairaila tupakoitsijoilla.

**Taulukko 2.** MMP-8 pitoisuuden erot terveiden ja sairaiden välillä

|            |                       | terveet |                             | sairaat |                             |
|------------|-----------------------|---------|-----------------------------|---------|-----------------------------|
|            |                       | n       | MMP-8 mediaani (IQR), ng/ml | n       | MMP-8 mediaani (IQR), ng/ml |
| sukupuoli  | mies                  | 2272    | 27,82 (39,98)               | 1178    | 26,35 (37,63)               |
|            | nainen                | 2921    | 31,06 (45,09)               | 1114    | 27,64 (39,86)               |
|            |                       |         | p <0,001                    |         | p=0,982                     |
| tupakointi | ei koskaan            | 2876    | 28,55 (41,84)               | 1394    | 25,77 (36,46)               |
|            | lopettanut            | 1063    | 29,40 (41,60)               | 783     | 25,54 (33,94)               |
|            | nykyinen tupakoitsija | 1182    | 32,31 (50,58)               | 715     | 32,19 (51,73)               |
|            |                       |         | p<0,001                     |         | p<0,001                     |
| ikä        | 24-34                 | 1568    | 33,99 (50,28)               | 139     | 37,38 (56,78)               |
|            | 35-44                 | 1469    | 29,89 (42,57)               | 303     | 32,21 (41,07)               |
|            | 45-54                 | 1124    | 28,68 (45,11)               | 646     | 29,82 (47,75)               |
|            | 55-64                 | 765     | 25,85 (34,37)               | 1057    | 26,51 (38,29)               |
|            | 65-74                 | 195     | 20,31 (29,28)               | 747     | 22,34 (28,80)               |
|            |                       |         | p<0,001                     |         | p<0,001                     |

|                         |                      |      |               |      |               |
|-------------------------|----------------------|------|---------------|------|---------------|
| kohonnut verenpaine     | ei                   | 3122 | 30,57 (45,25) | 1097 | 29,42 (41,13) |
|                         | kyllä                | 2071 | 27,92 (40,26) | 2059 | 26,02 (37,45) |
|                         |                      |      | p<0,001       |      | p=0,004       |
| fyysinen aktiivisuus    | vähäinen aktiivisuus | 1071 | 29,12 (44,36) | 751  | 28,95 (42,97) |
|                         | enemmän aktiivinen   | 4051 | 29,53 (43,21) | 2147 | 26,21 (36,96) |
|                         |                      |      | p=0,602       |      | p=0,004       |
| painoindeksi            | normaali-paino       | 2441 | 30,55 (45,57) | 717  | 30,54 (48,20) |
|                         | ylipaino             | 2027 | 28,24 (41,54) | 1286 | 26,11 (37,69) |
|                         | lihava               | 653  | 28,70 (41,61) | 889  | 25,56 (34,64) |
|                         |                      |      | p=0,17        |      | p=0,002       |
| Metabolinen oireyhtymä* | ei ole               | 4329 | 30,14 (44,23) | 1823 | 28,74 (41,70) |
|                         | on                   | 854  | 26,87 (35,55) | 1316 | 25,65 (36,39) |
|                         |                      |      | p<0,001       |      | p=0,001       |

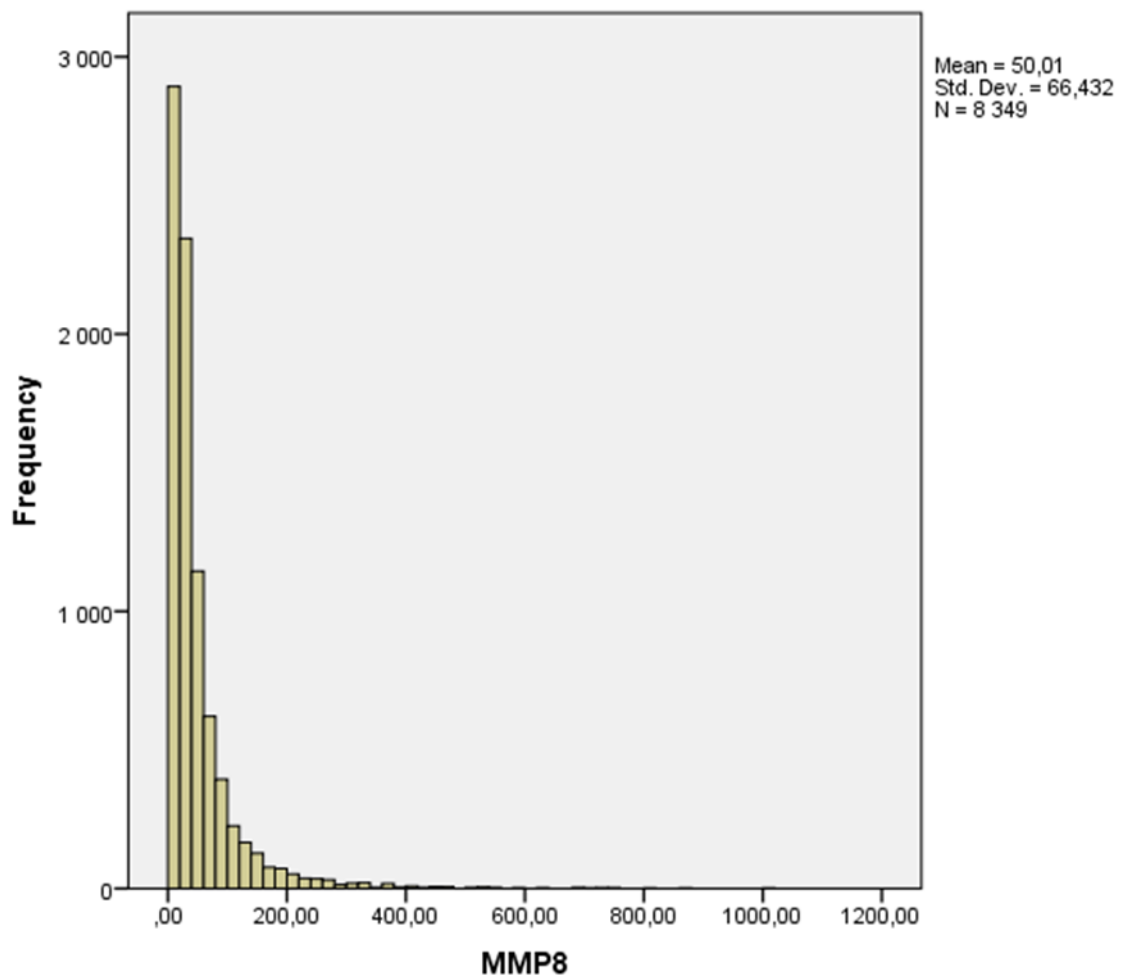
\*Metabolinen oireyhtymä on määritelty niin, että vyötärön ympärys on miehillä yli 94cm ja naisilla yli 80 cm, lisäksi vähintään kaksi seuraavista tekijöistä: kohonnut triglyseridipitoisuus (yli 1,7 mmol/l), pieni HDL-kolesterolipitoisuus (miehillä alle 1,03mmol/l ja naisilla alle 1,29 mmol/l), kohonnut verenpaine (systolinen yli 130 mmHg tai diastolinen yli 85 mmHg) ja kohonnut paastoglukoosipitoisuus.

\*\*Taulukon 2 p-arvot on määritetty Mann-Whitney U testillä



Kuva 3 kertoo tutkimuksemme aineiston, FINRISK 1997 -kohortin alkutilanteesta. MMP-8:n seerumipitoisuus mitattiin 8349 henkilöltä tutkimuksen alussa. Pitoisuus oli keskimäärin 50,01 ng/ml ja standardideviaatio 66,432. Jakauma on selkeästi vasemmalle vino, eli matalat pitoisuudet ovat todella yleisiä, ja suhteellisen korkeat pitoisuudet varsin harvinaisia.

**Kuva 3.** Histogrammi MMP-8 pitoisuudesta tutkimushenkilöiden seerumissa tutkimuksen alussa.



Taulukossa 3 on esitetty aineistomme henkilöiden prevalentit ja insidentit sairastumiset sekä kuolemat. Prevalenssi tarkoittaa tautitapausten määrää jossakin populaatiossa jonakin tietynä ajankohtana, eli tässä yhteydessä sitä, että tutkimushenkilön sairastuminen on tapahtunut ennen tutkimuksen alkua. Insidenssi tarkoittaa tietyllä aikavälillä tietyssä ihmisjoukossa ilmaantuneiden uusien tautitapausten määrää, tässä yhteydessä sitä, että tutkimushenkilön sairastuminen on tapahtunut seurantajakson aikana.

Tutkimushenkilöistä kuudennesosa kuoli seurantajakson aikana. Yleisin prevalentti tauti oli diabetes mellitus, joka oli kolmella viidestäkymmenestä. Yleisin insidentti tauti oli sydän- ja verisuonitauti, joka tuli seitsemälle viidestäkymmenestä. Syöpä oli harvinaisin prevalentti tauti, mutta insidenttinä yli puolet yleisempi kuin diabetes. Insidenttien tapausten osuutta suhteellisesti prevalentteihin vertaamalla havaitaan, että diabetes lisääntyi seurannan aikana suhteellisen vähän, eli iso osa diabetesdiagnooseista oli tehty jo ennen seurantaa. Syöpä sen sijaan lisääntyi suhteessa tutkimuksen alkutilanteeseen huomattavasti, eli valtaosa syöpädiagnooseista tehtiin seurannan aikana.

**Taulukko 3.** Kuolleisuus ja sairastuminen koko aineistossa

|                           | prevalenssi | insidenssi  | yhteensä    |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                           | n (%)       |             |             |
| sydän- ja verisuonitaudit | 330 (3,9)   | 1189 (14,1) | 1519 (18,0) |
| diabetes mellitus         | 513 (6,1)   | 618 (7,3)   | 1131 (13,4) |
| syöpä                     | 186 (2,2)   | 986 (11,7)  | 1172 (13,9) |
| kuollut seurannan aikana  |             | 1393 (16,5) | 1393 (16,5) |

Taulukossa 4 on tarkasteltu MMP-8:n pitoisuutta seurannan aikana kuolleilla sekä prevalenteissa ja insidenteissä sairauksissa. MMP-8:n pitoisuus on tilastollisesti erittäin merkitsevästi matalampi insidenteissä sydän- verisuonitaudeissa. Pitoisuus on tilastollisesti merkitsevästi matalampi myös prevalenteissa sydän- ja verisuonitaudeissa ja insidentissä diabeteksessa. Sydän- ja verisuonitaudeissa pitoisuus on korkein niillä, joille ei tullut insidenttiä tautia, toiseksi korkein niillä, joilla ei ollut prevalenttia tautia, toiseksi matalin niillä, joilla oli prevalentti tauti ja matalin niillä, joille tuli insidentti tauti.

**Taulukko 4.** Kuolemat, prevalentit ja insidentit sairastumiset ja MMP-8:n tasojen mediaanit näissä ryhmissä. Seuranta-aika oli 15 vuotta, diabetekselle 13 vuotta.

|  |       | n    | MMP-8 ng/ml<br>mediaani (IQR) | p-<br>arvo** |
|--|-------|------|-------------------------------|--------------|
| kuollut seurannan aikana                 | ei    | 6989 | 28,81 (42,09)                 | 0,237        |
|  | kyllä | 1360 | 27,93 (40,47)                 |              |
| syöpä, prevalentti                       | ei    | 8167 | 28,70 (41,85)                 | 0,890        |
|  | kyllä | 182  | 29,23 (41,06)                 |              |
| syöpä, insidentti                        | ei    | 7373 | 28,70 (41,75)                 | 0,836        |
|  | kyllä | 976  | 28,69 (43,46)                 |              |
| sydän- ja verisuonitauti,<br>prevalentti | ei    | 8033 | 28,76 (42,40)                 | 0,037        |
|  | kyllä | 316  | 27,19 (32,95)                 |              |
| sydän- ja verisuonitauti,<br>insidentti  | ei    | 7177 | 29,06 (42,41)                 | <0,001       |
|  | kyllä | 1172 | 26,02 (37,38)                 |              |
| diabetes, prevalentti                    | ei    | 7840 | 28,80 (42,01)                 | 0,053        |
|  | kyllä | 509  | 27,06 (38,30)                 |              |
| diabetes, insidentti                     | ei    | 7746 | 28,85 (42,20)                 | 0,016        |
|  | kyllä | 603  | 26,16 (37,60)                 |              |

\*Taulukossa huomioitu henkilöt, joilla seerumin MMP-8 mitattu

\*\*p-arvo määritetty Mann-Whitney-U –testillä

Taulukossa 5 verrataan, onko lääkityllä tai lääkitsemättömällä sairaudella merkitystä MMP-8:n pitoisuuteen verrattuna ryhmään, jolla kyseistä sairautta ei ole. Kohonnut kolesteroli, kolesterolilääkitys ja lääkitty ja lääkitsemätön kohonnut verenpaine vaikuttavat tilastollisesti erittäin merkitsevästi MMP-8 pitoisuuteen. Normaalin verenpaineen ja kolesterolin ryhmissä MMP-8:n pitoisuus on korkein ja se hieman laskee kohonneen verenpaineen ja kolesterolin lääkitsemättömällä ryhmällä ja on matalin sairauteen lääkahoitoa käyttävällä ryhmällä. Hoidetulla tai hoitamattomalla diabeteksella ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä. Toisin kuin verenpaine- ja kolesteroliryhmissä, diabeteksesta sairastavilla lääkityillä potilailla on korkeimmat MMP-8:n pitoisuudet verrattuna terveisiin ja niihin diabeetikoihin, joilla ei ole lääkitystä. Henkilöillä, joilla on diabetes eikä lääkitystä, on ruokavaliohoitoinen diabetes ja todennäköisesti parempi verensokeritasapaino kuin lääkityillä diabeetikoilla.

**Taulukko 5.** Sairaudet ja niiden lääkitykset

|  | n    | MMP-8<br>pitoisuus<br>mediaani (IQR),<br>ng/ml | p-arvo*, sairaut<br>verrattuina ryhmään,<br>jolla ei ole kyseistä<br>sairautta |
|--|------|--|--|
| ei diabetesta                          | 4993 | 25,91 (35,43)                                  |  |
| diabetes, johon lääkitys               | 257  | 27,06 (40,16)                                  | 0,23   |
| diabetes, ei lääkitystä                | 198  | 25,65 (41,04)                                  | 0,48   |
| **normaali kolesteroli                 | 987  | 34,82 (54,27)                                  |  |
| kolesterolilääkitys                    | 5518 | 27,29 (39,42)                                  | <0,001   |
| kohonnut kolesteroli, ei<br>lääkitystä | 1550 | 31,47 (44,95)                                  | 0,001  |
| normaali verenpaine                    | 4124 | 30,15 (43,63)                                  |  |
| kohonnut verenpaine,<br>johon lääkitys | 1353 | 26,88 (36,69)                                  | <0,001   |

|                                    |      |               |        |
|------------------------------------|------|---------------|--------|
| kohonnut verenpaine, ei lääkitystä | 2860 | 27,61 (40,29) | <0,001 |
|------------------------------------|------|---------------|--------|

\*Kruskall-Wallis-testi

\*\*Kokonaiskolesteroli viitearvo fP-Kol alle 5,0 mmol/l

Taulukossa 6 on esitetty tulehdusmarkkerien ja lipidien pitoisuudet terveillä ja sairailta. Taulukosta 6 on havaittavissa, että kaikki siinä olevat tulehdusmarkkerit eroavat tilastollisesti erittäin merkitsevästi terveiden ja sairaiden välillä. Terveillä MMP-8- ja HDL-pitoisuudet ovat korkeampia kuin sairailta. Sairailta triglyseridit, CRP, kokonaiskolesteroli, LDL-kolesteroli, verensokeri ja fibrinogeeni ovat pitoisuudeltaan korkeampia kuin terveillä.

**Taulukko 6.** Tulehdusmarkkerien ja lipidien pitoisuudet

|                              | terveet        | sairaat       |          |
|------------------------------|----------------|---------------|----------|
|                              | mediaani (IQR) |               | p-arvo*  |
| MMP-8 (ng/ml)                | 29,50 (43,26)  | 27,40 (38,72) | <0,001   |
| triglyseridit (mmol/l)       | 1,090 (0,75)   | 1,490 (1,13)  | <0,001   |
| CRP (mg/l)                   | 0,930 (1,53)   | 1,600 (2,64)  | <0,001   |
|                              | keskiarvo (SD) |               | p-arvo** |
| kokonaiskolesteroli (mmol/l) | 5,415 (1,040)  | 5,753 (1,052) | <0,001   |
| LDL (mmol/l)                 | 3,357 (0,915)  | 3,657 (0,924) | <0,001   |
| HDL (mmol/l)                 | 1,444 (0,356)  | 1,304 (0,359) | <0,001   |
| verensokeri (mmol/l)         | 4,944 (0,608)  | 5,517 (1,795) | <0,001   |
| fibrinogeeni (g/l)           | 3,593 (0,735)  | 3,934 (0,812) | <0,001   |

\* Mann-Withney U testi

\*\*t-testi

Taulukossa 7 on esitetty MMP-8:n ja tulehdusmarkkerien välisiä korrelaatiota. Kaikki taulukon molekyylit korreloivat tilastollisesti merkitsevästi kaikkien tutkittavien, terveiden sekä sairaiden MMP-8-pitoisuuteen, ainoana poikkeuksena HDL-kolesteroli, jonka korrelaatio MMP-8-pitoisuuteen on tilastollisesti merkitsevä vain tarkastellessa kaikkia tutkittavia. Korrelaatiokertoimet ovat kuitenkin melko pieniä. HDL-kolesterolin korrelaatio ei ole tilastollisesti merkitsevä enää silloin, kun sitä tarkastellaan erikseen terveillä ja sairailta. Fibrinogeeni on positiivisesti korreloitunut MMP-8:an, ja sen korrelaatio on kaikista tulehdusmarkkereista selkeästi voimakkain. Muita positiivisesti korreloituneita ovat HDL ja CRP. Negatiivisesti MMP-8:an korreloituneita ovat triglyseridit, kokonaiskolesteroli, LDL ja verensokeri.

### Taulukko 7.

Tulehdusmarkkerien pitoisuuksien korrelaatio MMP-8-pitoisuuteen (ng/ml)

|                                      | korrelaatiokerroin<br>MMP-8:aan<br>kaikilla | korrelaatiokerroin<br>MMP-8:aan<br>terveillä | korrelaatiokerroin<br>MMP-8:aan<br>sairailta |
|--------------------------------------|---|--|--|
| triglyseridit<br>(mmol/l)            | -0,059**                                    | -0,044**                                     | -0,051**                                     |
| CRP (mg/l)                           | 0,098**                                     | 0,095**                                      | 0,143**                                      |
| kokonaisko-<br>lesteroli<br>(mmol/l) | -0,073**                                    | -0,066**                                     | -0,067**                                     |
| LDL-<br>kolesteroli<br>(mmol/l)      | -0,065**                                    | -0,060**                                     | -0,055**                                     |
| HDL-<br>kolesteroli<br>(mmol/l)      | 0,028**                                     | 0,026  | 0,013  |
| verensokeri<br>(mmol/l)              | -0,064**                                    | -0,056**                                     | -0,062**                                     |
| fibrinogeeni<br>(g/l)                | 0,163**                                     | 0,155**                                      | 0,175**                                      |

\*\* on tilastollisesti merkitsevä tulos. p-arvo määritetty Spearmanin korrelaatiotestillä

Taulukossa 8 on esitetty MMP-8:n logaritmiseksi muutetun pitoisuuden lineaarinen riippuvuus muista biomarkkereista. Kaikilla, terveillä ja sairailta, MMP-8:n pitoisuus yhdistyy tilastollisesti merkitsevästi CRP:n ja fibrinogeenin pitoisuuteen. MMP-8:n pitoisuus yhdistyy tilastollisesti merkitsevästi kokonaiskolesteroli- ja triglyseridipitoisuuteen kaikilla ja sairailta, mutta ei terveillä. MMP-8 ei yhdisty tilastollisesti merkitsevästi HDL-kolesteroli-, LDL-kolesteroli eikä glukoosipitoisuuteen. Suora yhteys MMP-8:n pitoisuuteen on CRP:llä, fibrinogeenillä ja kaikkien ja terveiden HDL-kolesterolilla. Käänteinen yhteys MMP-8:aan on kokonaiskolesterolilla, LDL-kolesterolilla, triglyserideillä, glukoosilla ja sairaiden HDL-kolesterolilla.

**Taulukko 8.** Lineaarinen regressiomalli MMP-8\* vs. biomarkkerit

|                                 | kaikki            |        | terveet           |        | sairaat           |        |
|---------------------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                                 | B (SD)            | p      | B (SD)            | p      | B (SD)            | p      |
| CRP* (mg/l)                     | 0,185<br>(0,033)  | 0,007  | 0,157<br>(0,016)  | <0,001 | 0,233<br>(0,021)  | <0,001 |
| kokonaiskolesteroli<br>(mmol/l) | -0,055<br>(0,026) | 0,039  | -0,023<br>(0,033) | 0,471  | -0,120<br>(0,044) | 0,006  |
| LDL-kolesteroli<br>(mmol/l)     | -0,027<br>(0,023) | 0,250  | -0,002<br>(0,029) | 0,949  | -0,075<br>(0,039) | 0,057  |
| HDL-kolesteroli<br>(mmol/l)     | 0,001<br>(0,009)  | 0,946  | 0,005<br>(0,011)  | 0,678  | -0,001<br>(0,014) | 0,954  |
| triglyseridit*<br>(mmol/l)      | -0,015<br>(0,006) | 0,007  | -0,008<br>(0,007) | 0,264  | -0,025<br>(0,010) | 0,010  |
| glukoosi (mmol/l)               | -0,007<br>(0,040) | 0,864  | -0,006<br>(0,025) | 0,803  | -0,049<br>(0,096) | 0,608  |
| fibrinogeeni                    | 0,367<br>(0,050)  | <0,001 | 0,330<br>(0,087)  | <0,001 | 0,375<br>(0,061)  | <0,001 |

Adjustointi: ikä ja sukupuoli

\*Logaritmistista asteikkoa on käytetty niissä, jotka eivät jakaudu normaalijakauman mukaisesti.

MMP-8:n persentiilejä kuvaavista taulukosta 9 ja 10 on havaittavissa, että joka persentiilissä pitoisuus on sairailta matalampi kuin terveillä. Absoluuttinen erotus terveillä ja sairailta on sitä suurempi, mitä korkeampiin persentiileihin mennään. Suhteellisesti sairailta persentiilin pitoisuus on noin 90-94 prosenttia vastaavasta terveiden persentiilistä.

**Taulukko 9.** Persentiilit terveillä

|              | 5     | 10    | 25     | 50     | 75     | 90      | 95      |
|--------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| MMP-8, ng/ml | 7,014 | 9,328 | 15,960 | 29,500 | 59,215 | 113,964 | 166,580 |

**Taulukko 10.** Persentiilit sairaille

|              | 5     | 10    | 25     | 50     | 75     | 90      | 95      |
|--------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| MMP-8, ng/ml | 6,457 | 8,660 | 14,513 | 27,400 | 53,230 | 102,931 | 155,933 |



## 7 Pohdinta

MMP-8:n pitoisuus on sairailta matalampi ja hajonnaltaan kapeampi. Terveillä pitoisuus on korkeampi, ja hajonta suurempaa.

Tupakointi on merkittävä haitta elimistölle, sillä se lisää sairauksien riskiä, oksidatiivista stressiä ja matala-asteista jatkuvaa tulehdusta (95-99). Tupakoitsijoilla pitoisuudet ovat käytännössä samat sekä terveillä että sairailta. Tämä saattaa johtua siitä, että sairaat tupakoitsijat ovat tupakoineet pidempään kuin terveet tupakoitsijat, eli he ovat ehtineet jo sairastua. On myös mahdollista, että terveillä tupakoitsijoilla on jotain suojaavia tekijöitä esimerkiksi geeniperimässään tai muissa elintavoissa, joita sairailta tupakoitsijoilla ei ole, ja he olivat siksi tutkimushetkellä vielä terveitä. Tupakointi voi myös olla merkittävämpi MMP-8:n pitoisuuteen vaikuttava tekijä kuin sairauden aiheuttamat aineenvaihdunnan muutokset. Terveillä pitoisuus on matalampi tupakoinnin lopettaneilla ja kaikkein matalin koko elämänsä tupakoimatta olleilla. Sairailta vastaavaa eroa tupakoinnin lopettaneiden ja aina tupakoimatta olleiden välillä ei ole. Sairailta, varsinkin tupakoinnin lopettaneilla, on huomattavasti matalammat MMP-8-pitoisuudet kuin terveillä vastaavassa ryhmässä.

On mielenkiintoinen havainto, että tupakointi nostaa sairaiden MMP-8 pitoisuuden terveiden tasolle, mutta lopettaneilla on pitoisuuksissa ero, joka on vielä suurempi kuin aina savuttomilla olleilla. Voi olla, että elimistön tulehdusreaktio nostaa MMP-8-tasoa tupakoitsijoilla, ja sairailta tupakoinnin lopettaneilla elimistö ei enää lopettamisen jälkeen kykene tuottamaan MMP-8:a kuten terveillä normaalitilassa.

Henkilöillä, joilla on metabolinen oireyhtymä, on matalampi MMP-8-pitoisuus kuin henkilöillä, joilla ei ole metabolista oireyhtymää. Tämä on kiinnostavaa, koska tupakointi ja metabolinen oireyhtymä ovat molemmat elimistölle epäsuotuisia (95-101), mutta tupakointi nostaa ja metabolinen oireyhtymä laskee MMP-8-pitoisuutta. Tupakointi lisää elimistön matala-asteista tulehdusta (97), mutta se tapahtuu naisille ja miehille eri tavalla, sillä naisilla tupakointi laskee adiponektiinin tasoa ja miehillä tupakointi nostaa hs-CRP:n tasoa (102). Metabolinen oireyhtymä lisää matala-asteista tulehdusta (103) ja toisaalta matala-asteinen tulehdus vaikuttaa metabolisen oireyhtymän taustalla, sillä matala adiponektiinin taso ja korkea hs-CRP:n taso ennustavat Ahosen ym. mukaan metabolisen oireyhtymän pahenemista (104). Siksi onkin ristiriitaista, että tutkimuksemme mukaan metabolinen oireyhtymä ja tupakointi assosioituvat MMP-8-pitoisuuteen täysin eri tavoin. Syynä voi olla, että metabolista oireyhtymää on enemmän iäkkäillä henkilöillä, joilla elimistön puolustusvaste on heikentynyt (105-108). On myös mahdollista, että tupakoitsijat ovat hoikempia (109,110), vaikka usein epäterveelliset elämäntavat ja sairastavuus kumuloituvat (111).

MMP-8:n pitoisuus pienenee kaikilla iän myötä. Ero terveiden ja sairaiden pitoisuuksien välillä pienenee vanhempaan ikäryhmään mentäessä, eli siirryttäessä ryhmästä 24-34-vuotiaat 55-64-vuotiaisiin, mutta seuraavassa ikäryhmässä 65-74-vuotiailla ero onkin suurempi kuin edeltävässä ikäryhmässä. Pitoisuus madaltuu iän myötä ja ero terveiden ja sairaiden pitoisuuksissa kapenee 64-vuotiaaksi asti mahdollisesti siksi, että immuunipuolustuksen taso laskee yleisesti iän myötä lähes kaikilla (112-114). 65-74-vuotiaiden ryhmässä ero terveiden ja sairaiden pitoisuuden välillä on suurempi kuin edellisessä ikäryhmässä, eli suuntaus pitoisuuksien eron kaventumisessa terveiden ja sairaiden välillä vanhempiin ikäryhmiin mentäessä loppuu. Syy saattaa olla se, että sairaut saattavat saada diagnoosin vasta vanhemmiten, ja jako terveisiin ja sairaisiin on oikeampi 65-74-vuotiailla kuin 55-64-vuotiailla, eli 55-64-vuotiaissa olisi suhteessa enemmän tietämättään sairaita kuin 65-74-vuotiaissa. Vaikka p-arvot olivat merkitseviä, kyse voi silti olla myös havaintoharhasta, sillä 65-74 vuotiaita oli tutkimuksessamme alle 1000, kun muissa ikäryhmissä edustajia oli yli 1700.

Naisilla MMP-8:n pitoisuus on korkeampi kuin miehillä. Sukupuolten välinen ero on merkitsevä vain terveillä, mikä johtunee siitä, että sairaiden naisten pitoisuus on huomattavasti matalampi kuin terveillä naisilla, ollen jopa terveiden miesten pitoisuutta matalampi. Sairailla miehillä pitoisuus on matalampi kuin terveillä miehillä, mutta ero heillä on pieni naisiin verrattuna. Mahdollisesti tämä viittaa aineenvaihdunnan erojen kaventumiseen sukupuolten välillä niin, että sairaus muuttaisi sairailta naisilla heidän immuunivastettaan ja aineenvaihduntaansa enemmän miesten immuunivasteen ja aineenvaihdunnan kaltaiseksi. Tätä hypoteesia tukee yleinen tieto siitä, että miehet ovat väestötasolla sairaampia kuin naiset.

Kun tarkastellaan MMP-8-pitoisuuden yhteyttä fyysiseen aktiivisuuteen ja painoindeksiin, ne vaikuttavat tilastollisesti merkitsevästi pitoisuuteen vain sairailta. Syy on luultavasti se, että painoindeksi ja fyysisen aktiivisuuden määrä vaikuttavat merkittävästi diabetekseen ja sydän- ja verisuonitauteihin (115-117). Sairaaksi määrittelemällämme ryhmällä on syövän lisäksi sydän- ja verisuonisairauksia sekä diabetesta, ja siksi heille painoindeksi ja fyysinen aktiivisuus lienevät merkittävämpiä tekijöitä kuin terveelle ryhmälle, jolla ei ole todettu noita sairauksia. Ristiriitaista on, että fyysisesti aktiivisilla on matalampi MMP-8:n pitoisuus, mutta hoikemmilla on korkeampi pitoisuus kuin ylipainoisilla, ja lihavilla pitoisuus on matalin. Syy voi olla se, että paino nousee iän myötä, ja iäkkäillä on matalammat pitoisuudet kuin nuorilla. Ikä on selkeästi sekoittava tekijä.

Kun tarkasteltiin MMP-8:n pitoisuuden tilastollista merkitsevyyttä diabeteksessa, havaittiin, että pitoisuus eroaa tilastollisesti merkitsevästi vain insidenttiin diabetekseen sairastuvien ja terveiden välillä. Prevalentti diabetes ei ole MMP-8:n pitoisuuden suhteen tilastollisesti merkitsevä tekijä verratessa ryhmään, jolla ei ole prevalenttia diabetesta. Lääkitty eikä lääkitsemätön diabetes ole tilastollisesti merkitseviä MMP-8:n pitoisuuden suhteen verratessa ryhmään, jolla ei ole diabetesta. Siksi vaikuttaa ristiriitaiselta, että MMP-8 on negatiivisesti korreloitu verensokeriin. Syynä tähän korrelaatioon voi tosin olla se, että paastoverensokeri nousee iän myötä, ja iäkkäillä on matalammat MMP-8 pitoisuudet kuin nuorilla. Paastoverensokeri nousee iän myötä, koska iän myötä kehittyä insuliiniresistenssiä (118-120). MMP-8:n pitoisuus on matalampi henkilöillä, joille tulee diabetes kuin niillä, joilla on jo diabetes tai ei tule diabetesta. MMP-8 ei siis kerro mitään olemassa olevasta diabeteksestä, mutta voisi olla markkeri diabetesriskin määrittelylle tulevaisuudessa.

Kohonneesta verenpaineesta kärsivillä on matalampi MMP-8:n pitoisuus kuin niillä, joilla ei ole kohonnuttua verenpainetta. Sekä kohonneen että normaalin verenpaineen ryhmissä terveillä on korkeampi MMP-8-pitoisuus kuin sairailta. MMP-8:n pitoisuus on tilastollisesti merkitsevästi matalampi sekä prevalentteissa että insidenteissa sydän- verisuonitaudeissa verrattuna terveisiin. Tämä on linjassa mm. Kormin ym. tutkimuksen tulosten kanssa (11). Myös ristiriitaisuutta aiempiin tutkimuksiin on, sillä on havaittu, että MMP-8:n korkea konsentraatio seerumissa ja plasmassa assosioituu riskiin tuleville sydän- ja verisuonitaukeille ja niiden tautitapahtumille ja seurauksille, sekä korreloi myös prevalenttien sydän- ja verisuonitautien kanssa (52-54,74).

MMP-8:n pitoisuus saattaisi olla ensin matalampi, kun elimistö alkaa muuttua sairaaseen suuntaan, ja sitten nousta, kun verisuonen seinämiin kertyy rasvaa ja solujätettä, minkä vuoksi seinämät paksuuntuvat ja valtimot ahtautuvat. Verisuonten ahtautuessa elimistö loogisesti yrittäisi ohentaa verisuonten seinämiin kertyneitä rasvaplakkeja pilkkomiseen kykenevien molekyylien avulla, eli mm. pakkaamalla MMP-8:a plakkeihin verenkierron kautta, ja lopulta tulos on hauraan plakin repeäminen tai muu valtimon seinämien paksuuntumiseen ja kovettumiseen assosioituva oire. Hypoteesia akuutin tilanteen nousupiikistä ja pitoisuuden alenemisesta akuutin tilanteen jälkeen tukee Turun ym. tutkimus siitä, että MMP-8:n pitoisuus laskee ajan myötä iskeemisen aivohalvauksen jälkeen (62), ja Momiyaman ym. tutkimustulos siitä, MMP-8:n tasot ovat korkeampia epästabiiilista angina pectoriksesta kärsivillä kuin niillä, joilla on vakaa sepelvaltimotauti (74). Vastaava on havaittu kolorektaalisyövässä, jossa pitoisuudet ensin nousivat, sitten laskivat ja taudin loppuvaiheessa nousivat huippuunsa, joskin kolorektaalisyövässä pitoisuudet olivat koko ajan korkeammat kuin kontrolleilla (90). Sydän- ja verisuonitaudeissa pitoisuudet kulkevat jostain syystä normaalialueen molemmilla puolilla.

Tätä hypoteesia tukee myös tutkimustuloksemme siitä, että MMP-8 on negatiivisesti korreloitunut triglyserideihin, kokonaiskolesteroliin ja LDL-kolesteroliin kaikilla tutkittavilla ja terveillä ja sairailta erikseen. Lineaarisessa regressiomallissa MMP-8:n pitoisuus yhdistyy käänteisesti ja tilastollisesti merkitsevästi kolesteroli- ja triglyseridipitoisuuteen kaikilla ja sairailta. Eli ensin nousisivat rasva-arvot ja sitten MMP-8:n arvot. Tätä kannattaisi tutkia lisää, koska selkeästi MMP-8:lla on merkittävä rooli sydän- ja verisuonisairauksissa, mutta sen pitoisuus taudin eri vaiheissa on erilaista ja kaipaa vielä lisätutkimuksia.

MMP-8-pitoisuus on tilastollisesti merkittävästi matalampi sekä lääkityn että lääkitemättömän kohonneen verenpaineen ryhmällä verrattuna siihen ryhmään, jossa on normaali verenpaine. MMP-8-pitoisuus on tilastollisesti merkittävästi matalampi kolesterolilääkitystä käyttävällä ryhmällä ja lääkitemättömällä kohonneen kolesterolin ryhmällä verrattuna normaalin kolesterolin ryhmään. Tämä onkin hyvin loogista, koska lääkkeet vaikuttavat sydän- ja verisuonisairauksien kulkuun ja tautitapahtumien riskiin (121-124), joihin MMP-8:n pitoisuus on assosioitunut, joten todennäköisesti lääkkeiden käytöllä tai käyttämättömyydelläkin on merkitystä pitoisuuteen. MMP-8 pitoisuus on korkein niillä, joilla kyseistä sairautta ei ole, matalampi niillä joilla on hoitamaton tauti ja matalin niillä, joilla on lääkitys kolesteroliin tai verenpaineeseen. Näin voi olla siksi, että pitoisuus laskee taudin alkuvaiheessa ja lääkityksen vielä tuntematon mekanismi voisi olla se, että se estää MMP-8:n kertymistä verenkierron kautta plakkeihin laskemalla pitoisuutta vielä lisää ja myös tällä tavalla vähentää tautitapahtumien riskiä.

MMP-8 on positiivisesti korreloitunut CRP:hen ja MMP-8:lla havaittiin lineaarisessa regressioanalyysissä olevan suora yhteys CRP:hen iällä ja sukupuolella vakioidussa mallissa. CRP:n pitoisuus nousee tulehduksissa ja kudolvaurioissa, kuten sydäninfaktissa (125-128). Erityisen vahvasti MMP-8 on positiivisesti korreloitunut fibrinogeeniin, johon sillä on myös regressioanalyysissä tilastollisesti merkitsevä suora yhteys. MMP-8 pilkkoo fibrinogeenia heikentäen veren hyytymistä (129). MMP-8:n äkillinen nousu saattaisi siis olla elimistön keino minimoida kudolvaurioita veritulpan ja akuutin sepelvaltimotaudin yhteydessä.

On ajateltu, että MMP-8 aiheuttaisi tulehdusta, koska se assosioituu tulehdistiloihin, mutta vaikuttaa siltä, että se saattaisikin olla suojausmekanismi. Tutkimuksessamme MMP-8-pitoisuus on terveiksi määritellyillä korkeampi kuin sairailta. Ikä on yksi harvoista tutkimuksessa vertailuista asioista, joissa terveillä on matalammat pitoisuudet kuin vastaavan ryhmän sairailta. Voisi olla, että sairailta elimistö on mennyt matalan pitoisuuden sairastumisvaiheen ohitse akuutimpaan puolustusta vaativaan tilaan, minkä vuoksi MMP-8-tasot on jouduttu nostamaan korkeammiksi kuin vastaavan ikäluokan terveillä.

MMP-8:a voisi käyttää laboratoriotestinä, sillä se on merkittävä biomarkkeri monille kroonisille sairauksille. Viitearvot määritellään terveestä väestöstä, ottaen ääripäistä 2,5 % havainnoista pois. MMP-8:n pitoisuus 2,5 ja 97,5 persentiilien välillä on 5,33-241,2 ng/ml kaikille, naisille 5,61-250,1 ng/ml ja miehille 4,96-217,9 ng/ml. MMP-8:n jakauma on selkeästi vasemmalle vino, eli matalat pitoisuudet ovat todella yleisiä, ja suhteellisen korkeat pitoisuudet varsin harvinaisia. Pitoisuus oli keskimäärin 50,01 ng/ml ja standardideviaatio 66,432. Pitoisuus laskee iän myötä, eli olisi syytä miettiä, pitäisikö eri ikäryhmille olla omat viitearvot.

Tutkielman vahvuus on suuri ja yhtenäinen aineisto, joka on myös melko luotettava, koska tiedon keruussa on käytetty virallisia rekisterejä. Tutkielman heikko puoli on, että yksi tiedon keräämisessä käytetty menetelmä oli kyselylomake, joka ei ole täysin luotettava. Tilastollisen analyysin tulokset eivät myöskään aukottomasti päde jokaiseen yksilöön. Ikä on sekoittava tekijä, ja se on jatkotutkimuksissa ja analyyseissä otettava huomioon.

## 8 Yhteenveto

MMP-8:a voisi käyttää laboratoriotestinä, sillä se on merkittävä biomarkkeri monille kroonisille sairauksille. Viitearvot määritellään terveestä väestöstä, ottaen ääripäistä 2,5 % havainnoista pois. MMP-8:n pitoisuus 2,5 ja 97,5 persentiilien välillä on 5,33-241,2 ng/ml kaikille, naisille 5,61-250,1 ng/ml ja miehille 4,96-217,9 ng/ml. Ikä vaikuttaa paljon MMP-8:n pitoisuuteen, joten eri ikäryhmille olisi hyvä luoda omat viitearvot. MMP-8:n pitoisuus laskee iän myötä, ja myös erot pitoisuudessa terveiden ja sairaiden välillä pienentyvät iän myötä. Pitoisuus on terveillä korkeampi kuin sairailta, kun tarkastellaan koko väestöä. Ikäryhmittäin tarkasteltuna ikäryhmien sisällä pitoisuus on kuitenkin sairailta korkeampi ja terveillä matalampi. Ikä vaikuttaa olevan sekoittava tekijä tutkimuksessamme.

Terveillä ja sairailta tupakoitsijoilla MMP-8-pitoisuudet ovat käytännössä samat, mutta tupakoinnin lopettaneilla erot ovat terveiden ja sairaiden välillä suuremmat kuin tupakoitsijoilla tai aina tupakoimatta olleilla. Tupakoitsijoilla ja terveillä tupakoinnin lopettaneilla on korkeammat MMP-8:n pitoisuudet aina tupakoimatta olleisiin verrattuna. Sairailta aina tupakoimatta olleilla ja sairailta tupakoinnin lopettaneilla pitoisuus on käytännössä sama.

Liikunta ja painoindeksi ovat sairailta tilastollisesti merkitsevästi yhteydessä MMP-8:n pitoisuuteen, ja fyysisesti aktiivisilla on matalimmat pitoisuudet, mutta normaalipainoisilla on korkeammat pitoisuudet kuin ylipainoisilla. Henkilöillä, joilla on metabolinen oireyhtymä, on matalampi MMP-8-pitoisuus kuin henkilöillä, joilla ei ole metabolista oireyhtymää. Diabeteksen suhteen MMP-8:n pitoisuus eroaa tilastollisesti merkitsevästi terveiden ryhmästä vain insidentin diabeteksen ryhmässä.



Tutkimusta tehdessä syntyi hypoteesi, että MMP-8:n pitoisuuden säätely mm. sydän- ja verisuonitaudeissa on eräänlainen suojausmekanismi. Terveillä pitoisuus on korkeampi kuin sairailta, koska sairailta aineenvaihdunnan ja immuunipuolustuksen muutokset mahdollisesti laskevat systeemistä pitoisuutta kroonisessa tilanteessa. Kuitenkin verisuoniin on kertynyt plakkia, josta elimistö vapauttaa ison määrän paikallisesti tuotettua MMP-8:a plakin repeämisen yhteydessä. Lisäksi elimistön puolustusvaste saattaa muutenkin nostaa akuutissa tilanteessa pitoisuuksia. MMP-8:n pitoisuus on suoraan yhteydessä CRP:hen ja erityisen voimakkaasti fibrinogeenin, jonka verta hyydyttävää vaikutusta MMP-8 pystyy vähentämään (129). Eli kun MMP-8:a runsaasti sisältävä plakki on repeytynyt, ja se aiheuttaa verisuonitukosta, niin fibrinogeeni ei kuitenkaan pääsisi enää pahentamaan tukosta.

Tässä tutkimuksessa MMP-8:n pitoisuudet olivat matalat tutkittavilla sydän- ja verisuonisairauksia sairastavilla henkilöillä, mutta kyse olikin kroonisesti sairaiden tilanteesta näytteenottohetkellä. Suositeltavaa on, että pitoisuutta alettaisiin tutkia sydän- ja verisuonisairauksien suhteen niin, että saataisiin lisää tietoa siitä, miten pitoisuus muuttuu taudin kehittyessä ja huomioida tämäkin viitearvoissa.

## Lähdeluettelo

- (1) Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006;17(4):217-223.
- (2) Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2004;4(8):617-629.
- (3) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 2003;92(8):827-839.
- (4) Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(31):21491-21494.
- (5) Vanessa J Craig, Li Zhang, James S Hagood, Caroline A Owen. Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (Online) 2015;53(5):585-600.
- (6) Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8(3):221-233.
- (7) Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014;15(3):1085-1091.
- (8) Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 2000;14(17):2123-2133.
- (9) Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics* 2003;4(7):544-558.
- (10) Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2016;12(1):28-35.
- (11) Kormi I, Nieminen MT, Havulinna AS, Zeller T, Blankenberg S, Tervahartiala T, et al. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 predict incident cardiovascular disease events and all-cause mortality in a population-based cohort. *European Journal of Preventive Cardiology* 2017;24(11):1136-1144.
- (12) Fingleton B. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2017;1864(11 Pt A):2036-2042.
- (13) Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinase8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011;22(2):73-81.

- (14) Hao Y, Niu Z, Wang G, Zhou X, Hu T. [Expression of matrix metalloproteinase-8 on the bell-stage in human and rat tooth development]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* (=West China journal of stomatology) 2004;22(1):26-28.
- (15) Roy R, Zhang B, Moses MA. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. *Experimental Cell Research* 2006;312(5):608-622.
- (16) Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O, Ritchlin C, Saari H, Suomalainen K, et al. Collagenase in synovitis of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1992;22(1):44-53.
- (17) Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* 2004;10(6):311-318.
- (18) Vanlaere I, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clinical Microbiology Reviews* 2009;22(2):224-239, Table of Contents.
- (19) Marcaccini AM, Novaes AB, Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clinica Chimica Acta* 2009;409(1-2):117-122.
- (20) Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee H, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine* 2006;38(5):306-321.
- (21) Åström P, Juurikka K, Hadler-Olsen ES, Svineng G, Cervigne NK, Coletta RD, et al. The interplay of matrix metalloproteinase-8, transforming growth factor- $\beta$ 1 and vascular endothelial growth factor-C cooperatively contributes to the aggressiveness of oral tongue squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2017;117(7):1007-1016.
- (22) Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer* 2002;2(9):657-672.
- (23) Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 2004;385(11):997-1006.
- (24) Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(14):5578-5582.
- (25) Bläser J, Knäuper V, Osthus A, Reinke H, Tschesche H. Mercurial activation of human polymorphonuclear leucocyte procollagenase. *European Journal of Biochemistry* 1991;202(3):1223-1230.

- (26) Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 2001;107(9):1117-1126.
- (27) Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochemical Journal* 1977;162(1):195-197.
- (28) Hasty KA, Hibbs MS, Kang AH, Mainardi CL. Secreted forms of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 1986;261(12):5645-5650.
- (29) Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 1985;227(4688):747-749.
- (30) Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104(16):1899-1904.
- (31) Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen M, Tervahartiala T, Pirilä E, et al. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *The Journal of Pathology* 2001;194(2):217-224.
- (32) Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *Journal of Dental Research* 2000;79(12):1969-1977.
- (33) Prikk K, Maisi P, Pirilä E, Sepper R, Salo T, Wahlgren J, et al. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *The Journal of Pathology* 2001;194(2):232-238.
- (34) Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(50):31504-31509.
- (35) Salminen A, Vlachopoulou E, Havulinna AS, Tervahartiala T, Sattler W, Lokki M, et al. Genetic Variants Contributing to Circulating Matrix Metalloproteinase 8 Levels and Their Association With Cardiovascular Diseases: A Genome-Wide Analysis. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 2017;10(6).
- (36) Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion therapy-What's with the obstructed, leaky and broken capillaries? *Pathophysiology* 2017;24(4):213-228.
- (37) Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 1987 Jul;262(21):10048-10052.

- (38) Tester AM, Cox JH, Connor AR, Starr AE, Dean RA, Puente XS, et al. LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity. *PLoS ONE* 2007;2(3):e312.
- (39) Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Nature Reviews Immunology* 2007;219:88-102.
- (40) Sirniö P, Tuomisto A, Tervahartiala T, Sorsa T, Klintrup K, Karhu T, et al. High-serum MMP-8 levels are associated with decreased survival and systemic inflammation in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2018;119(2):213-219.
- (41) Negishi H, Endo N, Nakajima Y, Nishiyama T, Tabunoki Y, Nishio J, et al. Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019.
- (42) Friedrichs B, Neumann U, Schüller J, Peck MJ. Cigarette-smoke-induced priming of neutrophils from smokers and non-smokers for increased oxidative burst response is mediated by TNF- $\alpha$ . *Toxicology in Vitro* 2014;28(7):1249-1258.
- (43) Zhu G, Li C, Cao Z. Inhibitory effect of flavonoid baicalin on degranulation of human polymorphonuclear leukocytes induced by interleukin-8: potential role in periodontal diseases. *Journal of Ethnopharmacol* 2007;109(2):325-330.
- (44) Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hänström L, Kalfas S. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research* 2002;37(5):353-359.
- (45) Ding Y, Haapasalo M, Kerosuo E, Lounatmaa K, Kotiranta A, Sorsa T. Release and activation of human neutrophil matrix metallo- and serine proteinases during phagocytosis of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Journal of Clinical Periodontology* 1997;24(4):237-248.
- (46) Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Laboratory Investigation* 1996;74(1):232-240.
- (47) Abe M, Kawamoto K, Okamoto H, Horiuchi N. Induction of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1beta in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2001;36(3):153-159.
- (48) Djurić T, Zivković M, Stanković A, Kolaković A, Jekić D, Selaković V, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with carotid atherosclerosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2010;24(4):246-251.
- (49) Diekmann O, Tschesche H. Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1994;27(8):1865-1876.

- (50) Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271(18):11023-11026.
- (51) Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PRF, Naylor AR, et al. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation* 2004;110(3):337-343.
- (52) Tuomainen AM, Nyysönen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen T, Salonen JT, et al. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007;27(12):2722-2728.
- (53) Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, et al. Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events. *European Journal of Preventive Cardiology* 2014;21(7):806-812.
- (54) Pussinen PJ, Sarna S, Puolakkainen M, Öhlin H, Sorsa T, Pesonen E. The balance of serum matrix metalloproteinase-8 and its tissue inhibitor in acute coronary syndrome and its recurrence. *International Journal of Cardiology* 2013;167(2):362-368.
- (55) Peeters W, Moll FL, Vink A, van der Spek, Peter J., de Kleijn, Dominique P. V., de Vries, Jean-Paul P. M., et al. Collagenase matrix metalloproteinase-8 expressed in atherosclerotic carotid plaques is associated with systemic cardiovascular outcome. *European Heart Journal* 2011;32(18):2314-2325.
- (56) Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92(3):657-671.
- (57) Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiology in Review* 2000;8(1):31-39.
- (58) Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British Heart Journal* 1993;69(5):377-381.
- (59) Anzai T. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. *Circulation Journal* 2018;82(3):629-635.
- (60) Steinl DC, Kaufmann BA. Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16(5):9749-9769.
- (61) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation* 1994;94(6):2493-2503.
- (62) Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187(1):161-169.

- (63) Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;748:501-507.
- (64) Loftus IM, Naylor AR, Bell PRF, Thompson MM. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *British Journal of Surgery* 2002;89(6):680-694.
- (65) McCullagh KG. Increased type I collagen in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1983;46(2):247-248.
- (66) McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *The Journal of Pathology* 1980;130(1):45-55.
- (67) Morton LF, Barnes MJ. Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III and V. *Atherosclerosis* 1982;42(1):41-51.
- (68) Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Collagen and Related Research* 1985;5(4):355-368.
- (69) Voss B, Rauterberg J. Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method. *Pathology Research and Practice* 1986;181(5):568-575.
- (70) Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1992;12(4):494-502.
- (71) Mayne R, Vail MS, Miller EJ. Characterization of the collagen chains synthesized by cultured smooth muscle cells derived from rhesus monkey thoracic aorta. *Biochemistry* 1978;17(3):446-452.
- (72) Rekhter MD, Zhang K, Narayanan AS, Phan S, Schork MA, Gordon D. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *The American Journal of Pathology* 1993;143(6):1634-1648.
- (73) Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation Journal* 2005;69(9):1035-1040.
- (74) Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Adachi T, et al. High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina. *Atherosclerosis* 2010;209(1):206-210.
- (75) Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Current Opinion in Lipidology* 2006;17(5):556-561.

- (76) D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117(6):743-753.
- (77) Gutiérrez-Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ, Pilgrim S, et al. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Research* 2008;68(8):2755-2763.
- (78) Pellinen T, Rantala JK, Arjonen A, Mpindi J, Kallioniemi O, Ivaska J. A functional genetic screen reveals new regulators of  $\beta$ 1-integrin activity. *Journal of Cell Science* 2012;125(Pt 3):649-661.
- (79) Soria-Valles C, Gutiérrez-Fernández A, Guiu M, Mari B, Fueyo A, Gomis RR, et al. The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene* 2014;33(23):3054-3063.
- (80) Palavalli LH, Prickett TD, Wunderlich JR, Wei X, Burrell AS, Porter-Gill P, et al. Analysis of the matrix metalloproteinase family reveals that MMP8 is often mutated in melanoma. *Nature Genetics* 2009;41(5):518-520.
- (81) Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A, et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature Genetics* 2003;35(3):252-257.
- (82) Montel V, Kleeman J, Agarwal D, Spinella D, Kawai K, Tarin D. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression. *Cancer Research* 2004;64(5):1687-1694.
- (83) Agarwal D, Goodison S, Nicholson B, Tarin D, Urquidi V. Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenic human breast cancer model. *Differentiation* 2003;71(2):114-125.
- (84) Decock J, Hendrickx W, Vanleeuw U, Van Belle V, Van Huffel S, Christiaens M, et al. Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer* 2008;8:77.
- (85) Korpi JT, Kervinen V, Mäklin H, Väänänen A, Lahtinen M, Läärä E, et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *British Journal of Cancer* 2008;98(4):766-775.
- (86) Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *European Journal of Cancer* 2003;39(17):2499-2505.
- (87) Stenman M, Paju A, Hanemaaijer R, Tervahartiala T, Leminen A, Stenman U-, et al. Collagenases (MMP-1, -8 and -13) and trypsinogen-2 in fluid from benign and malignant ovarian cysts. *Tumor Biology* 2003;24(1):9-12.



- (88) Kuropkat C, Duenne AA, Herz U, Renz H, Werner JA. Significant correlation of matrix metalloproteinase and macrophage colony-stimulating factor serum concentrations in patients with head and neck cancer. *Neoplasma* 2004;51(5):375-378.
- (89) Moilanen M, Pirilä E, Grénman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology* 2002;197(1):72-81.
- (90) Väyrynen JP, Vornanen J, Tervahartiala T, Sorsa T, Bloigu R, Salo T, et al. Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *International Journal of Cancer* 2012;131(4):463.
- (91) Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry* 1995;64:403-434.
- (92) Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, Pendás AM, López JM, Jiménez MG, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(37):23959-23968.
- (93) Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *Journal of Surgical Research* 1999;81(2):189-195.
- (94) Impola U, Jeskanen L, Ravanti L, Syrjänen S, Baldursson B, Kähäri V-, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 and loss of MMP-19 and p16 are associated with malignant progression in chronic wounds. *British Journal of Dermatology* 2005;152(4):720-726.
- (95) Nardin M, Verdoia M, Negro F, Rolla R, Tonon F, De Luca G. Impact of active smoking on the immature platelet fraction and its relationship with the extent of coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation* 2019:e13181.
- (96) Wang Y, Tao H, Paxton RJ, Wang J, Mubarik S, Jia Y, et al. Post-diagnosis smoking and risk of cardiovascular, cancer, and all-cause mortality in survivors of 10 adult cancers: a prospective cohort study. *American Journal of Cancer Research* 2019;9(11):2493.
- (97) Kianoush S, Yakoob MY, Al-Rifai M, DeFilippis AP, Bittencourt MS, Duncan BB, et al. Associations of Cigarette Smoking With Subclinical Inflammation and Atherosclerosis: ELSA-Brasil (The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health). *Journal of the American Heart Association* 2017;6(6).
- (98) Emma R, Bansal AT, Kolmert J, Wheelock CE, Dahlen S, Loza MJ, et al. Enhanced oxidative stress in smoking and ex-smoking severe asthma in the U-BIOPRED cohort. *PLoS ONE* 2018;13(9):e0203874.

- (99) Mons U, Muscat JE, Modesto J, Richie JP, Brenner H. Effect of smoking reduction and cessation on the plasma levels of the oxidative stress biomarker glutathione--Post-hoc analysis of data from a smoking cessation trial. *Free Radical Biology and Medicine* 2016;91:172-177.
- (100) Swarup S, Goyal A, Grigorova Y, Zeltser R. Metabolic Syndrome. *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.*
- (101) Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56(14):1113-1132.
- (102) Ahonen TM, Kautiainen HJ, Keinänen-Kiukaanniemi SM, Kumpusalo EA, Vanhala MJ. Gender difference among smoking, adiponectin, and high-sensitivity C-reactive protein. *American Journal of Preventive Medicine* 2008;35(6):598-601.
- (103) Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Ehnholm C, Taskinen M. Metabolic syndrome aggravates the increased endothelial activation and low-grade inflammation in subjects with familial low HDL. *Annals of Medicine* 2006;38(3):229-238.
- (104) Ahonen TM, Saltevo JT, Kautiainen HJ, Kumpusalo EA, Vanhala MJ. The association of adiponectin and low-grade inflammation with the course of metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2012;22(3):285-291.
- (105) Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 2012;4(3):166-175.
- (106) Youm Y, Grant RW, McCabe LR, Albarado DC, Nguyen KY, Ravussin A, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metabolism* 2013;18(4):519-532.
- (107) Vandanmagsar B, Youm Y, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine* 2011;17(2):179-188.
- (108) Zmora N, Bashirdes S, Levy M, Elinav E. The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metabolism* 2017;25(3):506-521.
- (109) Kabat GC, Heo M, Allison M, Johnson KC, Ho GYF, Tindle HA, et al. Smoking Habits and Body Weight Over the Adult Lifespan in Postmenopausal Women. *American Journal of Preventive Medicine* 2017;52(3):e77-e84.
- (110) Wang Q. Smoking and body weight: evidence from China health and nutrition survey. *BMC Public Health* 2015;15.
- (111) Fransen HP, Boer JMA, Beulens JWJ, de Wit GA, Bueno-de-Mesquita HB, Hoekstra J, et al. Associations between lifestyle factors and an unhealthy diet. *European Journal of Public Health* 2017;27(2):274-278.

- (112) Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004;3(4):161-167.
- (113) Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000;18(16):1717-1720.
- (114) Goronzy JJ, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. *Current Opinion in Immunology* 2005;17(5):468-475.
- (115) Quirk H, Blake H, Tennyson R, Randell TL, Glazebrook C. Physical activity interventions in children and young people with Type 1 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Diabetic Medicine* 2014(10):1163-1173.
- (116) Myers J, McAuley P, Lavie CJ, Despres J, Arena R, Kokkinos P. Physical activity and cardiorespiratory fitness as major markers of cardiovascular risk: their independent and interwoven importance to health status. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2015;57(4):306-314.
- (117) Pandey A, LaMonte M, Klein L, Ayers C, Psaty BM, Eaton CB, et al. Relationship Between Physical Activity, Body Mass Index, and Risk of Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2017;69(9):1129-1142.
- (118) Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003;300(5622):1140-1142.
- (119) Keske MA, Premilovac D, Bradley EA, Dwyer RM, Richards SM, Rattigan S. Muscle microvascular blood flow responses in insulin resistance and ageing. *The Journal of Physiology (London)* 2016;594(8):2223-2231.
- (120) Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-1053.
- (121) Bundy JD, Li C, Stuchlik P, Bu X, Kelly TN, Mills KT, et al. Systolic Blood Pressure Reduction and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality. *JAMA Cardiology* 2017;2(7):775-781.
- (122) Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers* 2018;4:18014.
- (123) Zhao X, Phan BAP, Davis J, Isquith D, Dowdy AA, Boltz S, et al. Mortality reduction in patients treated with long-term intensive lipid therapy: 25-year follow-up of the Familial Atherosclerosis Treatment Study-Observational Study. *Journal of Clinical Lipidology* 2016;10(5):1091-1097.

- (124) Navarese EP, Robinson JG, Kowalewski M, Kołodziejczak M, Andreotti F, Bliden K, et al. Association Between Baseline LDL-C Level and Total and Cardiovascular Mortality After LDL-C Lowering. *The Journal of the American Medical Association* 2018;319(15):1566-1579.
- (125) Milwidsky A, Ziv-Baran T, Letourneau-Shesaf S, Keren G, Taieb P, Berliner S, et al. CRP velocity and short-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. *Biomarkers* 2017;22(3-4):383-386.
- (126) Gitlin JD, Gitlin JI, Gitlin D. Localizing of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 1977;20(8):1491-1499.
- (127) Khan MH, Smith PN, Rao N, Donaldson WF. Serum C-reactive protein levels correlate with clinical response in patients treated with antibiotics for wound infections after spinal surgery. *The Spine Journal* 2006;6(3):311-315.
- (128) Warschkow R, Tarantino I, Folie P, Beutner U, Schmied BM, Bisang P, et al. C-reactive protein 2 days after laparoscopic gastric bypass surgery reliably indicates leaks and moderately predicts morbidity. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2012;16(6):1128-1135.
- (129) Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(42):33008-33013.