
Chapter 9

Samenvattende discussie

Inleiding

In de periode 1999-2004 is door de onderzoeksgroep waarin ik participeerde een aantal studies verricht naar de invloed van matrix metalloproteïnasen (MMP) en weefsel inhibitoren van metalloproteïnasen (TIMP) op het verloop van inflammatoir darmlijden (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD). Tevens is hierbij de rol onderzocht van verhoogde concentraties aan het ontstekingsbevorderende cytokine Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α). Al dit onderzoek heeft geresulteerd in de totstandkoming van het proefschrift dat voor u ligt. Eerst is gekeken naar de aanmaak en activiteit van de gelatinasen MMP-2 en MMP-9 in IBD versus macroscopisch normaal darmslijmvlies (*mucosa*). Vervolgens hebben we *ex vivo*, *in vivo* en/of *in vitro* de regulatie van MMP-1, -2, -3 en -9, alsmede TIMP-1 en -2, door TNF- α bestudeerd, hierbij gebruik makend van het TNF- α neutraliserende antilichaam infliximab. Van een groot aantal IBD patiënten is de genetische compositie bepaald op vaststaande plekken (*loci*) in het MMP en TIMP DNA (analyse van single nucleotide polymorphisms, SNPs) waarna een associatie werd gelegd met de corresponderende eiwit-aanmaak en met IBD susceptibiliteit (*gevoeligheid*), alsmede de uiterlijke verschijningsvorm (*fenotype*) van de ziekte van Crohn (CD). Tenslotte werd in een multivariabele statistische analyse, temidden van een aantal geselecteerde klinische parameters, de SNP compositie en de expressie van MMP- en TIMP-eiwitten gerelateerd aan de snelheid van het optreden van een diagnostisch- en chirurgisch-recidief in patiënten met de ziekte van Crohn.

Matrix metalloproteïnasen in IBD

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene beschouwing gegeven over IBD en MMPs. Binnen IBD worden twee vormen onderscheiden, te weten colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*, UC) en de ziekte van Crohn (*Crohn's disease*, CD). In patiënten met CD worden zieke stukjes darm afgewisseld met gezonde stukken en de ontsteking kan zich dwars door de hele darmwand manifesteren (*transmuraal*). In principe kan elk deel van het maag-darmkanaal worden aangetast ("van mond tot kont"), in de praktijk blijkt met name de overgang van de dunne in de dikke darm

(*ileocaecal* gebied) extra gevoelig. Bij patiënten met UC is alleen de dikke darm (het colon) aangetast, het ziekteproces is hier meer continu en beperkt zich tot het slijmvlies zonder diepere lagen van de darm aan te tasten. Na de Tweede Wereldoorlog is het jaarlijkse aantal nieuw gediagnosticeerde patiënten (*incidentie*) toegenomen en bedraagt nu ongeveer 4-9 per 100.000 inwoners in het geval van CD en 9-14 voor UC. Daardoor is ook het aantal mensen dat op enig moment één van beide ziektes heeft (ofwel: de *prevalentie*) toegenomen tot 130-175 voor CD en 240-275 voor UC per 100.000 inwoners. Een willekeurige IBD patiënt doet meestal een groot beroep op de medische zorg in termen van medicijngebruik, ziekenhuisopname en operaties (25-60% moet geopereerd worden binnen 10 jaar na diagnose). Er is dan ook veel geïnvesteerd om de oorzaken te achterhalen van IBD en ook om betere behandelmethoden te vinden. De huidige hypothese luidt dat IBD wordt veroorzaakt door een verminderde epitheliale-functie in combinatie met een verminderde niet-specifieke immuunfunctie. Dit resulteert in te hoge concentraties bacteriën in de darmwand, waardoor ons adaptieve -specifieke-immuunsysteem in de darm continu wordt gestimuleerd, met alle gevolgen van dien. Het ziekteproces kan hierbij nog verergerd worden omdat is aangetoond dat bepaalde immuuncellen in patiënten met IBD, bijvoorbeeld lymfocyten en neutrofielen, veel minder gevoelig zijn geworden voor geprogrammeerde celdood (*apoptose*) en aldus langer hun vernietigende werk kunnen blijven doen. De geactiveerde immuuncellen scheiden zeer veel cytokines en chemokines af, die andere cellen zoals epitheel en fibroblasten eveneens activeren en ervoor zorgen dat nieuwe immuuncellen vanuit het bloed in de darmwand terecht komen. De bacteriën worden bestreden met reactieve zuurstofradicalen, perforine en granzymes (bepaalde celdodende eiwitten), antilichamen, complement en proteasen, zoals de serine-proteasen en MMPs. Deze stoffen zijn echter in grote hoeveelheden niet alleen schadelijk voor bacteriën, maar zijn dat ook voor het eigen darmweefsel. Hierdoor wordt de darmwand nog verder verzwakt, komen nog meer bacteriën binnen waardoor een spiraal naar beneden ontstaat die vaak alleen nog maar kan worden onderbroken door het chirurgisch verwijderen van het zieke stuk darmweefsel.

Matrix Metalloproteïnasen (MMPs) knippen andere eiwitten kapot (protease functie) en doen dat het best bij een pH van rond de 7. In mensen zijn tot nu 23 verschillende MMPs gevonden, welke worden onderverdeeld in zogenaamde collagenasen, gelatinasen, matrilysinen, stromelysinen, membraan-gebonden MMPs en een overige groep. In elk gezond persoon spelen MMPs een belangrijke rol in processen waarbij weefsel moet worden vervangen en/of opnieuw gemodelleerd, zoals bij de groei van een foetus, de continue vervanging van de darmwand en opperhuid, wondheling, etc. Tevens spelen ze een belangrijke rol in ziektes, zoals bij diverse vormen van kanker, waar ze de infiltratie en uitzaaiing van tumorcellen kunnen versterken of juist tegengaan. Elk MMP heeft zijn eigen voorkeur voor welke eiwitten hij het beste knipt (*substraatspecificiteit*). Gezamenlijk zijn de MMPs in staat een groot aantal eiwitten te knippen, zoals collageen I-XI, proteoglycanen, elastine, laminine, vitronectine, tenascin, entactine and fibronectine. Naast bovengenoemde structuur-eiwitten kunnen bijvoorbeeld ook cytokines als Interleukine 8 (IL-8) en Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) geknipt worden. De door de MMPs bewerkstelligde knip in een eiwit is vaak een eerste stap in de afbraak hiervan, maar kan juist ook een eiwit activeren, bijvoorbeeld in het geval van IL-8. Gezien hun potentieel gevaarlijke rol wordt de aanmaak van MMPs in diverse cellen op verschillende niveaus strikt gereguleerd. Cytokines, chemokines, groeifactoren en oxidatie-status kunnen de aanmaak van MMPs omhoog of juist naar beneden schroeven, vaak in interactie met elkaar en ook nog eens afhankelijk van celtype. Methylering en acetylering van DNA en van DNA-bindende histon-eiwitten spelen ook een belangrijke rol, evenals de genetische compositie op SNP loci in het DNA gebied met de on/off switch voor MMP-productie (*promoter gebied*). Verder is het MMP messenger-RNA (mRNA) vertaalproces streng gereguleerd evenals de uitscheiding (*excretie*) van MMPs door cellen. De meeste MMPs worden bovendien geproduceerd in een inactieve vorm en moeten geactiveerd worden door andere proteasen als plasmine, thrombine, trypsine of bijvoorbeeld andere MMPs, uiteraard weer op een gecoördineerde en gecontroleerde manier. Geactiveerde MMPs zijn nooit lang actief, ze binden namelijk al snel aan een lid van de TIMP groep en worden hierdoor geremd. Op dit moment zijn in mensen vier verschillende TIMPs

gevonden. De aanmaak van deze eiwitten en de controle hierop lijkt wel wat op dat van de MMPs, al zijn er individuele verschillen. Naast MMP remming zijn TIMPs ook betrokken bij processen als celgroei, -proliferatie en -dood. Andere, meer algemene niet-MMP-specifieke proteasen kunnen ook binden aan MMPs en deze remmen. Het lipoproteïne gerelateerde-receptor proteïne (LRP) verwijdert tenslotte MMPs uit de circulatie waarna deze intracellulair worden afgebroken in zogenaamde lysosomale blaasjes. Voorgaande studies hebben een grote toename laten zien in de aanmaak van één of meer MMP-leden in de darmwand van IBD patiënten. In muizen- en ratten-IBD-modellen blijkt tevens dat de ontstekingscore naar beneden kan worden gebracht door de toediening van synthetische MMP-remmers, hetgeen een grote rol voor MMPs in het ziekteproces van IBD suggereert.

Aanmaak en regulering van matrix metalloproteïnasen in IBD

In de eerste studie (**hoofdstuk 2**) van dit proefschrift is gekeken naar de expressie van gelatinase-type MMP-2 en MMP-9 in IBD weefsel. Van 16 patiënten met CD, 14 met UC en 16 normale controles werd operatief verkregen darmmucosa gehomogeniseerd en met behulp van de ELISA techniek geanalyseerd op het voorkomen van beide gelatinasen. Zowel MMP-2 als MMP-9 eiwit zijn, afhankelijk van de ontstekingsgraad, verhoogd aanwezig in IBD weefsel, en met behulp van de RT-PCR techniek kon dit patroon ook op mRNA nivo worden aangetoond. Zymografie analyse liet zien dat de actieve- en pro-enzymvormen van beide MMPs verhoogd aanwezig zijn, maar in een bio-activiteitsassay was alleen MMP-9 significant verhoogd. Met behulp van immunohistochemie kon worden aangetoond dat MMP-2 voornamelijk in het bindweefsel tussen mucosa en darmspier (*submucosa*) wordt aangemaakt, terwijl de bron van MMP-9 productie de polymorfonucleaire leukocyten (PMNL) lijken te zijn. Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerder gepubliceerde studies en duiden op een rol van MMP-2 en MMP-9 in, respectievelijk, het stromale- en inflammatoire-proces.

In een vervolgstudie werd onderzocht of er een TNF- α -afhankelijkheid in de regulatie van MMP-1, -2, -3 en -9 en TIMP-1 en -2 bestaat (**hoofdstuk 3**). Direct na operatie werd restant darmmucosa van volwassen IBD- en controle-patiënten

opgeknipt en in kleine stukjes gedurende drie dagen gekweekt onder gecontroleerde omstandigheden. De 3-daags cumulatieve productie van alle onderzochte MMPs in het kweek medium, bepaald door middel van ELISA en/of BIA, was significant groter in IBD-vergeleken met controleweefsel. Het toevoegen van het TNF- α -neutraliserende antilichaam infliximab resulteerde in een afname van MMP-1 en -3 totale- en netto activiteit, terwijl ook de expressie van MMP-9 relatief ten opzichte van TIMP een afname liet zien. Toevoeging van Pokeweed Mitogen (PWM), een B/T lymfocyt activator, induceerde de expressie van de genoemde MMPs, welke voor een deel werd tegengegaan door gelijktijdige aanwezigheid van infliximab. Het lijkt er dus op dat in geval van MMP-1, -3 en -9 de productie gedeeltelijk wordt bepaald door TNF- α , zowel in IBD- als controleweefsel. Echter, toevoeging van PWM reduceerde de MMP-2 productie met 50%, terwijl infliximab geen enkel effect had, hetgeen erop wijst dat in geval van dit gelatinase andere regulatie-mechanismen een grotere rol spelen. De regulatie door TNF- α van MMP-1, -3 en -9 lijkt bovendien afhankelijk te zijn van de genetische compositie op SNP plekken. De effecten van infliximab en PWM op MMP-9 productie waren bijvoorbeeld veel groter in patiënten met het CC vergeleken met het CT of TT genotype op SNP MMP-9 -1562 C/T. Deze resultaten wijzen op een beschermende rol van MMP-2 en een beschadigende rol van MMP-1, -3 en -9 in weefselmodellering, welke balans verstoord is in CD en UC en hersteld zou kunnen worden door infliximab.

Vervolgens hebben wij in de patiënt zelf (*in vivo*) gekeken naar het aandeel van TNF- α in de regulatie van gelatinase-type MMP-2 en MMP-9, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**. De serumwaardes van deze eiwitten werden gemeten in twee CD patiëntengroepen. De ene groep werd behandeld voor fistels (buisvormige zweren tussen darmen onderling of tussen darm en huid) en de andere groep werd behandeld voor ontstekingen in de darm ($n = 38$ en 31 , respectievelijk). De patiënten met fistels kregen infliximab toegediend op $t = 0, 2$ en 6 weken. Gedurende deze periode nam het serum MMP-2 geleidelijk toe, om daarna weer te dalen. In tegenstelling tot MMP-2 nam het serum MMP-9 juist af gedurende de eerste 6 weken, om daarna weer toe te nemen. In de patiëntengroep met actieve ziekte werden dezelfde effecten geregistreerd, vooral bij hogere infliximab doses.

In deze groep bleek ook de intensiteit van immunohistochemische aankleuring van MMP-9 positieve PMNLs te verminderen na infliximab infusie. In aparte bloedkweek-experimenten bleek de hoeveelheid van MMP-2 in CD lager te liggen vergeleken met dat van controles. Deze spiegels konden niet worden beïnvloed door toevoeging van het immuno-activerende lipopolysaccharide (LPS) of infliximab, waarschijnlijk vanwege het ontbreken van MMP-2 mRNA in de bloedleukocyten. De productie van MMP-9 lag echter hoger in het bloed van CD-patiënten versus dat van controles, kon worden gestimuleerd met LPS en, althans op het mRNA nivo, weer naar beneden worden gebracht met infliximab.

Associatie van MMPs en TIMPs met IBD susceptibiliteit en fenotype

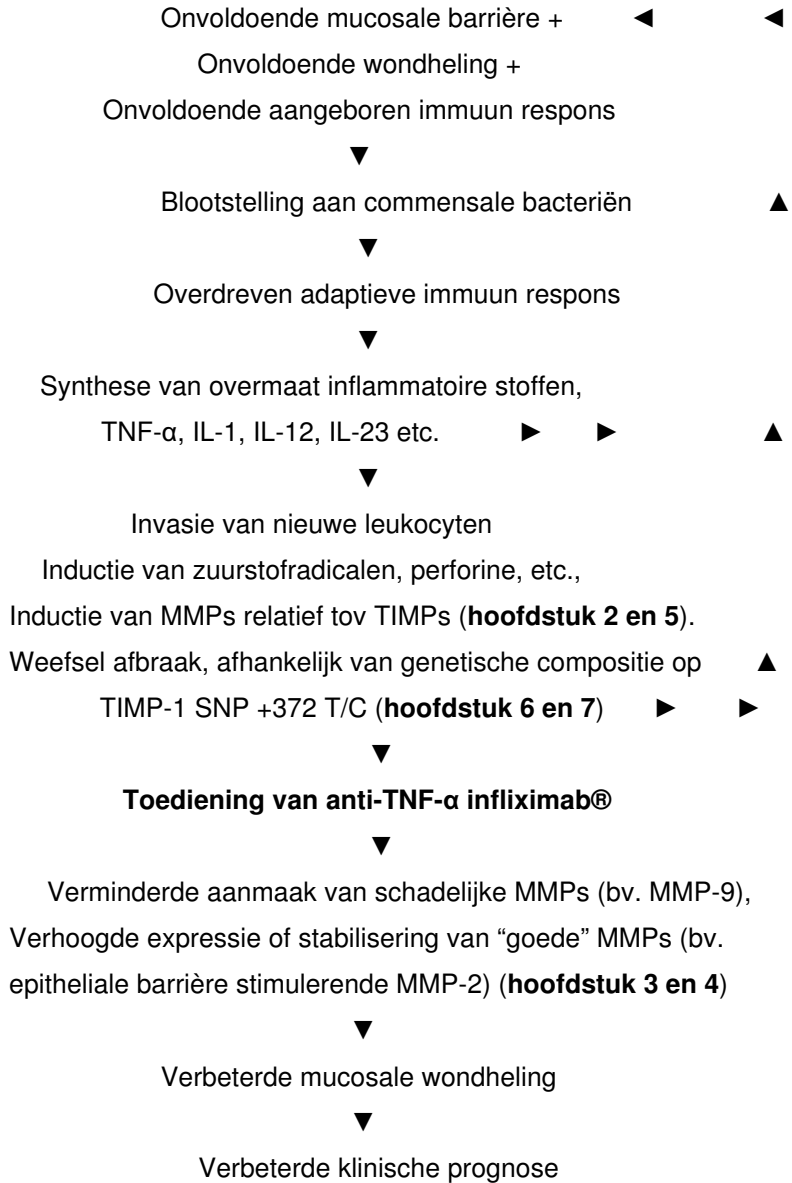
Gezien de veranderingen die waren gevonden in de expressie en regulatie van de MMPs en TIMPs in IBD was het van belang te onderzoeken of deze werden gestuurd door het fenotype van de ziekte en de genetische opmaak van de IBD-patiënten. Daarom werd eerst een studie uitgevoerd als beschreven in **hoofdstuk 5**, waarin de totale hoeveelheid eiwit en activiteit van MMP-1, -2, -3 en, -9 alsmede TIMP-1 en -2 is gemeten in darmmucosa van 122 CD, 20 UC en 62 controle patiënten in relatie tot ziekte activiteit en bij CD-patiënten in relatie tot het fenotype. Alle MMPs bleken verhoogd aanwezig te zijn in ontstoken IBD-weefsel, aangetoond met ELISA en/of BIA met voorafgaande p-amino-phenyl-mercuric-acetate (APMA) activering. De MMPs waren ook verhoogd relatief vergeleken met TIMPs, wat gepaard ging met een verhoging van de netto MMP-activiteit (aangetoond door middel van BIA zonder voorafgaande APMA behandeling). Zo was bijvoorbeeld de totale MMP-3 hoeveelheid 18,6 Units (U)/mg en de netto MMP-3 activiteit 5,7 U/mg in ontstoken IBD-weefsel, terwijl in controle-weefsel MMP-3 niet eens gemeten kon worden (0,0 U/mg, $P < 0,001$). In ontstoken CD-weefsel was de mate van bindweefselvorming (*fibrosing*) niet van belang voor de expressie van MMPs en TIMPs. Evenmin was de aanmaak van deze eiwitten niet geassocieerd met het wel of niet optreden van fistels gedurende de follow-up. Tenslotte bleek de expressie van alle MMPs en TIMPs slechts gedeeltelijk naar

beneden gebracht te kunnen worden door middel van behandeling van de patiënt met immunosuppressieve medicatie als corticosteroïden of azathioprine. Vervolgens hebben we gekeken of wellicht genetische variabiliteit in MMP, TIMP of TNF- α een invloed zou kunnen hebben op eiwit-expressie en op IBD susceptibiliteit en CD fenotype (**hoofdstuk 6**). Genomisch DNA werd gewonnen uit het bloed en/of operatie weefsel van 134 CD en 111 UC patiënten versus 248 controles, waarna het werd geanalyseerd met behulp van de restriction fragment length polymorphism (RFLP)-techniek en met tetra primer amplification refractory mutational system (ARMS)-PCR. Het T-(mannen) en TT-(vrouwen)genotype op SNP TIMP-1 +372 T/C bleek vaker voor te komen in CD patiënten vergeleken met controles. De TIMP-1 eiwit expressie was lager in het ontstoken weefsel van mannelijke IBD patiënten met het TIMP-1 T allel vergeleken met patiënten die drager zijn van het C allel, maar dit kon voor CD patiënten niet worden aangetoond en evenmin voor vrouwen. Het TIMP-1 C allel lijkt geassocieerd met de (latere) ontwikkeling van fistels in vrouwelijke CD patiënten. Het 5T5T genotype van SNP MMP-3 -1613 5T/6T is geassocieerd met een lagere kans op aanwezigheid van het CD ziekteproces in het colon tijdens de eerste diagnose, maar ook met een verhoogde kans op de ontwikkeling van stricturen gedurende follow-up. De genetische variabiliteit op geselecteerde SNP loci van MMP-1, -2, -9, TIMP-2 en TNF- α was niet geassocieerd met CD of UC susceptibiliteit of fenotype, hetgeen een primaire rol voor deze eiwitten verderop in het IBD ziekteproces in plaats van aan het begin ervan veronderstelt. De controle-groep bestond voor een deel uit colorectale carcinoompatiënten, waarvan uit het operatiepreparaat wat normaal darmmucosa op ongeveer 10 cm van het kankergezwell was genomen. Aangezien dit van invloed had kunnen zijn op de genetische resultaten werden alle analyses herhaald met alleen de gezonde vrijwilligers in de controle-groep, wat dezelfde uitkomsten gaf. In de afsluitende studie (**hoofdstuk 7**) zijn de resultaten van de genetische variabiliteit op bovengenoemde MMP, TIMP en TNF-SNPs alsmede eiwitniveaus gekoppeld aan de klinische prognose van CD. Patiënten met het T-allel op SNP TIMP-1 +372 T/C bleken na operatie sneller (10,7 jaren) wederom onder het mes te moeten vergeleken met patiënten zonder deze SNP variant (19,1 jaren). Het effect verloor maar net zijn significantie in een multivariate analyse

gebruik makend van geselecteerde klinisch-pathologische kenmerken als geslacht, leeftijd bij operatie, etc. Verder bleek een lage TIMP-1 expressie (<2,88 ng/mg) in niet-ontstoken CD-weefsel geassocieerd met een verhoogde kans op operatieve resectie. Dit werd tevens gevonden voor TIMP-2, en merkwaardig genoeg, ook voor MMP-9. Het MMP of TIMP nivo in ontstoken weefsel was in dit opzicht niet van belang. In onze analyses bleek het roken van sigaretten een belangrijke prognostische variabele voor een diagnostisch- en chirurgisch- recidief. Onze MMP en TIMP resultaten hebben echter waarschijnlijk niets te maken met het roken, omdat geen enkele relatie tussen MMPs, TIMPs en rookgedrag kon worden aangetoond, ook niet in de multivariate analyses. Een belangrijke conclusie die getrokken kan worden uit hoofdstukken 6 en 7 is dat het TIMP-1 SNP +372 T allel mogelijk de expressie van TIMP-1 negatief beïnvloedt, waardoor de balans tussen MMP en TIMP verschuift naar een meer proteolytisch fenotype wat de susceptibiliteit voor CD verhoogt en tevens leidt tot een slechtere prognose van CD.

MMPs en TIMPs in IBD: een verstoord evenwicht?

De huidige hypothese luidt dat IBD veroorzaakt wordt door een overdreven immuunreactie tegen commensale bacteriën in genetisch vatbare personen. In dit proefschrift is aangetoond dat een verstoord evenwicht tussen MMPs en TIMPs betrokken is in de pathogenese van IBD, zie figuur 1, volgende bladzijde. De chronische zweren, fistels, insnoeringen (*fissuren*) en fibrosering, zoals die kunnen voorkomen in de darm van IBD patiënten, kunnen het gevolg zijn van een verminderde mucosale barrière. De zogenaamde basaalmembraan onder epitheel- en endotheelcellen verleent steun, flexibele mechanische weerstand en scheidt weefselcompartimenten. Het bestaat uit meerdere lagen collageen IV en laminine, met elkaar verbonden door nidogeen en heparansulfaat-proteoglycaan perlecan, maar bevat ook andere eiwitten als collageen VII fibrillen, fibuline, fibronectine, osteonectine, enz. Basaalmembraan-eiwitten zouden heel goed betrokken kunnen zijn bij IBD susceptibiliteit en in lijn hiermee is recent een genetische associatie van extracellulaire matrixproteïne-1 (een biologische “lijm”) met UC maar niet met CD gevonden.



Figuur 1. Schematische presentatie van MMPs en TIMPs in de pathogenese van IBD. Toediening van het anti TNF- α antilichaam infliximab® herstelt de cruciale MMP versus TIMP balans, stimuleert herstel van de darm barrière functie en verbetert de klinische prognose van IBD patiënten.

De chronische wonden in IBD patiënten zouden ook het gevolg kunnen zijn van niet-adequate wondheling. Verwonding resulteert in eerste instantie in de snelle vorming van het welbekende bloedkorstje, waarna het langzamere weefselherstel kan beginnen. Als eerste stap hiertoe bindt de urokinase-type plasminogen activator-receptor (uPAR) het uPA, welke vervolgens plasminogeen knipt tot actief plasmine. Dit laatste eiwit knipt niet alleen het fibrine (wat het tijdelijk bloed korstje vormt) maar activeert, in nauwe samenwerking met andere proteïnasen als membraan-gebonden MMPs en chymotrypsine, ook verschillende leden van de MMP familie waardoor beschadigd collageen matrix afgebroken kan worden tot een gelatine “soep”. Dit proces verloopt normaal gesproken onder strenge controle: de MMP activiteit wordt gereguleerd door TIMPs, auto- en substraat geïnduceerde-activering, inactivering en degradatie. De collageen fragmenten worden uit de extracellulaire matrix verwijderd door uPAR-geassocieerde-proteïne (uPARAP) gemedieerde endocytose en worden vervolgens vernietigd in lysosomale blaasjes. Tegelijkertijd maken epitheliale cellen en fibroblasten nieuw collageen en andere matrixcomponenten, wat uiteindelijk mede het nieuwe weefsel vormt en het bloedkorstje vervangt. De MMPs spelen niet alleen een belangrijke en directe rol in weefsel-hermodellering, maar zijn ook van belang in het faciliteren van epitheliale proliferatie, differentiatie, apoptose en daarmee in het proces van epitheliale wondsluiting. Hierbij kunnen diverse MMPs een verschillende rol spelen. Zo stimuleert MMP-2 epiheliale cellen en helpt ze overleven, terwijl voor MMP-9 juist een tegenovergestelde rol is weggelegd. Verder is het zo dat door het hermodellieren van weefsel de in matrix opgeslagen cytokines vrijkomen, die na activering door MMPs nieuwe leukocyten naar de wondplek lokken. Verschillende studies hebben aangetoond dat chronische niet-helende wonden een overmaat aan MMPs hebben. Kunstmatige overexpressie van MMP-1 in transgene muizen was geassocieerd met een vertraagde wondheling. Applicatie van een hydroactieve dressing met superabsorberende polyacrylaat-deeltjes verwijderde MMPs uit de wond en was geassocieerd met een verbeterde genezing. Wellicht de beste illustratie van wat er kan gebeuren in geval van een overmaat aan MMPs wordt gegeven door de snake venom (*slangengif*) metalloproteïnasen. Deze

eiwitten, aanwezig in slangengif, knippen endotheelcellen van mekaar en lossen de basaalmembraan op, met ernstige bloeditstoringen tot gevolg.

Fibrose, vaak gezien in CD, zou het gevolg kunnen zijn van te weinig MMP in verhouding tot TIMP, in combinatie met een verhoogde collageenproductie. Een alternatieve verklaring zou kunnen zijn dat hoge niveaus van MMPs de migratie van fibroblasten zouden kunnen faciliteren en op die manier fibrose juist zouden kunnen stimuleren. Recent heeft een groep auteurs aangetoond dat MMP-3 epitheliale cellen in cellen met mesenchymale eigenschappen kan transformeren, waardoor hun collageenproductie werd verhoogd en het fibrotische fenotype werd gestimuleerd. De rol van TIMPs kent eveneens vele gezichten. Het remmen van MMPs is belangrijk voor het fine tunen van de weefselmodellering. Aan de andere kant is TIMP-2 noodzakelijk voor de activatie van MMP-2 en van verscheidene TIMPs is aangetoond dat ze een rol spelen bij celdifferentiatie, proliferatie en apoptose. Het moge duidelijk zijn dat wondheling een subtiel proces is, waarbij een gecoördineerde aanmaak van MMPs, TIMPs en collageen een belangrijk vereiste is: zowel te weinig als teveel MMPs op verschillende tijdstippen kan resulteren in chronische zweren. Andere MMPs, zoals MMP-7 (matrilysine), MMP-8 (neutrofiel collagenase) en MMP-12 (macrofaag metallo-elastase) spelen mogelijk ook een belangrijke rol, evenals aan MMP-gerelateerde eiwitten als ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteïnase) en ADAMTSs (A Disintegrin-like And Metalloproteïnase with Thrombospondin type 1 motifS).

Onze resultaten wijzen op een overmaat aan MMP productie ten opzichte van TIMPs, resulterend in een verhoogde netto-activiteit en beschadiging van het darmweefsel, wat kan worden tegen gegaan door toediening van infliximab in zowel CD als UC patiënten. De goede klinische respons die patiënten geven na infliximab behandeling kan het gevolg zijn van een verminderde aanmaak van MMP-1, -3 en -9. Van hieruit bezien zou behandeling van UC patiënten met infliximab ook een goede optie zijn, en de resultaten van verschillende pilot-studies wijzen hier ook op. Het is verleidelijk om synthetische MMP-remmers aan IBD patiënten te geven, maar gezien de veelzijdigheid van deze eiwitten is voorzichtigheid op zijn plaats. Selectieve MMP-remming zou kunnen resulteren in

functionele substitutie door andere MMPs of ADAM(TS)s, gezien hun overlappende substraatspecificiteit. Niet-specifieke remming zou daarentegen kunnen leiden tot ernstige bijwerkingen door remming van MMPs en ADAM(TS)s welke juist bevorderlijk zijn voor het genezingsproces, zoals MMP-2. Onze resultaten voor wat betreft de genetische compositie op het TIMP-1 SNP +372 T/C suggereren een T allel veroorzaakte daling van TIMP-1 eiwitproductie, zodat MMPs meer vrij spel krijgen, waardoor de susceptibiliteit voor CD wordt verhoogd en de prognose negatief wordt beïnvloed. Remming van de overmaat MMPs met recombinant TIMP is daarom wellicht een interessant alternatief. Echter, omdat de MMP/TIMP ratios niet gerelateerd zijn aan de klinische prognose, is het niet duidelijk waar het positieve effect van het C allel vandaan komt, dit zal dus eerst bestudeerd moeten worden.

Samenvattend: het in dit proefschrift beschreven onderzoek geeft nieuwe inzichten in de rol van MMPs en TIMPs in de etiopathogenese van IBD. Toekomstige studies moeten onderzoek omvatten naar de expressie van andere MMPs, ADAM(TS)s en TIMPs in darmweefsel, alsmede de genetische compositie op corresponderende relevante SNPs. Daarnaast moet er een focus gelegd worden op de identificatie van MMP degradatie-fragmenten, de fysiologische activeringscascade, remmers en substraatspecificiteit om een gedetailleerd mechanistisch inzicht te verkrijgen in metalloproteïnase-activiteit in IBD. Uiteindelijk kunnen deze studies resulteren in het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor CD en UC, en wellicht andere immunopathologiën, gebaseerd op de remming dan wel activering van één of meer leden van de veelzijdige matrix metalloproteïnase familie.

