

Om inflammatorisk tarmsykdom, samt protokollutvikling for isolasjon av enkeltceller fra colonslimhinnebiopsier

5.årsoppgave i Stadium IV – Profesjonsstudiet i medisin ved
Universitetet i Tromsø

Tobias Tysnes Krokstrand – MK06

Jim André Dahl – MK06

Veiledere:

dr.med. Rasmus Goll

prof. dr. med. Jon Florholmen

Tromsø 14.09.2011

Laboratorium for Gastroenterologi og Ernæring, Institutt for klinisk medisin,
Universitetet i Tromsø og Universitetssykehuset Nord-Norge

Resymé

Inflammatorisk tarmsykdom (IBD) omfatter primært de to tilstandene, ulcerøs kolitt (UC) og morbus Crohn (MbC). Begge tilstandene karakteriseres ved kronisk inflammasjon i fordøyelseskanalen. Etiologien er ukjent, men en teori som har blitt fremmet er dysregulasjon av immunresponsen mot den kommensale tarmflora hos genetisk predisponerte individer. Insidensen av IBD er høyere i den vestlige verden enn i utviklingsland, og Norge er et av landene med høyest registrert insidens. Tilstanden kan behandles både medikamentelt og kirurgisk. Det benyttes et bredt spekter av immunosupprimerende og immunomodulerende preparater. Biologisk behandling har de seneste årene fått stor betydning. Pionérstudier gjennom de siste årene ved Laboratorium for Gastroenterologi og Ernæring ved Universitetet i Tromsø, har vist at TNF α også er en viktig mediator ved UC. Som ett ledd i videreutvikling av prosjektet utvikles det nå en prosedyre for magnetisk separasjon (MACS) av enkeltceller fra tarmslimhinne. Vi har deltatt i arbeidet med utvikling av denne metoden over en toårsperiode. I tillegg til en utdypende redegjøring av IBD med særlig fokusering på etiologi, beskrives også den aktuelle metodeutviklingen. Våre forsøk har vist at kombinasjonen av gentleMACS og Dead Cert sammen med MACS viser lovende resultater vedrørende eliminering av debris, samtidig som positiv seleksjon av ønskede celler affiseres minimalt.

Innholdsfortegnelse

Resymé	2
1. Introduksjon	6
2. Morfologi.....	7
2.1. Colonanatomi.....	7
2.2. Colonehistologi.....	8
3. Colonefysiologi.....	9
4. Kliniske manifestasjoner	10
4.1. Ulcerøs kolitt (UC)	11
4.1.1. Makroskopisk patologi	11
4.1.2. Mikroskopisk patologi	12
4.2. Morbus Crohn (MbC).....	12
4.2.1. Makroskopisk patologi	13
4.2.2. Mikroskopisk patologi	14
4.3. Ubestemt inflammatorisk kolitt (IBDU).....	15
4.4. Ekstraintestinale manifestasjoner	15
5. Epidemiologi.....	16
6. Etiologi og patofysiologi.....	18
6.1. Genetikk.....	18
6.2. Miljøfaktorer	20
6.2.1. Hygienehypotesen.....	20
6.2.2. Spesifikke risikofaktorer	21
6.2.3. Appendix vermiformis.....	22
6.2.4. Mikroorganismer	24
6.2.5. Stress	25
6.3. Mikrobiologi.....	26
6.3.1. Den mikrobielle sensingen.....	27

6.3.2.	TLR- fordeling og funksjon	28
6.3.3.	NOD – fordeling og funksjon	29
6.4.	Immunologi	30
7.	Behandling.....	32
7.1.	Medikamentell behandling.....	32
7.1.1.	Aminosalisylater	33
7.1.2.	Corticosteroider	34
7.1.3.	Azathioprine(AZA) og 6-mercaptopurine(6-MP)	35
7.1.4.	Ciclosporin.....	36
7.1.5.	Metothrexat (MTX)	36
7.1.6.	Biologisk behandling (anti-TNF α)	37
7.2.	Kirurgisk behandling.....	40
8.	Pionérstudier ved gastroenterologisk forskningslaboratorium.....	41
9.	Metoder	42
9.1.	Flow Cytometri	42
9.2.	MACS (Magnetic- activated cell sorting)	44
9.2.1.	Immunomagnetiske mikrokuler.....	44
9.2.2.	MACS Microbeads.....	44
9.2.3.	Separasjonstyper	45
9.3.	Dead-Cert partikler	45
9.4.	GentleMACS™ Dissociator.....	46
10.	Prosedyreutvikling	46
10.1.	Klargjøring av bufferløsning og celledyrkningsmedie.....	46
10.2.	Oppløsning av biopsimateriale.....	47
10.3.	Eliminering av døde celler og celledbris	47
10.4.	Cellesortering (MACS)	48
11.	Resultater	49

11.1.	Preliminære forsøk.....	49
11.2.	Presortering.....	51
11.3.	MACS.....	52
11.4.	Dead-Cert.....	52
11.5.	GentleMACS kombinert med DeadCert etter MACS	53
12.	Generell diskusjon.....	54
13.	Konklusjon	56
14.	Referanseliste	57

1. Introduksjon

Inflammatorisk tarmsykdom, også kjent som inflammatory bowel disease (IBD) i engelsk litteratur, omtales i de fleste sammenhenger som en fellesbetegnelse for sykdomstilstandene ulcerøs kolitt (UC) og morbus Crohn (MbC) [1]. Men i omtrentlig 5 % av tilfellene med IBD oppfylles ikke kriteriene som er nødvendig for diagnostisering av UC eller MbC. I slike tilfelles benyttes betegnelsen ubestemt kolitt (IBDU), en diagnose som kom med i det internasjonale klassifikasjonssystemet for diagnoser (ICD) i -09 [2].

Det var den britiske doktoren Sir Samuel Wilks som i 1859 ble den første til å beskrive de kliniske symptomer og patologiske forandringene ved UC. Sykdommen ble da beskrevet som en kronisk ikke-infeksiøs diaré med isolerte eller konfluerende ulcerasjoner i tykktarmens slimhinne[3]. Siden UC nesten alltid kun rammet den rektale slimhinnen, ble tilstanden i Morson gastrointestinale patologilitteratur også referert til som ideopatisk proktitt [4].

MbC på sin side ble for første gang observert av den tyske kirurgen Wilhelm Fabry allerede i 1623, men beskrevet og navngitt av den amerikanske doktoren Burril B. Crohn i 1932. Tilstanden ble da beskrevet som granulomatøs inflammasjon med fortykkelse av tarmveggen [5].

Norge og de nordiske landene er i dag blant landene med høyest forekomst av IBD. UC viser spesielt høy insidens med 12.8 – 14.8 nye tilfeller årlig per 100 000. For MbC er forekomsten nærmere den internasjonale insidensen med 5.3 – 8-6 nye tilfeller årlig per 100 000. I Norge diagnostiseres det derfor mellom 800 - 1000 nye tilfeller med IBD hvert år, og UC alene utgjør omtrentlig 70 % [6].

Til tross for flere tiår med omfattende forskning er etiologien fortsatt kun delvis kartlagt. En av de nyere teoriene i dag omhandler dysregulasjon av immunrespons mot den kommensale tarmflora, hos genetisk predisponerte individer [5].

Isolering og karakteristikk av de involverte cellene og cellerekken fra inflammert tykktarmslimhinne kan være et viktig ledd i forståelsen av immunpatologien ved IBD.

Hensikten med denne oppgaven har vært å utvikle og etablere en kvalitetskontrollert protokoll for isolasjon og sortering av celler fra inflammert colonslimhinne ved hjelp av magnetisk celleseparasjon (MACS) og flow cytometri. Protokollutviklingen er et

nødvendig førsteledd i et større forskningsarbeid, der det endelige hovedmål vil være å beskrive de inflammatoriske celler og deres cytokiner som medierer inflammasjonen ved UC. Dette gjennom beskrivelse og påvisning av de enkelte immunceller og deres cytokinprofil, både på transkripsjons- og translasjonsnivå ved hjelp av realtime PCR (RT-PCR) og cytometric bead array (CBA). For å kunne klare dette trengs det rene cellepopulasjoner med tilstrekkelig mange viable celler og minimalt med debris.

I tillegg har undertegnede også valgt å fordype seg i IBD som sykdom og gjort rede for dens ulike aspekter med hovedfokus på etiologi og immunopatogenese med utgangspunkt i nyere forskning.

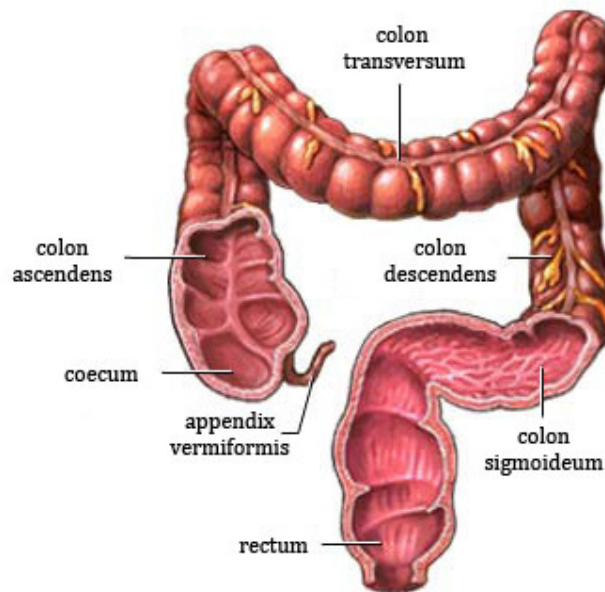
2. Morfologi

Den romerske filosofen og kirurgen Aelius Galenus (129 – 199 anno domini), bedre kjent som Galen av Pergamon, var den første til å beskrive fordøyelseskanalens anatomi ved å kombinere viten fra sitt kirurgiske virke og disseksjon av primater [7]. Den første systematiske anatomiske beskrivelsen av menneskekroppen og fordøyelseskanalen kom likevel ikke før så sent som i renessansen, tidsepoken hvor blant annet disseksjon av menneskekadaver gjenoppstår, da den italienske anatomen Andreas Vesalius i 1543 publiserte syvbinds verket *De humani corporis fabrica* [8].

2.1. Colonanatomi

Tykkarmen, kjent som *intestinum crassum* på latin, er siste del av fordøyelseskanalen og er hos voksne mennesker omtrentlig 150 cm lang. Anatomisk deles tykkarmen inn i de tre hovedavsnittene *coecum*, *colon* og *rectum*. *Coecum* (blindtarmen) er tykkarmens første segment og er forbundet med tynntarmens terminale segment gjennom Bauhins klaff. *Appendix vermiformis* (blindtarmvedhenget) avgår fra *coecum*'s nedre bakside. Fra *coecum* og i distal retning inndeles *colon* segmentalt i de fire forskjellige avsnittende *ascendens*, *transversum*, *descendens* og *sigmoideum*. Disse fire avsnittende utgjør det som korrekt anatomisk refereres til som den ekte tykkarmen, kjent som *colon* på latin. Mellom anus (endetarmsåpningen) og *colon*segmentet *sigmoideum* ligger det omtrentlig 15 cm lange segmentet *rectum*. Utvendig er

tykktarmen karakteristisk med sine tre ytre langsgående taenia coli samt sine haustrer (haustra coli) [9].

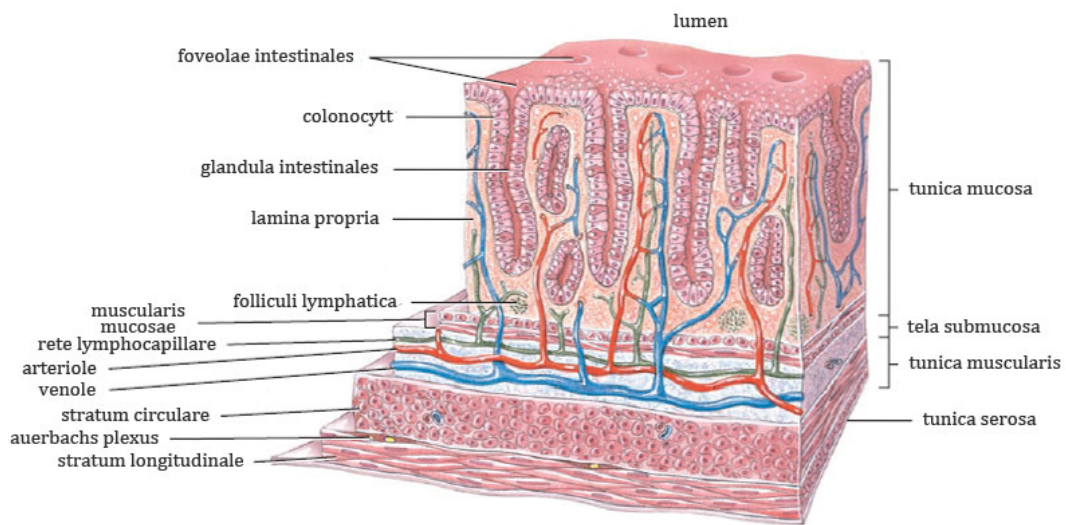


Figur 1 - anatomisk illustrasjon av tykktarmen [10].

2.2. Colonhistologi

Histologisk består tykktarmsveggen av de samme fire lagene som fordøyelseskanalen generelt, altså tunica mucosa, tela submucosa, tunica muscularis og tunica serosa. Tunica mucosa (slimhinnen) består av énlaget sylinderepitel, lamina propria og muscularis mucosae. Sylinderepitelet er i all hovedsak sammensatt av absorberende colonocytter, mucusproduserende globuleceller og enkelte endokrine celler. Sammenlignet med tynntarmslimhinnen mangler tykktarmslimhinnen plicae circulares og villi intestinales, som i tynntarmen er med på å øke overflatearealet betraktelig. Rett under muscularis mucosae ligger tela submucosa, bestående av løsfibret kollagent bindevev som fester tunica mucosa til underliggende muscularis mucosae. Laget inneholder også blod- og lymfeårer, samt nervefibrer som forsyner tunica mucosa. Muscularis mucosae består av et ytre longitudinelt muskellag og et indre sirkulært muskellag. Denne rettvinklede morfologien gir for øvrig grunnlaget for den peristaltiske kontraksjonen, regulert av det myenteriske nerveplexuset lokalisert mellom de to muskellagene. Det ytterste tarmlaget, tunica serosa, består av løsfibret bindevev, kar og nervefibrer omgitt av viscerale peritoneum. Veggen i

appendix vermiformis inneholder samme bestanddeler som tarmen for øvrig, men er særlig rik på lymfatisk vev [10].



Figur 2 - tredimensjonal fremstilling av colonslimhinnens histologi [10].

3. Colonfysiologi

Tykkertarmen fremtrer i mange sammenhenger som et lite attraktivt organ, og selv i større lærebøker overskygges colonfysiologien ofte av både magesekken og tynntarmens fysiologiske prosesser [11]. En av tykkertarmens primære funksjoner er absorpsjon av vann, elektrolytter og vitaminer fra tarminnholdet. Men den rommer også en omfattende bakterieflora som har nedbryting av tungt fordøyelige næringsstoffer som en av sin fremste oppgave. Sett fra et evolusjonistisk perspektiv er kanskje dette også hovedgrunnene til at organismen på et eller annet utviklingsstadium valgte å alliere seg med dem [12].

Den bakterielle nedbrytningen i tykkertarmen håndterer primært næringsstoffer som ikke kan nedbrytes enzymatisk eller absorberes i tynntarmen. Disse næringsstoffene utgjøres primært av komplekse karbohydrater som resistent stivelse og fiber, og det er beregnet at bakteriene har kapasitet til å fermentere mellom 60 og 80 gram av disse karbohydratene hver dag. Ved denne fermenteringsprosessen dannes både gasser (H_2 , CO_2 , CH_4) og kortkjedede fettsyrer (acetat, propionat og butyrat). Disse kortkjedede fettsyrer dannes overveiende i coecum, der både substrattilgangen og fermenteringskapasiteten er størst. Fettsyrene senker den lumenale pH (pH 5–6), og antagelig er denne syrelåsen viktig for å forhindre oppvekst av patogene bakterier.

Fettsyrene absorberes lett og nesten fullstendig (95 %). Avhengig av kostens sammensetning vil de kortkjedede fettsyrene kunne bidra med rundt 200 kcal/døgn, noe som dekker omtrentlig 10 % av det daglige energibehov. Fettsyrene har dessuten stor betydning for ernæring av colonepitelet, ikke minst butyrat som er anslått å dekke hele 70 % av colonepitelcellenes energibehov [12]. Dysfunksjon i denne metabolismen er også foreslått som en mulig årsak ved IBD [13]. Fettsyrene har også vist å ha en direkte stimulerende effekt på colonepitelcellenes absorpsjon av elektrolytter og vann [12].

Det har vært skrevet mye om kostfiber og risiko for kolorektal kreft, hvor de gunstige effektene av butyrat har vært i søkelyset. Merkelig nok har butyrat både en vekstfremmende effekt på normale colonepitelceller, men også en veksthemmende effekt på adenokarsinomceller, ofte omtalt som butyratparadokset [14].

Ikke bare karbohydrater, men også proteiner, peptider og aminosyrer kan fermenteres, og det antas at omtrentlig 2–9 g proteiner malabsorberes i tynntarmen hver dag. I motsetning til karbohydratmetabolismen foregår proteinnedbrytningen vesentlig i de distale deler av tykktarmen, trolig fordi bakterielle proteaser hemmes av lav pH. Flere av produktene som dannes ved bakteriell nedbrytning av proteiner er toksiske (ammoniakk, hydrogensulfid, aminer, fenoler, tioler og indoler) og har også blitt satt i sammenheng med utvikling av både neoplasie og inflammatoriske tilstander i tykktarmen [12, 15].

4. Kliniske manifestasjoner

IBD omfatter i all hovedsak de to tilstandene UC og MbC. Dette er kroniske tilstander som affiserer fordøyelseskanalen i form av gastrointestinal inflammasjon [16]. Både UC og MbC følger et relapserende-remitterende mønster med forverringer av varierende alvorlighetsgrad og varighet. Ved begge tilstander kan inflammasjonen også presentere seg utenfor fordøyelseskanalen, såkalte ekstraintestinale manifestasjoner. Begge tilstander, i tillegg til symptomer, har karakteristiske lumenale og histologiske funn og kjennetegn. Symptomatologien ved UC består av plager relatert til ulike deler av colon og rectum. Mens den inflammatoriske prosessen ved MbC kan affisere ett eller flere

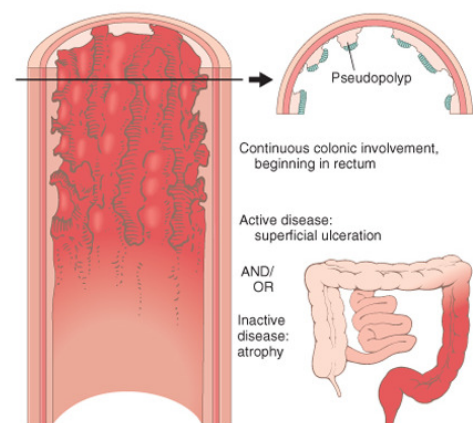
segmenter av tarm fra munnhule til anus. Ved siden av UC og MbC kan en også snakke om ubestemt inflammatorisk kolitt (IBDU) [17].

4.1. Ulcerøs kolitt (UC)

UC er en kronisk sykdom som forårsaker inflammasjon i den colorectale mucosa. Den manifesterer seg typisk som relapserende episoder med diaré og avføringstrang assosiert med blod og mucus i avføringen. Karakteristisk ved UC er at inflammasjonen i tarmen er kontinuerlig, circumferentiell og affiserer så godt som alltid rectum for så å strekke seg videre proksimalt. UC deles vanligvis inn i tre kategorier basert på grad av affeksjon i colon; rectum eller rectosigmoid, venstresidig kolitt distalt for flexura splenica, pankolitt som omfatter større deler og ofte hele colon, fullminant kolitt [18]. Persisterende blodig diaré er det vanligste symptomet sammen med avføringstrang og tenesmer. Pasienter med proctitt klager vanligvis over friskt blod eller blodtilblandet mucus som enten er blandet med avføringen eller flekker overflaten av avføringen. Episoder med inkontinens er heller ikke uvanlig. Obstipasjonsplager forekommer også, og tilskrives en langsommere transittid i hele colon. Når sykdommen brer seg videre proksimalt for rectosigmoid er episoder med blodig diaré, ofte med puss, det dominerende symptom. Abdominale smerter av variabel alvorlighetsgrad er vanlig ved mer utbredt kolitt. Da både som ubehag i nedre abdominale regioner og sentrale abdominale kramper [17].

4.1.1. Makroskopisk patologi

Makroskopisk er UC karakterisert av en ulcererende inflammasjon som strekker seg fra rectum i proksimal retning, og er begrenset til colon. Sykdommen er som regel mer aktiv distalt. Vanligvis finnes ingen fistler, sinuser eller dypere ulcerasjoner.



Figur 3 - Skjematisk illustrasjon av distribusjonsmønstre og makroskopiske funn ved UC [1].

Tidlig sykdom viser seg som en hemorragisk, hyperemisk, ødematøs og skjør mucosa. Ved mer alvorlig og sen sykdom sees linære, bredbasete ulcerasjoner som strekker seg i hele colons lengde. Isolerte "øyer" av regenererende mucosa danner såkalte pseudopolypper. Det finnes ingen fortykkelse av tarmveggen og ingen involvering av serosa.

4.1.2. Mikroskopisk patologi

Mikroskopisk er inflammasjonen overfladisk. Ulcerasjonene strekker seg sjeldent dypere enn submucosa. Det finnes ingen granulomer. En diffus, hovedsakelig mononukleær inflammatorisk infiltrasjon i lamina propria er nesten alltid tilstede. Nøytrofil infiltrasjon vil kunne gi opphav til kryptabscesser. Ved sykdom i remisjon vil granulasjonsvev fylle inn ulcerne, fulgt av regenerasjon av epitelet i mucosa, med gjenværende fibrose, atrofi og utvisket arkitektur. I tillegg vil en kunne se kroniske forandringer i form av pseudopolypper, hyperplasi av endokrine celler, metaplasi av paneth celler og utvisket kryptarkitektur.

4.2. Morbus Crohn (MbC)

MbC er en kronisk transmural inflammatorisk tilstand. De hyppigst affiserte segmenter er ileum, colon og perianalt. De vanligste symptomer inkluderer diaré, magesmerter, vekttap og blødning i fordøyelseskanalen [18].

Tynntarm er affisert i 50-75 % av alle tilfeller, og hos nesten alle av disse pasientene er ileum involvert. [17, 18]. Symptomer vedrørende affeksjon av tynntarm hos MbC pasienter knyttes enten direkte til inflammasjon av mucosa eller indirekte grunnet funksjonstap av vedrørende tarmsegment. Hovedsaklig dreier det seg om diaré, som regel uten blod, magesmerter, særlig i nedre høyre kvadrant, samt vekttap. Når terminale ileum er rammet i en slik grad at fett og galle malabsorberes vil dette kunne gi steatorré. Andre mekanismer for diaré ved tynntarmsaffeksjon er bakteriell overvekst og redusert kapasitet i det inflammerte mucosa segment. Vekttap er også multifaktoriell i årsak; det kan tilskrives den katabolske inflammasjonsresponsen, malabsorpsjon og vegring av matinntak grunnet postprandial forverring av symptomene [17].

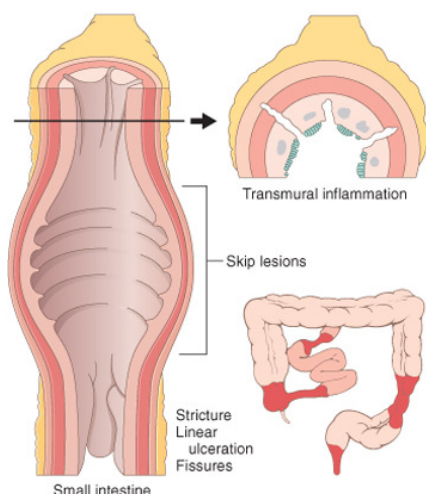
Isolert kolitt alene sees hos ca. 15-25 % av pasientene. Involvering av både tynntarm og colon hos 40-50 % [18]. Colon ascendens og caecum er de vanligste avsnittene som affiseres. Diaré er også her et prominente symptom og kan tilskrives den inflammerte slimhinnens reduserte kapasitet til å absorbere vann. Uttalt inflammasjon kan resultere i variable mengder rectalblødning assosiert med diaréen. Dette er mer uttalt ved affeksjon av distale segmenter. Pasienter med rectal involvering presenter ofte avføringstrang, tenesmer og inkontinens. Dette kan tilskrives redusert compliance av sphincter muskulatur. Kraftige blødninger er sjeldent sammenlignet med UC, og er da gjerne knyttet til alvorlige ulcerasjoner, særlig i colon. Ved mer distal involvering av colon beskriver ofte pasienten diaréen som avføring av mucøst utseende eller passasje av rent blod og/eller mucus uavhengig av diaré [17].

Perianal og perineal sykdom er tilstede hos ca. 33 % av pasientene. Vanlige funn innebefatter fibroepitelial hyperplasi og hemoroider, smertefulle analfissurer, analstenoser og abscesser, og sjelden cancer ani. Disse bidrar signifikant til morbiditet, og er sammen med fistler en av de mest persisterende manifestasjoner ved MbC. Fistlene opptrer hos omtrentlig 1/3 av pasientene. Fistler mellom tarmsegmenter kan manifestere seg som kraftig diaré, magesmerter og elektrolyttforstyrrelse. Ikke så rent sjelden dannes også fistler mellom tarm og blære, samt deler av de kvinnelige kjønnsorganer [17].

Det øvre segmentet av fordøyelseskanalen er sjeldnest involvert, men ses likevel hos 5-10 % av tilfellene. Affeksjon her er sjeldent tilstede uten samtidig sykdom i tynntarm eller colon [18]. Ved involvering av øsofagus er dysfagi og odynofagi kardinalsymptomer. Ventrikkelaaffeksjon vil kunne presentere seg med kvalme, oppkast og smerter i epigastriet [17].

4.2.1. Makroskopisk patologi

Makroskopisk er MbC karakterisert av at serosa blir granulær og grå. Ofte vil det mesenteriske fett pakke inn tarmoverflaten (fat wrapping). Tarmveggen vil i de affiserte områder være gummiaktig og fortykket grunnet ødem, inflammasjon, fibrose og hypertrofi av muscularis propria. Som et resultat vil tarmlumen kunne være innsnevret. Strikturer kan oppstå



Figur 4 - Skjematisk illustrasjon av distribusjonsmønster og makroskopiske funn ved MbC [1].

i colon, men er som regel mindre alvorlige sammenlignet med strikturer i tynntarm. Et klassisk kjennetegn ved MbC er det skarpe skillet mellom inflammerte tarmsegmenter og de uaffiserte områdene. Når flere områder er affisert vil de mellomliggende områdene være så godt som normale (skip lesions). Sykdom i tidlig stadium viser seg som fokale ulcera, ødem og tap av normal struktur. Når sykdommen progredierer går disse over i hverandre til lange, serpentine,

linære ulcera som strekker seg langs tarmens akse. Dette gir seg til syne makroskopisk som et brosteinsmønster. Det kan også dannes fissurer som kan gå dypt, ofte helt ned til serosa. Disse kan gi opphav til adheranser mellom tarmsegmenter. Videre progresjon kan føre til dannelse av fistler og sinuser til hud, nærliggende vicera, eller blinde lommer med abscessdannelse. Sykdommen er hovedsakelig høyresidig uten affeksjon av rectum [1, 17].

4.2.2. Mikroskopisk patologi

Mikroskopisk kjennetegnes lidelsen av inflammasjon med nøytrofil infiltrasjon i epitelet og akkumulering i krypter med dannelse av kryptabscesser og kryptitt. De dype ulcerasjonene sees også mikroskopisk. Inflammasjonen er typisk transmural med lymfoide aggregater. Muscularis mucosae og muscularis propria er som regel markert fortykket, og fibrosen affiserer hele veggtykkelsen. Kroniske forandringer viser seg som forstyrret arkitektur, atrofi og metaplasi av paneth celler og glandula pylorica, samt tilstedeværelse av begerceller. Granulomer vil være tilstede i 2/3 av tilfellene, men kan være lokalisert hvor som helst i fordøyelseskanalen selv hos pasienter med sykdom i kun ett segment.

4.3. Ubestemt inflammatorisk kolitt (IBDU)

Som beskrevet tidligere har IBD tradisjonelt blitt klassifisert som enten UC eller MbC. Men hos en subgruppe av IBD pasienter, hvor kun colon er involvert, vil den initielle diagnostiseringen falle inn under diagnosen IBDU. Dette gjelder opp mot 10-15 %. Selv etter at en har kombinert kliniske, endoskopiske, histopatologiske og radiologiske trekk av sykdommen kan en ikke klassifisere kolitten som UC eller MbC. Dette delvis grunnet alvorlighetsgrad, tidligere medikamentell behandling som har endret de endoskopiske trekkene og at UC pasienter kan være uten rektal involvering. Over tid vil omtrent 50 % av pasientene med diagnosen IBDU bli diagnostisert med enten UC eller MbC. Dette medfører at totalt 4-5 % av IBD pasientene vil forbli med diagnosen IBDU [2].

4.4. Ekstraintestinale manifestasjoner

Livstidsrisikoen for utvikling av ekstraintestinale manifestasjoner (EIM) ved IBD ligger på rundt 25-30 %. Ofte vil disse inflammasjonstilstandene, som lokaliseres utenfor fordøyelseskanalen, kunne dominere over de primære symptomer og plager. Alle organsystemer kan affiseres, men vanligst er affeksjon av ledd, hud, øyne og lever. Noen av manifestasjonene er også tydelig assosiert med den inflammatoriske prosessen i fordøyelseskanalen, mens noen virker å forløpe uavhengig av tarmprosessen [17].

Opp mot 10 % av pasienter med MbC og UC presenterer hudlidelser. Vanligst blant disse er erythema nodosum som oppstår hos 15 % av MbC pasienter, men er mye sjeldnere ved UC. Pyoderma gangrenosum er uvanlig, men derimot en mer alvorlig tilstand, og sees hos 0.5-20 % av MbC pasienter og hos 1-10 % hos UC pasienter. Begge tilstandene er oftest lokalisert til nedre deler av underekstremitetene, hyppigst på skinnleggene [17].

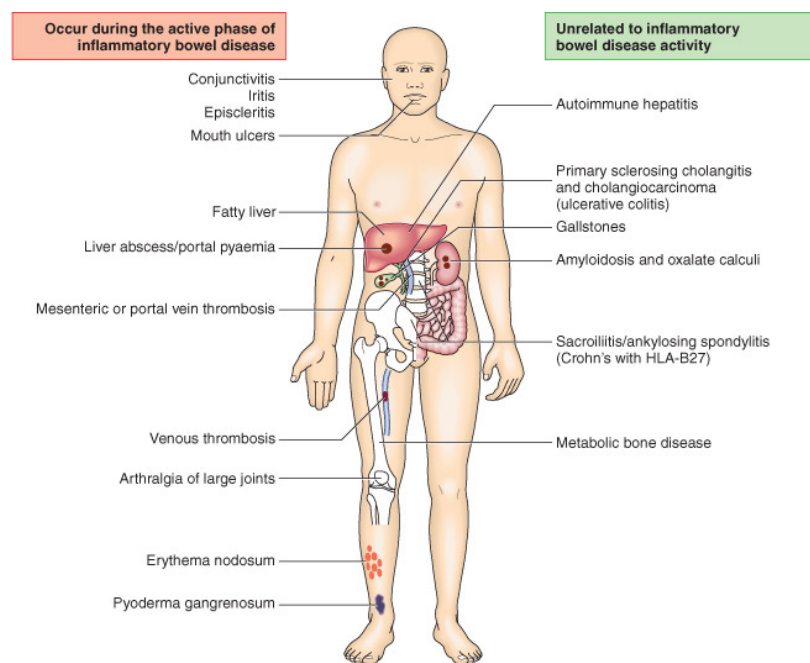
Orale manifestasjoner inkluderer aftøse ulcera. Smertefulle lesjoner i form av brosteinsmønster og pyostomatitis vegetans er også beskrevet [17].

Vanlig er også at IBD pasienter rammes av en rekke tilstander knyttet til muskelskjelettsystemet. Deriblant asymptomatisk sakroileitt hos 50 % og fullt utviklet ankyloserende spondylitt hos 5 %. Ved MbC er klubbing av fingre

assosiert med uttalt sykdom i tynntarm og korrelerer med sykdomsaktiviteten. Perifere artropatier sees hos 5-20 %. Inflammatoriske ryggmerter sees hos 30 % av MbC pasienter [17].

IBD kan også manifestere seg okkulært. Disse tilstandene rammer omkring 10 %, og bidrar signifikant til morbiditeten hos de affiserte. Episkleritt er den vanligste, mens de mer alvorlige tilstandene som uveitt og skleritt også forekommer [17].

Hepatobiliære manifestasjoner er også et kjent fenomen. Primær scleroserende cholangitt (PSC) forekommer vanligst med prevalens på 3 % i tillegg til hepatisk steatose [17]. PSC er vanligst assosiert med UC [18].



Figur 5 - Skjematisk illustrasjon av systemiske komplikasjoner som kan oppstå ved IBD [19].

5. Epidemiologi

Historisk og fortsatt i nyere tid er IBD en tilstand som kan være vanskelig å diagnostisere og klassifisere. For ikke mer enn 30 år tilbake ble IBD i noen land regnet som en av de sjeldne sykdomstilstandene [6].

I perioden mellom 1950 og 70- tallet ble det observert en økende forekomst av både UC og MbC i de vestlige deler av verden, men spesielt USA og nordlige deler av Europa. MbC som før denne perioden var langt sjeldnere en UC viste spesielt økende forekomst [20, 21]. Nylige data fra USA viser imidlertid at denne differansen nå mer eller mindre er

utjevnet, en trend som også sees i studier fra andre vestlige land. En mulig årsak kan imidlertid være bedre diagnostisering og differensiering av IBD tilstandene [6]. En studie av forekomsten av IBD i Europa i perioden mellom -91 – 93 utført av Shivananda et al. viste et klart skille mellom de nordlige og sørlige områdene [22]. En oppsummeringsstudie av Gismera et al. publisert i -08 konkluderer imidlertid med at denne store forskjellen mest sannsynlig også skyldtes forskjeller i datidens sosioøkonomiske forhold og dermed følgelig og diagnostiseringsgrunnlaget, hvor de nordiske landene var betydelig mer velstående. Deres sammenligning av nyere epidemiologiske data indikerer imidlertid en mindre sikker differanse mellom nord og sørlige land. Da disse målingene indikerer stabiliserende forekomst i vestlige og nordlige land, mens økende for sørlige og utviklingsland [6].

Den internasjonale forekomsten av IBD varierer mellom 2.2 – 14.3 tilfeller per 100 000 personår for UC og 3 – 14.6 for MbC. Forekomsten varierer mellom ulike geografiske områder, høyest forekomst observeres i vestlige land og sjeldnere i utviklingsland. Områder med kaldere klima og urbane områder har større forekomst sammenlignet med varmere klima og landlige områder. Statistikken sett under ett viser at den kombinerte årlige insidensen av IBD er 10 tilfeller per 100 000 [6]

Norge og de nordiske landene er i dag blant landene med høyest forekomst av IBD. UC viser spesielt høy insidens med 12.8 – 14.8 nye tilfeller årlig per 100 000. For MbC er insidensen nærmere den internasjonale statistikken med 5.3 – 8.6 nye tilfeller årlig per 100 000. I Norge diagnostiseres det derfor mellom 800 - 1000 nye tilfeller med IBD hvert år, og UC alene utgjør omtrentlig 70 % [6].

Forekomsten er omtrentlig den samme mellom kvinner og menn for UC, mens det for MbC er en liten overhyppighet blant kvinner [23]. Aldersfordelingen viser at den høyeste insidensen forekommer i midtre del av andre tiår, med gjennomsnittlig alder 27 år for sporadiske tilfeller. Flesteparten diagnostiseres i alderen mellom 15-40 år. Personer yngre enn 18 år utgjør 10 % av tilfellene, i denne aldersgruppen dominerer imidlertid MbC [24].

6. Etiologi og patofysiologi

Til tross for flere tiår med omfattende forskning er etiologien fortsatt kun delvis kartlagt. En interessant teori er at IBD skyldes en dysfunksjon i samspillet mellom genetiske og miljømessige faktorer, hvor dette medvirker til en forstyrrelse i tarmslimhinnens immunologiske toleranse overfor den kommensale tarmflora. Det er allerede beskrevet 99 forskjellige genetiske risikoloci som i ulik grad viser assosiasjon med IBD. De genetiske faktorene alene kan likevel ikke forklare den fenotypiske variasjonen. En konkordansrate hos monozygote tvillinger på mellom 10 – 15 % ved UC og 30 – 35 % ved MbC antyder også den kvantitative betydningen av ikke- genetiske faktorer [25].

6.1. Genetikk

Den teknologiske utviklingen har sammen med kartleggingen av det humane genomet hatt stor betydning for utviklingen av den molekylærgenetiske forståelsen av humane polygeniske sykdommer. Observasjoner av familiære forekomster og genome-wide association studier (GWAS) har de senere årene hatt stor betydning for forståelsen av genetikken ved IBD [26].

Den aller første dokumenterte observasjonen på familiære forekomster av inflammatorisk tarmsykdom ble gjort av Crohn et al. allerede tidlig på 1930-tallet, og førte allerede da til flere hypoteser om genetikkens betydning i patogenesen [26]. Siden da har flere epidemiologiske studier bekreftet dette og liknende funn, og det er i dag liten tvil om betydningen av genetikken ved IBD [27]. Flere forhold kan illustrere denne assosiasjonen. Blant annet viser flere studier av førstegradsslektninger av pasienter med MbC at den relative risikoen for utvikling av MbC ligger mellom 10-35 og mellom 3-6 for utvikling av UC. Blant førstegradsslektninger av pasienter med UC er risikoen noe lavere, med en relativ risiko mellom 2-15 for utvikling av UC og 2-3 for utvikling av MbC [28]. Typisk for polygen arvegang sees høyere risiko når flere enn én førstegradsslektning er rammet [23]. Den gjennomsnittlige debutalderen ved familiære forekomster av IBD er også fem år lavere sammenlignet med sporadiske forekommende, med henholdsvis 22 og 27 år [23]. Den signifikant høyere forekomsten av IBD i den jødiske populasjonsgruppen indikerer også en betydelig genetisk assosiasjon

[29]. Studier av monozygote tvillinger har også funnet konkordans på 30 – 35 % ved MbC samt 10 -15 % ved UC [25].

På 1980- tallet ble det gjennomført flere genetiske segregasjonsstudier, der man under kontrollerte forhold observerte det genetiske arvemønsteret ved IBD. Ingen av disse studiene kunne vise funn forenelig med Mendels kinetikk og man konkluderte med et komplekst arvemønster [30].

GWAS har per dags dato allerede identifisert 99 forskjellige genetiske risikoloci ved IBD, hvor 28 av disse er assosiert til både MbC og UC [25]. Analyser viser at disse genene har betydning for forskjellige prosesser nært knyttet til reguleringen av den intestinale homeostasen. Blant annet prosesser som er assosiert med den intestinale barrierefunksjonen, ulike mikrobiologiske forsvarsmekanismer, regulering av det medfødte immunforsvaret og det adaptive immunforsvaret, forsvarmekanismer mot reaktive oksygenmetabolitter (ROS) og autofagi. [25, 27].

NOD2 (kjent som CARD15 og IBD1) lokalisert på kromosom 16 er et slikt risikogen. Mutasjoner her er assosiert med MbC med RR mellom 2,4 – 30 avhengig av populasjon. To andre gener som også har fått mye oppmerksomhet siste tiden er ATG16L1 og IL23R, lokalisert på forholdsvis kromosom 2 og 1. ATG16L1 som har betydning for den intracellulære autofagiprosessen, er funnet assosiert med MbC med RR 1,5 i muterte former. IL23R er genet som koder for interleukin 23- reseptoren, som har betydning for differensiering av T-lymfocytter til proinflammatoriske T_{H17} - celler. Mutasjoner her er funnet assosiert med både MbC og UC med RR 0,38 (MbC) og 0,73 (UC) altså en protektiv assosiasjon [17].

Det er også interessant at omtrentlig halvparten av risikoloci også viser sterke assosiasjoner ved andre inflammatoriske og autoimmune sykdommer, som blant annet diabetes mellitus type 1, revmatoid artritt og PSC. Det er også funnet en økt tendens til infeksjoner med mycobacterium leprae blant pasienter med IBD [31, 32].

Kort oppsummert ser man at det genetiske bidraget i patogenesen ved IBD er et polygenisk samspill og ikke betinges av mutasjoner i enkeltgener alene. Det

genetiske overlappet mellom MbC og UC antyder også delvis felles patogenese. Genetiske differanser innad i samme sykdomstilstand indikerer også mulige undergrupper av hver enkel tilstand. I fremtiden kan også videre subklassifisering bli nødvendig.

6.2. Miljøfaktorer

IBD er som kjent en kompleks sykdom som påvirkes av risikofaktorer i miljøet i en allerede genetisk predisponert vert. Men som nevnt tidligere kan den genetiske predisposisjonen ikke alene være ansvarlig for etiologien. Andre tilleggsfaktorer må derfor stå som en betydelig brikke i patogenesen, og samtidig kanskje også forklare den raskt økende insidensen av IBD i enkelte geografiske regioner [33, 34].

Tradisjonelt sett har IBD vært en sykdom knyttet til industrialiserte nasjoner. Selv om det i utviklingsland rapporteres lavere prevalens av IBD, har insidensen økt etter hvert som nasjonene har blitt mer industrialiserte [35, 36]. Videre har migrasjonsstudier vist at individer som immigrerer fra regioner med lav prevalens til land med høyere prevalens har økt risiko for utvikling av IBD, særlig blant førstegenerasjonsbarn [33, 37].

Flere teorier knyttet til miljø er postulert og flere risikofaktorer er utforsket.

6.2.1. Hygienehypotesen

Hypotesen foreslår at den økende frekvensen av immunologiske lidelser kan tilskrives mangelen av eksponering for enteriske patogener i barndommen [37]. Forbedret hygiene og sanitære forhold sammen med minket eksponering for enteriske organismer kan disponere for utvikling av upassende immunologisk respons ved eksponering for disse senere i livet [38]. Mange faktorer er undersøkt, inkludert infeksjoner med *Helicobacter pylori* (HP), familie størrelse, fødselsrekkefølge, eksponering for husdyr og oppvekst i urbane omgivelser [39-41].

HP- infeksjoner akvireres ofte tidlig i barndommen. Kolonisering har blitt korrelert til størrelse av søskenflokk, antall familiemedlemmer og dårlige

sanitære forhold [42]. IBD er mer prevalent i nasjoner hvor HP- infeksjon er mindre vanlig [43]. En metaanalyse av 23 studier konkluderte med at denne infeksjonen var negativt assosiert med både UC og MbC [43]. HP- infeksjonen kan teoretisk sett beskytte mot IBD ved å øke uttrykket av gener (eks. FOXP3) som er involvert i T-regulatoriske cellers funksjoner [43].

Det er også gjort studier vedrørende familiestørrelse, søskenforhold og fødselsrekkefølge. Individuer som vokser opp med færre søsken vil kunne ha færre muligheter til å akvirere de enteriske infeksjonene som i barndommen er nødvendig for å programmere immunforsvaret til tarmen slik at den vil kunne respondere adekvat på infeksjoner senere i livet [38, 44]. Studier har vist motstridende resultater. Lavere fødselsrekkefølge er assosiert med økt risiko for både UC og MbC [45]. Andre har vist at IBD pasienter var oppvokst med et større antall eldre søsken enn kontroll pasientene [44], og at antallet eldre søsken ga en økende risiko for utvikling av UC [46].

Forskjeller i livsstil og eksponering for miljøfaktorer i urbane sammenlignet med landlige områder kan bidra til den høyere insidensen av IBD i de urbane områdene [47]. Flere observasjonsstudier har vist en økning i insidensen av UC og MbC i mer tettere befolkete områder [48]. Men et stort antall studier har ikke klart å finne en assosiasjon mellom urban eksponering og IBD [49, 50] noen har til og med vist det motsatte [51].

Andre faktorer som støtter hygiene hypotesen er at det å bo på gård, drikke upasteurisert melk og tettheten på husstanden er assosiert med redusert risiko for IBD, særlig MbC [39-41]. En studie har vist at MbC var 3 ganger vanligere hos personer som i barndomshjemmet hadde varmtvann og adskilte bad [38].

6.2.2. Spesifikke risikofaktorer

Flere er utforsket, inkludert røyking, p-piller, appendectomi, diett, amming og NSAIDs.

Vedrørende røyking har en metaanalyse konkludert med at aktive røykere har lavere risiko for utvikling av UC sammenlignet med individer som aldri

har røykt og eksrøykere. I kontrast viste det seg at aktive røykere, fulgt av eksrøykere, har en økt risiko for utvikling av MbC [52]. Selv om forholdet mellom røyk og IBD er godt dokumentert er dette et paradoks da de land med lavest insidens av IBD ofte har høy andel røykere [41].

Når det gjelder perorale antikonseptiva er det vist en positiv assosiasjon for både UC og MbC [53].

Diett har blitt grundig forsket på i forbindelse med IBD, men studiene har vist selvmotsigende funn [54, 55]. Amming har vist seg å være beskyttende ovenfor både UC og MbC. En vet at amming er viktig for å tilegne seg oral toleranse for mikrofloraen og antigener i mat [56].

Eksponering for antibiotika under oppveksten er tenkt å kunne interferere med den normale prosessen for utvikling av toleranse ovenfor enteriske bakterier hvilket kan øke risikoen for IBD [57]. Flere studier har vist en positiv assosiasjon mellom antibiotikabruk og utvikling av MbC [57, 58].

En case-kontroll studie vedrørende NSAIDs og IBD har vist positiv assosiasjon for både UC og MbC [59]. Prostaglandiner beskytter normal slimhinne mot skade ved flere mulige mekanismer, som økt bikarbonat- og slimsekresjon fra slimhinnen, samt økt blodfløde og økt konsentrasjon av overflateaktive fosfolipider og sulfhydrylforbindelser i slimhinnen. Når NSAID-preparater skader frisk slimhinne, mener man at det i vesentlig grad skyldes hemming av COX-1-indusert produksjon av prostaglandiner og bortfall av disse beskyttende virkningene [60].

6.2.3. Appendix vermiformis

Som nevnt tidligere i denne oppgaven var Andreas Vesalius den første til å gi en systematisk beskrivelse av menneskets anatomi i syvbinds verket *De humani corporis fabrica*. Betegnelsen appendix vermiformis derimot ble først definert flere år senere, av den belgiske kirurgen Philip Verheyen (1648 – 1711 anno domini) [26].

Den fysiologiske funksjonen til appendix vermiformis har i mange århundrer vært ukjent, men histologiske likheter med peyerske plakk har postulert en immunologisk funksjon [61].

De siste tiårene har en rekke case- kontrollstudier hvor man studerte risikofaktorer ved IBD, identifisert en negativ assosiasjon mellom tidligere appendectomi og UC. Gilat et al. utførte i -87 den første studien av denne observasjonen. Studien viste at kun 3 % av dem med UC hadde fra før diagnosetidspunktet fått utført appendektomi. Sammenlignet med en aldersjustert populasjonsinsidens på 10 % var dette funnet statistisk signifikant. Denne studien ble fulgt av en rekke andre studier. Blant annet ble det i -00 publisert en metaanalyse av 13 case- kontrollstudier publisert i perioden 1987 – 99. Studiene inkluderte totalt 2770 pasienter med UC samt 3352 kontrollere. Resultatet viste 69 % (OR= 0.307) reduksjon i risikoen for utvikling av UC ($p < 0.0001$) [62].

Hallas et al. publiserte i -04 en populasjonsbasert kohortstudie, som inkluderte alle de 234 559 personene som i perioden 1977 – 99 gjennomgikk appendectomi i Danmark. Deres resultater viste at forekomsten av UC i den postoperative oppfølgingsperiode på gjennomsnittlig 17,5 år var lavere sammenlignet med den aldersjusterte forekomsten i perioden før operasjonen ble utført, med en ratio = 0,74. Studien konkluderte med at appendectomi kunne ha en genuin beskyttende effekt mot utvikling av UC [63].

TCR α -/- musemodeller var de aller første modellene på kolitt, disse utviklet spontant kolitt histologisk lik UC [64]. Inflammasjonen i disse modellene var assosiert med økte nivåer av IL-4, altså en T_H2 profil [65]. Mizoguchi A. et al. viste at disse musemodellene over en observasjonsperiode på 6-7 måneder, utviklet kun 3,3 % kolitt etter de i en alder av 3 - 5 uker ble appendectomert. Dette i kontrast til kontrollgruppen hvor tilnærmet 80 % utviklet kolitt over samme periode. Studien konkluderte med at de lymfoide folliklene i appendix vermiformis fungerer som primingsted for cellene involvert i utviklingen av denne kolitten [66].

Selv om den eksakte mekanismen for hvordan appendectomi beskytter eller forsinker utviklingen av kolitt i genetisk disponible verter fortsatt ikke er forstått, støtter den overnevnte og andre dyrestudier de epidemiologiske funnene om en negativ assosiasjon mellom appendectomi og UC. I fremtiden kan det også tenkes at appendectomi vil ble aktuelt blant pasienter med etablert UC og blant personer under høy risiko for utvikling av sykdommen [26].

6.2.4. Mikroorganismer

Mange mikroorganismer har blitt overveid som mulige årsaker til IBD. Dette inkluderer blant annet *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), meslingeviruset, innvollsormer og patogene E-coli (AIEC).

MAP har blitt postulert som mulig årsak til MbC grunnet likhetene mellom Morbus Johnes og MbC [67]. Flere studier har også vist en positiv assosiasjon mellom MAP og IBD av varierende grad avhengig av metode [68]. Tilstedeværelse av MAP hos en andel av MbC pasienter kan indikere at MAP infeksjon medvirker i utvikling av MbC. Alternativt kan utviklingen av MbC predisponere for benign kolonisering med MAP. Videre er MbC mer vanlig i urbane områder. I områder på landet der en er mer eksponert for MAP er det ikke observert økt forekomst av MbC. Dermed er det eksakte forholdet mellom MAP og IBD enda ikke klarlagt [68].

Når det gjelder meslingeviruset og meslingevaksinen støtter ikke dagens nyere forskning noen assosiasjon til IBD, der flere studier har motbevist tidligere positive assosiasjoner [69, 70].

IBD manifesterer seg i samfunn med reduserte tilfeller av kolonisering med ormeinfestasjoner. I stor grad er forholdet til IBD inverst. Slike infestasjoner kan ha en viktig immunoregulatorisk rolle knyttet til tarmfloraen [71]. Behandling med helminter har vist en potensiell gunstig effekt for både UC og MbC pasienter, dette er sannsynligvis knyttet til parasittens evne til å oppregulere T_H2 cytokiner (IL-4, IL-5) [72].

Flere teorier har også foreslått at IBD utvikles grunnet en dysbiose mellom skadelige og beskyttende bakterier. Individuelt diagnostisert med akutt gastroenteritt har vist seg å ha høyere risiko for utvikling av IBD i etterkant av infeksjonen. Disse patogene bakterier kan spille en rolle i IBD utviklingen [73]. AIEC har blant annet vist seg å være spesifikk for ileal MbC og kan invadere intestinale epitelceller, samt replikere intracellulært i makrofager [74]. MbC pasienter med NOD2 polymorfisme har vist seg å ha en redusert cytokinrespons på AIEC [75]. Defekter i ATG16L genet, vedrørende autofagi, kan også hemme elimineringen av AIEC og dermed gi MbC [76].

Den økte bruken av kjøleenheter (cold chain hypothesis) kan ha tillatt psykotrope bakterier som *Listeria monocytogenes* og *Yersinia enterocolitica* å slå rot i moderne samfunn. Eksponering for disse har vært tiltenkt å øke risikoen for utvikling av IBD [77].

6.2.5. Stress

Psykisk stress er en faktor som også er foreslått å spille en rolle i etiologien og patogenesen ved IBD grunnet det kroniske, relapserende og remitterende mønstret til sykdommen. Det er kjent at både kronisk og akutt stress kan endre immunforsvarets funksjon. Studier har vist både positiv og null assosiasjoner mellom stress og IBD [78, 79].

Til tross for årevis med iherdig forskning har ikke de identifiserte risikofaktorene klart å forklare patogenesen ved IBD. Flere faktorer, som røyking, appendektomi, antikonseptiva, amming, diett, infeksjoner/vaksinasjon, antibiotika, helminter og hygiene i barndommen har blitt tilskrevet insidensøkningen av IBD verden over. Men selv den mest konsistente risikofaktoren, røyking, bidrar bare delvis i patogenesen. Dermed kreves fortsatt videre forskning vedrørende miljøfaktorenes assosiasjoner til IBD [68].

6.3. Mikrobiologi

Menneskekroppen består totalt av omtrentlig 10^{14} celler, men kun 10^{13} av disse er humane eukaryote celler. De resterende 90 % utgjøres i all hovedsak av mikroorganismer, primært bakterier. De fleste bakteriene befinner seg i fordøyelseskanalen, men også huden har høy tetthet av mikroorganismer. På fosterstadiet er fordøyelseskanalen aseptisk, men koloniseres raskt etter fødselen med bakterier fra moren og omgivelsene. Ved toårsalderen regnes denne mikrofloraen som fullstendig kolonisert hvor da en stabil og dynamisk balanse mellom tarmfloraen og verten er opprettet. Mellom forskjellige individer finnes det ofte store variasjoner i tarmfloraens sammensetning, men forholder seg relativt kontant over tid hos samme individ. Små variasjoner kan likevel oppstå med variasjoner i blant annet diet, livsstil og alder [80].

På grunn av de ulike fysiologiske egenskaper og funksjoner langs fordøyelseskanalen er det relativt lav tetthet av bakterier i magesekken og proksimale deler av tynntarmen, mens det i tykktarmen er høy tetthet [81]. I magesekken og tynntarmssegmentene duodenum og jejunum er mikrofloratettheten omtrentlig 10^5 kolonidannende enheter per gram chymus (CFU/g). Terminale ileum inneholder rundt $10^8 - 10^9$ CFU/g, mens det i tykktarmen er omtrentlig $10^{11} - 10^{12}$ CFU/g. Det finnes ingen fullstendig sikker kartlegging av tarmfloraen da ikke alle bakteriene lar seg dyrke [82]. Men det antas likevel at det i tykktarmen alene finnes mellom 4 – 500 forskjellige bakteriearter, 99.9 % av disse er også obligate anaerobe. Den typiske bakteriefloraen for mennesker på vestlig diet består av følgende arter [80]:

1. Bacteroides, Eubacterium, Peptococcus og Bifidobacterium ($10^{11} - 10^{12}$ CFU).
2. Enterobacteria og Streptococci ($10^8 - 10^9$ CFU).
3. Lactobacillus ($10^5 - 10^8$ CFU).

Genusen Bacteroides utgjør alene rundt 30 % av den totale mengden bakterier i fordøyelseskanalen, og det antas derfor følgelig å ha en spesielt viktig rolle for vertens tarmhomeostase [82].

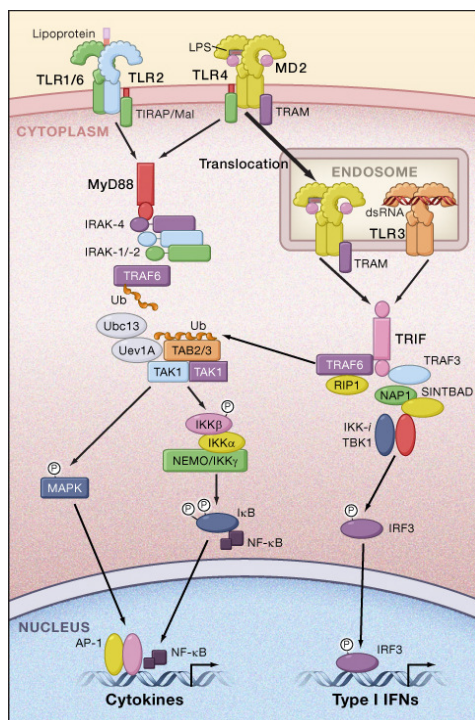
Selv om ingen spesifikke mikrober sikkert har kunnet kobles til utviklingen av IBD generelt eller UC og MbC isolert, har flere studier vist at det faktisk eksisterer flere forskjeller hva angår lokalisering og mengder av ulike bakteriearter ved de ulike tilstandene [83]. De kanskje mest anvendelige bevisene for bakteriefloraens betydning i patogenesen ved IBD ser man ved den fordelaktige effekten som oppstår etter terapiformer som modulerer den luminale mikroflora. Antibiotika er eksempel på en slik terapiform. Historisk sett var antibiotika faktisk også det første medikamentet med antatt effekt i behandling av IBD [84]. Studier med pro- og prebiotisk terapi har også vis fordelaktig klinisk effekt [85, 86].

6.3.1. Den mikrobielle sensingen

Flere studier har vist at den intestinale mikroflora er viktig for blant annet modning av selve tarmsystemet, modulering av næringsprosesser og for stimulering av det intestinale immunsystemet [87]. Men hvordan verten har kunnet sanse tilstedeværelsen av denne mikroflora og samtidig trigge de mange genene nødvendig for dette samspillet har lenge vært ukjent. Nylig oppdagelse av flere molekyler som felles betegnelse for pattern recognition receptors (PRR) ser imidlertid ut til å forklare mye. Både det intestinale epitelvevet og slimhinnens immunceller uttrykker et stort antall av disse PRR [88]. Disse reseptorene har som hovedfunksjon å gjenkjenne og binde ulike mikrobieliggander konservert og unike for mikroorganismer. Felles betegnes slike ligander mikrobeassosierte molekulære kombinasjoner (MAMP). Lipopolysakkaridene (LPS), dobbelt- trådet RNA, peptidoglykaner, bakterielle lipopeptider og umetylerte CpG DNA er blant eksemplene på MAMP [89]. Det skilles i dag mellom tre forskjellige grupper av PRR. De mest kjent og studerte PRR er de transmembrane toll- like reseptorene (TLR), mens nukleotidbindende oligomeriserende domeneproteiner (NOD) og en gruppe av fagocytiske reseptorer representerer de to øvrige gruppene [90]. Ved ligandaktivering av PRR aktiverer også en rekke sekundære budbringere, som resulterer i aktivering av NF- κ B og translasjon av ulike proinflammatoriske cytokiner.

6.3.2. TLR- fordeling og funksjon

Selv om kunnskapen rundt uttrykk og funksjonen til TLR i tarmvevet er begrenset, viser *in vivo* og *in vitro* studier at colonocyttene uttrykker blant annet TLR2, -4, -5, og -9. I det normale tarmvevet synes forekomsten av TLR å være avgrenset til bestemte lokalisasjoner hvor eksposisjonen til mikrofloraen er delvis kontrollert (17). Blant annet er uttrykk av TLR4 begrenset til colonocytter i bunnen av glandula intestinales, mens uttrykk av TLR5 er begrenset til den basolaterale deler av colonocytene. Ved inflammatoriske tilstander i tarmvevet tapes derimot denne strukturelle fordelingen, og blant annet uttrykk av TLR4 har vist stor oppregulering og uttrykk utover de basale colonocytene i glandula intestinales (18).



Figur 6 – Den TLR- medierte reaksjonskjeden. TLR som via MyD88 aktiverer IRAKs (*IL1 reseptorassosiert kinaser*) og TRAF6 (*TNF- reseptorassosiert faktor 6*), som igjen fører til aktivering av IKK- komplekset, som består av iKK α , iKK β og iKK γ (også kjent som *IKK1*, *IKK2* og *NF- κ B modulator/NEMO*). Denne veien blir brukt av TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 og TLR9 og frigjør NF- κ B fra sin inhibitor og translokeres til kjernen, hvor den inducerer uttrykk av proinflammatoriske cytokiner.

TLR4 mutasjoner har blitt assosiert med redusert følsomhet for LPS både i humane og animale studier (49). TLR4 Asp229Gly polymorfismen er blant annet assosiert med svekket respons på LPS og dermed økt følsomhet for gram negative infeksjoner. Denne mutasjonen er assosiert både med MbC og UC med en relativ risiko på 2.6 (57). På samme måte predisponerer TLR2 polymorfisme for stafylokokkinfeksjoner, lepra og tuberkulose, mens TLR5

polymorfisme er assosiert med legionellainfeksjoner. Forøvring ingen rapporterte assosiasjoner mellom IBD og TLR2 og -5 polymorfisme [60].

TLR uttrykkes som nevnt tidligere også på ulike medfødte immunceller. Stimulering av disse resulterer i cytokinproduksjon og direkte aktivering av det adaptive immunforsvaret gjennom T- celledstimulering [26].

6.3.3. NOD – fordeling og funksjon

NOD1 og NOD2 er to medlemmer av NOD- familien, og representerer den andre gruppen av PRR. Disse reseptormolekylene er uttrykt i cytosol og er dermed optimalisert for detektering av intracellulære mikrobeligander [91]. Disse molekylene er også funnet å ha strukturgenetisk likhet med noen infeksjonsbegrensende faktorer i planteceller, og det tenkes derfor at dette er en nedarvet og evolusjonistisk bevart egenskap [26]. På molekylært nivå er de to største forskjellene mellom subtypene at NOD1 består av et caspase aktiverende og rekrutterende domene (CARD), mens NOD2 består av to slike domener. Begge subtypene binder forskjellige muropeptider, et nedbrytingsprodukt av bakterielle peptidoglukaner. NOD1 har høyest affinitet for liganden GM-triDAP som primært finnes på gram negative bakterier, men også hos noen gram positive bacillus arter. NOD2 har høyest affinitet for muramyl dipeptid (MDP) som finnes på både gram negative og positive bakterier [92]. Både GM-triDAP og MDP er fra tidligere kjent å ha viktig kostimulerende effekt ved induksjon av en immunrespons, en effekt som nå antas å medieres gjennom aktivering av NOD i antigen presenterende celler [93].

Ved ligandaktivering av NOD kan dette komplekset binde til adapterproteinet RIP2 som igjen interagerer med IKK γ (en del av IKK- komplekset, og dermed også er en del an TLR reaksjonskjeden) som aktiverer NF- κ B [26].

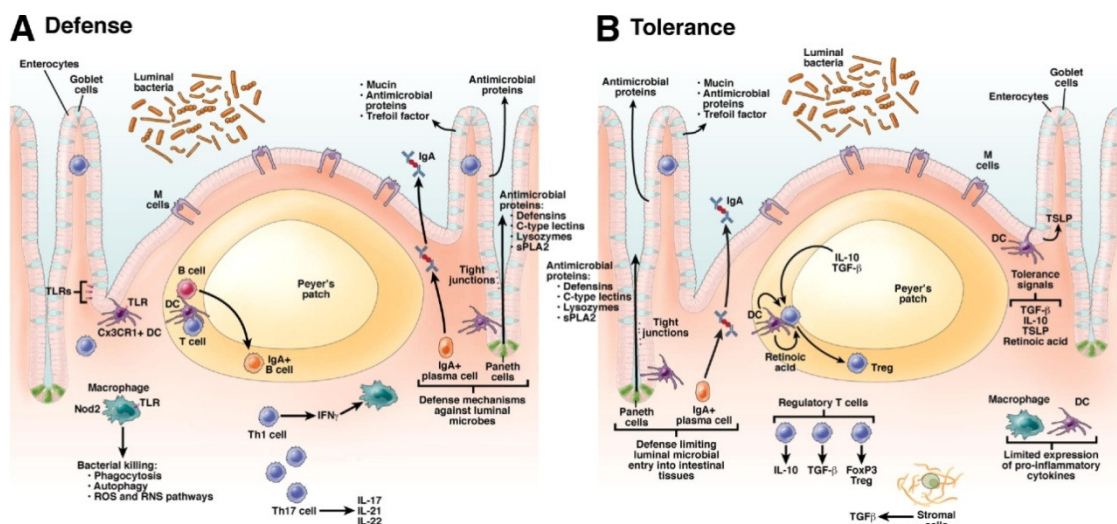
Kort oppsummert er den funksjonelle forståelse av hvordan en vert interagerer med tarmfloraen lite kartlagt. Men mange av konseptene som emergerer fra nyere forskning tyder på at den intestinale homeostasen avhenger av interaksjoner mellom mikrobene, slimhinnen og immuncellene.

Hver enkelt av disse komponentene ser ut til å kommunisere med hverandre. Det synes sannsynlig at TLR og NOD deltar i denne dialogen mellom komponentene.

6.4. Immunologi

Den høye tettheten av mikroorganismer i tarmlumen sørger følgelig for en kontinuerlig kontakt mellom vertsceller og mikrober. Som nevnt tidligere har denne symbiosen evolusjonistisk sett vært fordelaktiv for verten, men kan som vi også vet bidra negativt med intestinale infeksjoner og inflammasjoner. Det intestinale immunsystemet har derfor to omfattende oppgaver, hvor det på den ene siden må beskytte mot patogene mikrober og ugunstige overvekster, mens det på den andre siden må utvikle toleranse og besørge for opprettholdelse av mikroflora [94]. En balanse som delvis opprettholdes gjennom antimikrobielle førstelinjemekanismer og delvis ved å regulere det adaptive immunsystemets populasjoner av immunologiske celler med regulatoriske og stimulerende egenskaper [5].

Slimhinnens barrierefunksjoner, produksjon av antimikrobielle enzymer som blant annet lysozymer og defensiner, mucus produksjon og sekresjon av immunoglobulin A (IgA) er noen av eksemplene på dette viktige førstelinjeforsvaret. Mekanismene som kontrollerer den intestinale toleransen inkluderer først og fremst de førstelinjemekanismene som minimerer eksposisjonen av mikrofloraen til vertscellene, samt de faktorene som nedregulerer immunresponsen. Sistnevnte faktorer virker primært gjennom regulering av PRRs fordeling og følsomhet, sekresjon av antiinflammatoriske cytokiner, samt inhibering av intracellulære signalkjeder involvert i immunresponser [94].

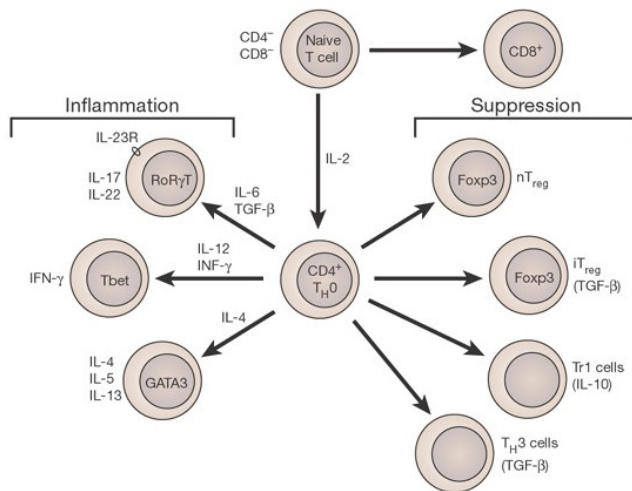


Figur 7 - Mekanismer for vertens forsvar og toleranse overfor intestinale mikrober. **(A)** Førstelinjes forsvarsmekanismer: Intestinale epitelceller gir en fysisk barriere mellom de luminal mikrober og det underliggende intestinale vevet. Spesialiserte epitelceller produserer mucus og sekresjon av antimikrobielle proteiner begrenser også den bakterielle eksponeringen. Produksjon av store mengder IgA gir ekstra beskyttelse. **(B)** Toleransmekanismer: Mekanismer som begrenser den mikrobielle eksponeringen ovenfor det intestinale vevet tjener også som en mekanisme for toleranse. Differensiering av Treg populasjoner, regulert av IL-10, TGF- β , og retinolsyre [94].

Når førstelinjeforsvaret ikke lykkes i å opprettholde den naturlige homeostasen, kan det forenklet sett tenkes at det adaptive immunforsvaret aktiveres. Dette systemet fremmes først og fremst av signaler fra komponenter i det medfødte forsvar, men er i tillegg også selvforsterkende. Responsen kan utvikle seg til ulike dominante celleprofiler som T_H1 , T_H2 og T_H17 , avhengig av den aktuelle responsens cytokinprofil. T_H1 utvikling utløses av faktorer som stimulerer til produksjon av $IFN\gamma$ og IL12, signalisert gjennom kjernereseptorene STAT1, TBX21 og STAT4. Mens IL4 gjennom kjernereseptorene STAT6 og GATA3 er essensiell for utløsning av T_H2 celledifferensiering. Den eksakte mekanismen for stimulering av T_H17 cellelinjen er ikke fullstendig kartlagt, men det ser ut som om IL23 og det regulatoriske cytokinet TGF β gjennom kjernereseptoren ROR γ t signaliserer for differensiering av proliferering av T_H17 celler [95].

T_H1 celler produserer $IFN\gamma$ og deres sentrale rolle finnes i beskyttelse og bekjempelse av intracellulære mikrober og virus. T_H2 celler produserer IL4, IL5 og IL13 og er involvert i allergiske sykdommer samt forsvar og bekjempelse av ekstracellulære mikrober og helmintiske infestasjoner. T_H17 produserer IL17 og er primært funnet å assosiere med akutt inflammasjonsrespons (inkludert

rekruttering av nøytrofile via stimulasjon av cytokinet IL-8) og autoimmune sykdomstilstander [96].



Figur 8 - Differensiering av CD4 T-celler. Den relative balansen mellom effektor T-celler og regulatoriske T-celler definerer fordøyelseskanalens immunitet og den inflammatoriske reaksjon. TH1, TH2, TH17 og Treg celler er tilstede i tarmslimhinnen og deres differensiering bestemmes av cytokiner, chemokiner, self-ligander og mikrobielle produkter tilstede i lokale og systemiske miljø [95].

Den inflammatoriske prosessen ved UC og MbC ble inntil nylig oppfattet som forholdsvis T_H2 og T_H1 definerte responser. TH17 har imidlertid fått mye oppmerksomhet siste tiden. Flere studier har demonstrert at IL23 reseptor, samt flere andre gener involvert i TH17 differensieringen er assosiert med utviklingen av både MbC og UC.

7. Behandling

IBD er en kronisk tilstand der hovedmålet er å behandle akutte forverringer, hindre tilbakefall, oppdage karsinomer i tidlig stadium, samt selektare pasienter for kirurgi. Behandlingen styres av flere faktorer og må være multidimensjonell; type sykdom, lokalisasjon av lesjoner, alvorlighetsgrad, komplikasjoner, respons / toleranse hos pasienten og hvilken fase pasienten befinner seg i [18].

7.1. Medikamentell behandling

De inflammatoriske manifestasjonene av UC og MbC behandles med et spekter av de samme medikamentene. Mildere sykdom behandles ofte med orale eller rektalt administrerte aminosalicylater. Sykdom refraktær til aminosalicylater kan behandles akutt med corticosteroider, mens opprettholdelse av remisjon kan kreve immunomodulatoriske eller immunosuppressive stoffer, enten alene eller i kombinasjon med aminosalicylater. Alt i alt krever dette en stegvis tilnærming

med progresjon av det medikamentelle regimet inntil respons på behandlingen oppnås [16].

7.1.1. Aminosalicylater

Dette er kjemiske forbindelser basert på en 5-aminosalicylsyre (5-ASA) komponent. Det finnes i dag fire ulike 5-ASA forbindelser til godkjent bruk. Sulfasalazin har en kjemisk struktur bestående av 5-ASA kovalent bundet til sulfonamidet sulfapyridine. Sulfapyridine er inert, men tillater 5-ASA å forbli i tarmlumen inntil distale del av tynntarm eller colon hvor det lokalt virker antiinflammatorisk. Mesalazine består av et enkelt 5-ASA molekyl, mens Balsalazide er en 4-ASA forbindelse. Olsalazin er en dimer av 5-ASA [18].

Virkningsmekanismen for 5-ASA er fortsatt ikke helt klarlagt, men det er tenkt at den antiinflammatoriske effekten kommer av inhibering av prostaglandin og leukotrien produksjonen, scavenging av frie radikaler, og/eller ved hemming av nøytrofil chemotaxe og superoxid dannelse [97].

Ulike formuleringer tilfører ulike konsentrasjoner til ulike avsnitt av tarmlumen. Aminosalicylater er tilgjengelige som perorale tabletter, rektalvæske, suppositorer og rektalskum. De ulike formuleringene gjør at valget av 5-ASA preparat baserer seg på lokalisasjon av sykdommen. For eksempel vil pasienter med isolert proktitt egne seg best for behandling med suppositorer eller rektalvæske [16, 18].

For pasienter med UC er 5-ASA preparater førstevalg ved mild-moderat akutt kolitt, samt ved vedlikeholdsterapi for opprettholdelse av remisjon. Studier har vist at 5-ASA er bedre enn placebo i behandling av aktiv mild-moderat UC og MbC for å indusere remisjon [19, 98]. For pasienter med MbC er 5-ASA preparater aktuelle ved mild-moderat akutt sykdom. 50 % oppnår remisjon, og kan hos disse også brukes som vedlikeholdsbehandling [18]. Metaanalyser har imidlertid vist at induksjon og opprettholdelse av remisjon med 5-ASA ved MbC er tvilsom, og at man bruker i dag mindre 5-ASA i denne pasientgruppen [99].

7.1.2. Corticosteroider

Corticosteroidene finnes i mange varianter både til peroralt, parenteralt og lokalt bruk også når det gjelder IBD. Lokale corticosteroider (rektalvæske eller skum) kan brukes som et tillegg til 5-ASA preparater for pasienter med ulcerøs proctitt eller distal ulcerøs kolitt [16].

Corticosteroidene er potente antiinflammatoriske medikamenter for bruk ved moderat til alvorlig tilbakefall av både UC og CD. De har ingen rolle i vedlikeholdsterapi grunnet deres langtidsbivirkninger. Selv om noen bivirkninger er akseptable i en akutt syk pasient eller hos en som ikke responderer på 5-ASA behandling, er bivirkningene større enn fordelene på lengre sikt. Virkningsmekanismen er heller ikke for corticosteroider fullstendig kartlagt, men virker sannsynligvis gjennom inhibisjon av flere inflammatoriske reaksjonsveier; undertrykking av interleukin transkripsjonen, induksjon av I κ B som stabiliserer NF κ B komplekset, undertrykker arachidonsyre metabolismen og stimulerer til lymfocytt apoptose i lamina propria i tarmveggen [100].

Systemiske corticosteroider som prednisolon administrert 40 til 60 mg daglig kan indusere remisjon i 70-80 % av moderat-alvorlig UC der terapi med 5-ASA er mislykket. Parenterale corticosteroider er indisert når en alvorlig eller fullminant forverring av UC krever innleggelse, eller når en 7-14 dagers peroral kur med steroider ikke har hatt effekt [18].

Ved mild-moderat ileal, ileocolonisk eller isolert colonsykdom ved MbC kan peroral budenosid i tillegg til 5-ASA terapi brukes. Budenosid er et peroralt corticosteroid med begrenset systemisk absorpsjon, grunnet høy førstepassasjemetabolisme. Ved moderat-alvorlig sykdom startes steroidbehandling så fort infeksjon og abscess er utelukket. Det kreves vanligvis en 7-14 dagers kur med prednison, 40-60 mg/dag, før tilstrekkelig respons. Ved fullminant MbC eller moderat-alvorlig sykdom som ikke svarer på peroral corticosteroidbehandling vil parenteral corticosteroidbehandling bli nødvendig sammen med immunosuppressiva / imunomodulatorisk behandling [18].

For aktiv UC er studiene gamle, men konsistente; peroralt prednisolon induserte remisjon i 77 % av 118 pasienter med mild-moderat sykdom innen 2 uker, sammenlignet med 48 % for daglig behandling med 8 g sulfasalzin. En kombinasjon av rectale og perorale steroider er bedre en det ene alene [101, 102].

For MbC har to store studier vist at corticosteroider er effektive i å inducere remisjon. The National Co-operative Crohns Disease Study randomiserte 162 pasienter og oppnådde 60 % remisjon med 0.5 – 0.75 mg/kg/dag prednisolon og seponering over 17 uker sammenlignet med 30 % på placebo [103]. Den sammenlignbare European Co-operative Crohns Disease Study på 105 pasienter, oppnådde 83 % remisjon på 1mg/kg/dag med prednisolon over 18 uker [104]. Det er dog verdt og bemerke at kriteriene for remisjon i de fleste slike studier var basert på klinisk remisjon, og ikke endoskopisk remisjon. Dermed er effekten sannsynligvis noe overvurdert.

7.1.3. Azathioprine(AZA) og 6-mercaptopurine(6-MP)

Dette er de mest brukte immunosuppressive midlene når det gjelder behandling av inflammatorisk tarmsykdom [16]. Det finnes i dag to preparater godkjent for bruk i behandling av IBD; AZA og dets aktive metabolitt 6-MP [98, 105]. AZA omdannes til 6-MP non-enzymatisk, og disse preparatene er like i deres virkningsmekanismer, effekt og toksisitetsprofil. 6-MP er en purinantimetabolitt og virker ved å inhibere purinmetabolismen og er cytotoxisk. Både cellemedierte og antistoffmedierte immunreaksjoner hemmes av dette stoffet, da det inhiberer den klonale proliferasjonen under induksjonsfasen av immunresponsen gjennom en cytotoxisk virkning. Slik fungerer også mercaptopurine alene [97].

Hovedrollen for bruk av disse legemidlene er å spare pasienter for steroidbehandling, dette gjelder både ved UC og MbC. Ved UC er indikasjonene mild til moderat sykdom der perorale steroider ikke fører frem, og 5-ASA preparater ikke gir tilfredsstillende effekt for opprettholdelse av remisjon. Ved MbC bør disse medikamentene vurderes ved moderat til alvorlig sykdom når

corticosteroiders bivirkninger ikke kan tolereres eller når nedtrapping av doseringen ikke lykkes i tilfeller der kirurgi ikke er indisert [18].

Nytten av bruken inntreer vanligvis først etter 3 måneder, men kan ta opp til 6 måneder. Med andre ord er denne behandlingen ikke effektiv ved akutt sykdom, og skal kun brukes når langtidsbehandling er planlagt. Bivirkningene som kan være svært alvorlig, begrenser ofte bruken av AZA og 6-MP [16].

7.1.4. Ciclosporin

Ciclosporin er en forbindelse som først ble funnet i sopp. Det består av et syklisk peptid av 11 aminosyrer med potent immunosuppressiv aktivitet, uten noen effekt på den akutte inflammatoriske reaksjonen per sé. Forbindelsen er dog ikke cytotoxisk. Hovedvirkningen er en relativt selektiv inhibitorisk effekt på IL-2 gentranskripsjonen. Virkningen inntreer etter 1-2 uker, og er dermed raskere enn AZA eller 6-MP [97].

Hovedrollen til dette legemidlet er sannsynligvis som en bro inntil enten colectomi kan utføres eller immunmodulatorisk behandling (AZA, 6-MP) blir effektiv. Cyclosporinbehandlingen bør kontinueres i flere måneder mens steroidene trappes ned, og samtidig behandling med AZA eller 6-MP [98].

Remisjon oppnås hos >80 % av pasienter med alvorlig UC innen 1 uke, og remisjon opprettholdes i over halvpartene av disse pasientene. Uansett vil 70 % av pasientene trenge colectomi innen 1 til 2 år [18].

En metaanalyse av 4 RCTs viste at ciclosporin ikke har noe verdi i behandlingen av CD [106].

7.1.5. Methotrexat (MTX)

MTX er en folatantagonist, og er en av de mest brukte antimetabolittene ved kjemoterapi. Folater er essensielle for syntesen av purinnukleotider og thymidilat, som igjen er essensielle for DNA syntese og celledeling [97].

Legemidlet virker ved at polyglutamat metabolitter av MTX inhiberer dihydrofolat reduktase, men denne cytotoxiske effekten forklarer ikke dets

antiinflammatoriske effekt, som utnyttet ved IBD. Denne virkningen er i stor grad ukjent, men deriblant bidrar sannsynligvis inhibisjon av cytokin- og eicosaniodsyntesen [98].

MTX er effektiv for vedlikeholdsbehandling og induksjon av remisjon hos pasienter med MbC. I en RCT studie ble 141 steroidavhengige pasienter randomisert til enten 25 mg/uke intramuskulær MTX eller placebo i 16 uker, med en ledsagende dose prednisolon som ble redusert over 3 måneder. Flere pasienter i MTX gruppen kunne seponere prednisolon og gå inn i remisjon (39 % vs. 19 %). Preparatet viser seg også effektivt i å hindre tilbakefall etter at remisjon er oppnådd med MTX [98]. Ukentlige injeksjoner egner seg som vedlikeholdsterapi [18]. Ingen sammenlignbare studier er gjort på bakgrunn av MTX for induksjon av remisjon eller vedlikeholdsbehandling hos UC pasienter [98]. Heller ingen studier er gjort for å sammenligne MTX med 6-MP eller AZA [18]. Med andre ord er det ingen studier som så langt har vist at MTX har en rolle i behandling av UC.

7.1.6. Biologisk behandling (anti-TNF α)

Tumornekrosefaktor α (TNF α) er et viktig proinflammatorisk cytokin, som nevnt tidligere er vist å ha betydning i immunopatogenesen ved IBD. Infliximab er et antistoff mot TNF α som gis intravenøst og som ble registrert i Norge til behandling av luminal og fistulerende MbC i -00, og til behandling av UC i -06. Adalimumab, et TNF α antistoff som gis som subkutan injeksjon, ble registrert for bruk ved luminal MbC i -07. Disse preparatene inngår i det som man i dag kaller biologisk behandling [107].

Remicade er et kimært humantmurint monoklonalt antistoff (IgG1). Stoffet virker ved å binde med høy affinitet til løselige og transmembrane former av TNF α , og hemmer dermed bioaktiviteten til TNF α . Behandlingen gir en reduksjon i antall celler som er i stand til å utskille TNF α og interferon- γ , og reduserer infiltrasjon av inflammatoriske celler i det angrepne området samt tilstedeværelse av inflammasjonsmarkører [105].

Adalimumab er et rekombinant humant monoklonalt antistoff. Dette stoffet virker ved å binde seg spesifikt til TNF og nøytraliserer TNFs biologiske funksjon ved å blokkere interaksjonen med TNF-reseptorene p55 og p75 på celleoverflaten. Det modulerer også biologiske responser som induseres eller reguleres av TNF, deriblant endringer i mengden av adhesjonsmolekyler som er ansvarlig for leukocyttmigrasjonen (ELAM, VCAM-1 og ICAM-1) [105].

Behandling med anti-TNF preparater er indisert ved moderat eller alvorlig IBD der adekvat medisinsk behandling med 5-aminosalisylsyre, steroider og/eller immunmodulerende behandling har gitt utilstrekkelig effekt eller alvorlige bivirkninger, og der kirurgi heller ikke synes hensiktsmessig [108].

Anti-TNF-behandling er kontraindisert ved aktiv eller latent/kronisk infeksjon, deriblant hepatitt C og B, samt tuberkulose. Det kreves spesiell årvåkenhet hva gjelder tuberkulose. Moderat eller alvorlig hjertesvikt regnes som kontraindikasjon, da anti-TNF-behandling er vist å kunne forverre tilstanden [109]. Bruk av TNF α -antistoffer hos pasienter med malign sykdom er også kontraindisert [108]. Da TNF α er sentral i danning og opprettholdelse av granulomer, er det ikke uventet at anti-TNF-behandling øker risikoen for reaktivering av latent tuberkulose og for ekstrapulmonal sykdom [110]. Det foreligger også rapporter om reaktivering av stabil hepatitt B-virusinfeksjon ved behandling med anti-TNF. Reaktivering av herpes zoster er det vanligste virale problemet assosiert med behandlingen [111].

Da TNF α utgjør en del av immunsystemets forsvar mot mikroorganismer, vil det naturlig nok foreligge en økt infeksjonsfare hos denne pasientgruppen. Dette er foreløpig best dokumentert for pasienter med revmatoid artritt. For disse er det i en større metaanalyse beregnet at for å få en alvorlig infeksjon er antallet behandlede (NNT) 59 for en behandlingsperiode på 3–12 måneder [112]. For inflammatorisk tarmsykdom har man verken ved randomiserte placebokontrollerte studier eller ved metaanalyser [113] sikkert kunnet påvist økt infeksjonstendens sammenliknet med placebo [114, 115].

Bruken av TNF α antagonister til behandling av inflammatorisk tarmsykdom bygger i hovedsak på resultater fra relativt få randomiserte placebokontrollerte

studier. Men i alle fall for Crohns sykdom er resultatene når det gjelder effekt nokså sammenfallende [114, 116, 117]. I 1997 viste Targan og medarbeidere at 65 % av pasienter med moderat eller alvorlig MbC oppnådde bedring etter en enkel infusjon med infliximab, mot 17 % i placebogruppen [118]. 30 % av dem som fikk aktivt medikament, var i remisjon etter fire uker. ACCENT I-studien viste at etter behandling med infliximab hver 8. uke, hadde 40 % av dem med initial respons fortsatt effekt etter 54 uker, mot 21 % i placebogruppen. Effekten var altså klart bedre enn placebo, men av dette fremgår også at mange pasienter mistet behandlingseffekt over tid [114].

Infliximab ser også ut til å redusere behovet for sykehusinnleggelses og kirurgiske inngrep hos pasienter med MbC [119].

De studier som foreligger for adalimumab ved luminal og fistulerende Crohns sykdom viser effekt på samme nivå som for infliximab [116, 117]. Det foreligger så langt ikke studier som direkte sammenlikner effekten av ulike anti-TNF antagonister. Imidlertid er det holdepunkter for at en del av pasientene som ikke responderer på, er intolerante for eller har mistet effekten av infliximab, kan oppleve effekt av adalimumab [120].

Ved UC har resultatene hittil vært mindre entydig [115, 121], spesielt i spørsmålet om behandling med anti-TNF reduserer risikoen for kolektomi. Studiene ACT I og ACT II viste at henholdsvis 69 % og 65 % av infliximabbehandlede pasienter responderte etter åtte uker, mot 37 % og 29 % av dem som fikk placebo [115]. Etter ett års behandling hadde fortsatt 40 % av dem med initial effekt klinisk respons, sammenliknet med 20 % av de placebobehandlede. Det ble påvist at noen pasienter med steroidrefraktær kolitt kunne unngå kolektomi på kort sikt, mens andre rapporter med færre pasienter anga usikker effekt hva gjelder risiko for kolektomi [122]. Det er dermed fortsatt uklart om infliximab vil redusere antall kolektomier på lang sikt.

I en metaanalyse fra 2006 fant man økt forekomst av kreft og spesielt lymfomer ved bruk av infliximab eller adalimumab hos pasienter med revmatoid artritt, hvor NNT per malignitet ble beregnet til 154 for en behandlingsperiode på 6–12 måneder [112].

Mest bekymringsfullt er likevel rapporter fra Food and Drug Administration (FDA) i USA om en sjelden variant av høygradig malignt hepatosplenisk T-cellelymfom som hittil har rammet et tjuetalls yngre menn behandlet med både anti-TNF og immunmodulerende medikamenter [123, 124]. Dette har ført til argumentasjon for å begrense slik kombinasjonsbehandling.

7.2. Kirurgisk behandling

Ved IBD spiller kirurgi to ulike roller når det gjelder henholdsvis UC og MbC. Rundt 15-40 % av UC pasienter vil til slutt ende opp med kolektomi [17]. Indikasjonene er mange, og kan deles inn i absolutte og relative. Absolutte indikasjoner inkluderer; alvorlige blødninger på grunn av ulcerasjoner, perforasjon, cancer coli eller høygradig dysplasi, alvorlig (fullminant) kolitt eller toksisk megacolon som ikke responderer på maksimal intravenøs medikamentell terapi [18, 19]. Relative indikasjoner dreier seg om mindre alvorlige tilstander, men medisinsk vanskelig behandlede symptomer som resulterer i fysisk utmattelse, psykososial dysfunksjon og nedsatt QoL (quality of life). I tillegg intolerable bivirkninger av medikamentell terapi (særlig steroider), samt alvorlig progressiv pyoderma granulorum [18].

Ved UC involverer kirurgi fjerning av hele colon og rectum og helbreder pasienten (kurativ). Inngrepet er enten panproctocolectomi med ileostomi eller proctocolectomi med ileal-anal pouch anastomose (IAPA) [18]. Et hvert kirurgisk inngrep i colon hos UC pasienter der mer enn rectosigmoideum er involvert bør inkludere fjerning av hele colon, og viss mulig også rectum. Total proctocolectomi og eventuelt ileoanal anastomose er prosedyren som foretrekkes, dette grunnet at en ikke bare fjerner hele tarmen som er mottakelig for tilbakefall av kolitt, men det eliminerer risikoen for colorectal cancer i tillegg [18].

Når det gjelder MbC trengs kirurgi hos opptil 66 - 75 % av pasientene, og av disse må omtrentlig halvparten gjennom ny operasjon [17, 18]. Operasjon er ofte nødvendig på grunn av fistler, suppurative komplikasjoner, inkludert intraabdominale abscesser eller abscesser i pelvis. Også perineal sykdom/affeksjon, samt tilbakevendende obstruksjoner i tynn- eller tykktarm og artritt vil kunne indikere kirurgi. Således vil psykososiale forhold og terapivikt

og bivirkninger spille en rolle her som ved UC [18, 19]. I kontrast til UC er ikke kirurgi kurativ og tilbakefall av sykdom er regelen heller enn unntaket. Kirurgisk intervensjon skal derfor være så konservativ som mulig for å kunne minimere tap av viabel tarm og unngå korttarmsyndrom. Obstruksjon eller fistulerende tynntarmssykdom kan kreve reseksjon av det affiserte vevet. Pasienter med lokaliserte segmenter av Crohn kolitt kan klare seg med segmental reseksjon og/eller multiple strikturoplastikker. Andre som har uttalt kolitt krever total colectomi, men IPAP dannelse bør unngås pga den høye risikoen for tilbakefall av sykdom i pouchen (pouchitt) med subsekvent fistel- og abscessdannelse og pouch svikt [19].

8. Pionérstudier ved gastroenterologisk forskningslaboratorium

Det har lenge vært kjent at det proinflammatoriske cytokinet TNF α innehar en sentral rolle i inflammasjonen ved MbC. Pionérstudier ved Gastroenterologisk forskningslaboratorium, IKM, UiT, har imidlertid også vist at cytokinet er en viktig mediator ved UC.

I -07 ble artikkelen "Tissue levels of tumor necrosis factor alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis", publisert, der en viste at genuttrykket av TNF α mRNA i colorectalmucosa er sterkt uttrykt og korrelerte med graden av inflammasjon hos ubehandlede UC pasienter [125].

Studiene har vist at infliximab behandling fører til redusert uttrykking av TNF α og INF γ mRNA, der reduksjonen av TNF α mRNA korrelerte med klinisk endoskopisk bedring hos UC pasienter [126].

Studien fra 2009 konkluderte med at det kliniske utfallet ved en standard induksjonsterapi med IFX ved UC er inverst assosiert med nivået av TNF α mRNA i colorectalmucosa før behandling og er dermed en prediktor for remisjon etter induksjonsterapi [127].

Ut fra disse resultatene, presentert i overnevnte studier, kan en tenke seg at det for fremtiden vil være mulig å screene pasienter med tanke på TNF α mRNA nivå, og dermed bedre kunne selektene enkeltpasienter for behandling. Dermed vil gruppen som vil kunne svare best på behandlingen, bli kandidater gjennom å bruke TNF α mRNA fra

colonbiopsier som en markør for sykdomsaktivitet. Dette vil spare resten av pasientgruppen for bivirkninger, samt at en vil redusere kostnadene i forbindelse med IBD og biologisk behandling.

9. Metoder

9.1. Flow Cytometri [128-130]

Flow cytometri er et kraftig verktøy for analyse av multiple parametre for individuelle celler i heterogene cellepopulasjoner. Flow cytometre brukes for en rekke ulike applikasjoner som immunofenotyping, ploiditets analyser og celletelling, samt separasjon av celler.

Flow cytometret utfører disse analysene ved at cellene passerer enkeltvis med hydrodynamisk fokusering gjennom en laserstråle og at lyset, som kommer fra hver enkelt celle, fanges opp og analyseres. Data som samles kan analyseres statistisk av flow cytometri software og rapportere om cellekarakteristikker som størrelse, kompleksitet, fenotype og levedyktighet.

De primære enhetene i et flow cytometer består av flow kammeret, som leverer cellene til analysepunktet; laserne, som er lyskilden for scatter og fluorecense; optikken, som samler, leder og deler lyset; elektronikken og computersystemet, som omdanner signalene fra detektorene til digital data og utfører de nødvendige analysene.

For nøyaktig analyse er det viktig at partikler og celler passerer gjennom laseren en om gangen. De fleste flow cytometre klarer dette ved å injiserer prøven sammen med en strøm av sheat fluid, og prøven samles da til størrelsen av ca. en celle ved at sheat fluid-væsken omslutter cellene som en vegg, dette kalles hydrodynamisk fokusering. Dette skjer da væskene har ulik velocitet og densitet, og dermed ikke blandes.

Når en celle passerer gjennom laseren bryter den eller sprer lyset i alle retninger. Forward scatter er spredning av lyset i laserens retning/akse. Størrelsen av forward scatter er tilnærmet proposjonal til cellens størrelse, og styrken på dette signal kan dermed brukes til å angi cellestørrelse. Lysets fanges opp av en

detektor som omdanner lysintensiteten til volt. Små celler gir en liten mengde forward scatter, mens store celler gir en relativt større mengde. Dette kan fremstilles i histogrammer som en størrelsesdistribusjon av celler innen en cellepopulasjon.

Lys som spres i større vinkler, for eksempel til siden, skjer på grunn av granularitet og strukturell kompleksitet inne i cellen. Dette kalles side scatter. Dette lyset oppfattes av en annen detektor, vanligvis 90 gr. i forhold til laserstrålen. Dette kan fremstilles i histogrammer sammen med forward scatter og vil si noe om hvilke typer celler en har med å gjøre på bakgrunn av størrelse og kompleksitet av cellene. For eksempel vil lymfocytter fremstilles som celler med liten størrelse og liten intracellulær kompleksitet, i motsetning til granulocytter som er større med høyere intracellulær strukturell kompleksitet.

En annen teknikk som kan utnyttes er merking av celler med fluorescent-konjugerte antistoffer som gjør at merkede celler vil emitte lys av en spesifikk bølglengde etter å ha blitt eksitert av laseren. Ulike bølgelegder av emittert lys når så frem til ulike detektorer. Det instrument som har vært benyttet i de presenterte forsøkene har kapasitet til måling av 4 ulike fluorescenser i tillegg til forward- og side scatter. Dette gir mulighet for bestemmelse av immunfenotype. Dermed vil en kunne separere enkelte celletyper fra en heterogen cellepopulasjon.

En annen viktig funksjon i avanserte flow cytometre er evnen til å kunne sortere og samle en subpopulasjon av celler identifisert på bakgrunn av multiparameter analysen. Dette gjøres ved at cellene forlater analysekammeret som en væskestråle, som deretter brytes opp til dråper når den stimuleres med riktig frekvens. Cellene som passerer gjennom flow cytometret isoleres i disse små dråpene. Når computeren registrerer en celle som tilfredstiller parametrene for sorteringen appliseres en elektrisk ladning til dråpen. Polariteten til ladningen, positiv eller negativ, bestemmes ut fra sorteringskriteriene. Deretter passerer den ladede dråpen som inneholder den aktuelle cellen et elektrostatisk felt, og blir dermed deflektert til venstre eller høyre og samles.

9.2. MACS (Magnetic- activated cell sorting) [131, 132]

Immunomagnetisk separasjon av celler har vist seg å være en effektiv måte for å fremstille rene subpopulasjoner av celler. Ved denne metoden merkes cellene med magnetiske kuler som er dekket (coated) med monoklonale antistoffer spesifikke for antigenene uttrykt på populasjonen av målcellene. Den merkede cellepopulasjonen separeres så fra de umerkede cellene ved at en plasserer prøven eller passerer den gjennom et magnetfelt. Cellene bundet til kuler holdes igjen av magnetismen, mens cellene uten ekstraheres eller fjernes. Immunomagnetiske kuler er fordelaktige i bruk da de ikke introduserer biologiske produkter eller induserer toksisitet.

9.2.1. Immunomagnetiske mikrokuler

En rekke ulike partikler har blitt produsert ved å bruke ulike substanser som stivelse, dextran etc. I dag er de fleste, om ikke alle, magnetiske kuler paramagnetiske. De har med andre ord ingen permanente magnetiske egenskaper, men magnetisme kan induseres ved å applisere et magnetfelt. Dette er svært viktig da en hver rest av magnetisme vil redusere evnen og enkelheten for redispersjon under antistoff coating og celleseparasjon. Det finnes flere kommersielle leverandører av slike immunomagnetiske kuler, hovedsakelig MACS Microbeads av Miltenyi og Dynabeads av Dynal. Vi har benyttet oss av MACS under våre forsøk under protokollutviklingen.

9.2.2. MACS Microbeads

Ved MACS, merkes celler av interesse spesifikt med super-paramagnetiske mikrokuler. Etter merkingen filteres cellesuspensjonen gjennom en separasjonssøyle (med en ferromagnetisk matrix) som plasserer i en sterk permanent magnet. De magnetisk merkede cellene holdes dermed igjen i søylen og separeres fra de umerkede cellene som passerer gjennom. Begge fraksjonene, både de magnetisk merkede og de umerkede, kan så innehintes med høy renhet og viabilitet. Størrelsen til mikrokulene (ca 50 nm i diameter) skiller dem fra andre. Dermed er de 1 million ganger mindre enn en eukaryot celle og på størrelse med et virus. De vil da være for små til å

kunne visualiseres i et lysmikroskop eller ved flow cytometri, og vil derfor ikke kunne affisere lys scatteringen. Dermed er omgående og påfølgende flow cytometri gjennomførbar. Uansett MACS enkelhet, er teknikken begrenset grunnet behovet for en enkelt cellesuspensjon. Aggregering og celleklumping kan gi blokkering av søylen og hindre separasjon. Derfor er det i tillegg viktig å fjerne døde celler og debris fra cellesuspensjonen, da døde celler ofte blir uspesifikt merket eller fester seg til søylematricen.

9.2.3. Separasjonstyper

Det er to basale strategier for å isolere spesifikke subpopulasjoner av celler; positiv seleksjon og negativ seleksjon eller deplesjon. Positiv seleksjon innebærer isolasjon av en bestemt populasjon av celler for analyse. Måcellene merkes magnetisk med kuler og isoleres subsekvent direkte som den positive magnetiske fraksjonen. De resterende umerkede cellene forkastes vanligvis. De isolerte cellene kan så i mange tilfeller analyseres videre uten å fjerne merkingen. Positiv seleksjon kan være direkte eller indirekte. Ved direkte seleksjon er antistoffet festet til kulen direkte og ved indirekte seleksjon anvendes et primært antistoff mot de ønskede cellene og et magnetkonjugert sekundært antistoff mot det primære antistoffet.

Negativ seleksjon er fjerning av en uønsket populasjon celler fra en heterogen blanding. Dette tillater analyse eller videre seleksjon av de gjenværende umerkede cellene. Under den magnetiske separasjonen holdes de merkede uønskede cellene igjen i søylen, men de ønskede måcellene foreligger i den umerkede, ikke-magnetiske fraksjonen. Dette kan også gjøres direkte eller indirekte. I motsetning til positiv seleksjon stilles det her ikke krav til viabilitet av de merkede cellene.

9.3. Dead-Cert partikler

Dead-Cert teknologien er utviklet for å kunne skille viable celler fra døde celler og celledbris in vitro. Teknologien baserer seg på paramagnetiske nanopartikler. Disse binder strukturer som normalt ikke uttrykkes eller er tilgjengelige på levende celler. På grunn av dette kan de binde selektivt til apoptotiske celler,

nekrotiske celler og celledbris. Når binding har skjedd kan partiklene bundet til de døde cellene lett separeres fra resten av celleduspensjonen ved hjelp av et magnetfelt. De vil da dras inn mot beholderens vegg som ligger inn mot magnetfeltet. Dermed vil de viable cellene bli værende tilbake i løsningen og kan hentes ut [133].

9.4. GentleMACS™ Dissociator

GentleMACS™ Dissociator er et instrument for automatisk dissosiering/oppløsning av vev utviklet av Miltenyi Biotec [134].

10. Prosedyreutvikling

Utviklet i samarbeid mellom undertegnede og Rasmus Goll ved Laboratorium for Gastroenterologi og Ernæring ved Universitetet i Tromsø og Universitetssykehuset Nord-Norge.

10.1. Klargjøring av bufferløsning og celledyrkningsmedie

Det klargjøres på forhånd to løsninger med 10mL RPMI 1640. En tilsettes 0.1 % BSA (løsning 1). Den andre tilsettes 0.5 ug/mL Kollagenase II, 0.5 ug/mL DNase, 0.5 ug/mL Hyaluronidase, samt penicillin og streptomycin (løsning 2). Det skal i tillegg også klargjøres to løsninger med PBS, en tilsettes 0.1% BSA (løsning 3), mens en tilsettes 0.1 % BSA og mM EDTA (løsning 4). Løsning 4 avgasses, for å unngå bobledannelse i sorteringssøylen, alle løsningene lagres kaldt for å forhindre fagocytose av merkede antistoffer og paramagnetiske partiker.

RPMI 1640 ble utviklet av Moore et al. ved Roswell Park Memorial Institute (RPMI) og inneholder et buffersystem av bikarbonat justert til pH 8, samt ulike aminosyrer og vitaminer nødvendig for opprettholdelse av levedyktige celler [135].

BSA (Bovine serumalbumin) er serumalbumin isolert fra hornkveg, som benyttes i cellekulturer blant annet som næringsstoff, men også som et viktig osmol. Proteinet er biokjemisk inert og inngår derfor ikke i noen av de biokjemiske prosessene i cellemediet [136].

EDTA (etylendiamintetraeddiksyre) benyttes som en chelaterende agent som binder blant annet kalsium og forhindrer derfor sammenføyninger mellom kaderin og celleaggregeringer unngås [137].

PBS (Fosfatbuffer in saline) er en et buffersystem av fosfat oppløst i isoton saltløsning [138].

10.2. Oppløsning av biopsimateriale

Følgende protokoll er resultat av en lengre prosess. Slik den fremstår nå er den ikke fullstendig ferdigutviklet. Som det fremgår av resultatene nede har en del variasjoner vært testet ut, og utviklingsarbeidet pågår fortsatt.

Totalt seks biopsier tatt med grov biopsitang overføres direkte til løsning 1. Under denne prosedyren er det viktig at tangen ikke kommer i kontakt med cellemediet for å unngå store mengder kontaminasjon med tarmbakterier i mediet. Overfør biopsiene til gentleMACS™ Dissociators steril engangstube tilsatt løsning 2. Det kjøres først program B, dernest inkuberes løsningen i 25 minutter ved 37°C. Endelig kjøres m_liver_02.02 (valget av disse programmene er anbefalt av Miltenyi for bruk til tarmslimhinne). Etter dissosieringen filtreres suspensjonen gjennom et 30 µM MACS® filter. Sentrifuger (300G i totalt ti minutter) og resuspender to ganger i løsning 3, etter tredje sentrifugering tilsett 500 µL YES medium.

10.3. Eliminering av døde celler og celledbris

Eliminering av debris og døde/døende celler utføres ved hjelp av presortering og Dead Cert ® (DC) nanopartikler. Først utfører man presortering; celledisuspensjonen kjøres gjennom MACS- søylen i magnetfeltet, uten tilsatt antistoffer. På denne måten elimineres jernholdige celler og debris.

Så fordeles nanopartiklene i eget rør ved hjelp av vortexmaskinen (vortex). Deretter tilsettes et polypropylenrør 1 mL YES medium og 20 µL DC partikler med påfølgende grundig blanding ved hjelp av vortex. Røret plasseres så i magnetfeltet i 5 minutter. I etterkant suges mediet ut, med påfølgende resuspensjon av DC partiklene i 100 µL YES medium. Deretter tilsettes

cellesuspensjonen og blandes forsiktig med pipette. Røret settes så i kjøleskap i 40 minutter. Etterpå tilsettes 4 mL YES medium og blandes forsiktig med pipette. Røret plasseres så på ny i magnetfeltet i 5 minutter. De døde og døende cellene, samt debris vil nå ha festet seg til veggen i røret. Derfor pipetteres så cellesuspensjonen av mens røret fortsatt står i magnetfeltet.

Mikroskopi gjøres så for å verifisere tilstedeværelse av celler i suspensjonen.

YES medium er utviklet av Immunosolv for bruk i Deadcert kittet og inneholder 0.5% soppekstrakt, 3.0% glukose, 0.0225% adenin, 0.0225% histidin, 0.0225% leucin, 0.0225% uracil og 0.0225% lysin.

10.4. Cellesortering (MACS)

Videre skal celleløsningen forberedes til magnetisk separasjon og flow cytometri. Dette gjøres ved at to separate rør tilsettes 100 µL av suspensjonen. Begge rørene tilsettes så fluorescenskonjugerte antistoffer av samme type og mengde; 20 µL CD4- FITC / CD- 8 PE, 10 µL 7-AAD og 5 µL CD3- APC (alle fra BD Biosciences).

Etter tilsetning av antistoffene inkuberes løsningene i 30 minutter kjølig og beskyttet mot lys. Sentrifuger og resuspender begge løsningene to ganger med 3 mL PBS. Tilsett 500 µL av løsning 4 til løsningen som skal gjennomgå påfølgende sortering (sorteringssuspensjonen). 1 mL cellfix (PBS med formalin) tilsettes løsningen som skal direkte til flow cytometri, settes kjølig.

Tilsett så 20 µL MACS Anti- APC partikler til sorteringssuspensjonen, inkuber kjølig i 30 minutter. Anti- APC er et paramagnetisk merket antistoff som binder APC, dermed vil alle de CD3 positive cellene (som ble merket med anti CD3-APC) gjennomgå positiv seleksjon ved MACS [139].

Etter inkubasjon sentrifuger og resuspender løsningen to ganger med 3 mL løsning 4. Etter tredje sentrifugering tilsett kun 0,5 mL av løsning 4.

MACS- søylen klargjøres ved at en lar 500 µL av løsning 4 løpe gjennom, deretter plasseres den i magnetfeltet. Tilsett sorteringssuspensjonen og la denne løpe gjennom, dette samles i eget oppsamlingsrør og inneholder de negativt selekterte cellene (waste). Deretter tilsettes 500 µL av løsning 4 som en lar løpe gjennom,

dette gjentas tre ganger. Til slutt tas søylen ut av magnetfeltet og settes i et ferskt oppsamlingsrør. Skyll søylen med 1 mL av løsning 4. En vil nå ha fått ut de positivt selekterte cellene (target). Både den negativt og positivt selekterte suspensjonen klargjøres hver for seg for flow cytometri ved sentrifugering og påfølgende resuspending med 1 mL cellfix.

CD (cluster of differentiation) indikerer en definert undergruppe (epitoper) av cellulære overflatemolekyler. Molekylene benyttes hyppig som markører for immunfenotyping, der en benytter disse som antigener for fluorescense antistoffer, da en har kartlagt de ulike CD molekylene og hvilke celler som innehar disse. CD4 finnes på T-hjelper celler. CD8 finnes på cytotoxiske T-celler, mens CD3 finnes på alle T-lymfocytter [140].

FITC (Fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin) og APC (Allophycocyanin) er alle fluorescerende forbindelser som kan konjugeres til andre antigener eller antistoffer og dermed benyttes i direkte merking eller påvisning. 7-AAD (7-Aminoactinomycin) har sterk affinitet til dobbeltrådet DNA, men passerer ikke plasmamembranen til levende celler. Døde og døende cellers plasmamembran er endret eller permeabel og disse cellen vil dermed merkes [139].

11. Resultater

11.1. Preliminære forsøk

Ved første forsøk benyttet man seg av cellemedium bestående av 10 ml RPMI 1640/HEPES, 0,02 % Kollagenase II, 2 % BSA. Det ble tatt 2 biopsier med ordinær biopsitang. Inkubasjonstiden var på 1 time og 15 minutter i varmeskap ved 37 °C. Etter filtrering og vasking viste celletelling 0,8 – 1 million celler. Dette ble vurdert til å være for få celler og en gikk dermed ikke videre med MACS og flow cytometri. Det lave celletallet ble bekreftet ved gjentatte forsøk, en oppnådde ca. 30 % levende celler.

Etter diskusjon om effektivitet av enzymer økte man inkubasjonstiden til 16-18 timer, og la samtidig til en 25 min preinkubasjon med EDTA.

Deretter økte man antallet biopsier til 6 stykker tatt med jumbotang og la til DNase, Hyaluronidase og antibiotika (streptomycin/penicillin). Da fikk man ca. 1-2 millioner celler hvor > 80 % var levende. Dette ble bekreftet ved gjentatte forsøk hvor man fikk 1-2 millioner celler hvorav 60-70 % var levende.

Videre forsøkte man protokollen med to ulike konsentrasjoner av DNase, henholdsvis 2 U/mL og 4 U/mL. Dette resulterte i 1,5 ganger flere celler isolert fra inkubasjonen med høy DNase konsentrasjon med ca. 86-90 % levende celler.

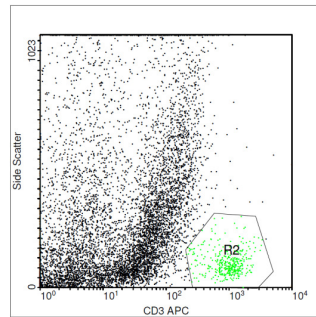
Dernest gjorde man forsøk med 4 U/mL DNase der en mekanisk delte opp vevsbitene med skalpell før inkubasjon. Dette gav ca. 2 millioner celler, hvorav 73 % var viable.

Ved første test av MACS med påfølgende flow cytometri fikk man lite CD3 + i waste, men mye debris i targetfraksjonen.

En forsøkte deretter å reduserte mengden debris ved å henholdsvis gjenta sorteringsprotokollen, skylle søylen ekstra før sortering og gradientsentrifugere suspensjonen i forkant. Ingen av de tre tiltakene hver for seg hadde noen effekt på mengden debris.

Man fikk i våren 2011 mulighet for å få en GentleMACS maskin på utlån fra den norske agenten for Miltenyi Biotech (Fischer Scientific). Man adapterte da en protokoll som har vært brukt for isolasjon av celler fra musetarm, foreslått av firmaet. Protokollen innebærer å kjøre to ulike programmer, og filtrere den resulterende suspensjon. Dette er basis for nåværende protokoll, med de modifikasjoner som fremgår over.

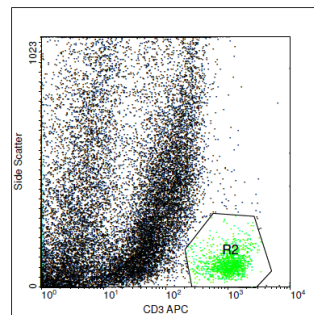
11.2. Presortering



Figur 9- Grafisk fremstilling av plotdata fra usortert suspensjon (RAW) før presortering. CD3+ celler (Grønn), debris (Sort).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	16439	81.78	100.00
R2	773	3.84	4.70

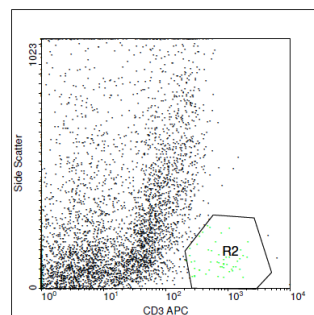
Tabell 1 – Plotdata fra usortert cellesuspensjon (RAW) før presortering.



Figur 10 - Grafisk fremstilling av plotdata etter presortering. CD3+ celler (Grønn), debris (Sort).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	41582	83.16	100.00
R2	2434	4.87	5.85

Tabell 2 – Plotdata av suspensjon etter presortering.



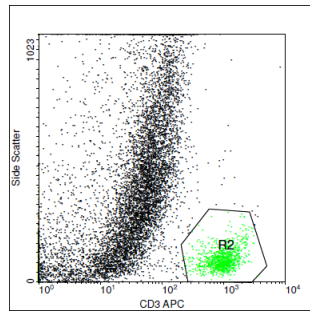
Figur 11 - Grafisk fremstilling av plotdata fra negativt selektert materiale etter presortering. CD3+ celler (Grønn), debris (Sort).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	8576	82.03	100.00
R2	119	1.14	1.39

Tabell 3 – Plotdata fra negativt selektert materiale etter presortering.

Av figur 9 og tabell 1 ser vi at usortert suspensjon (RAW) inneholder 4.70 % CD3+ celler samt mye debris. Det utføres deretter presortering, og ut fra figur 10 og tilhørende tabell ser en at andelen CD3+ øker med en faktor på 1.25, grunnet eliminering av debris. Dette fremgår av figur 11, men også et CD3+ celletap.

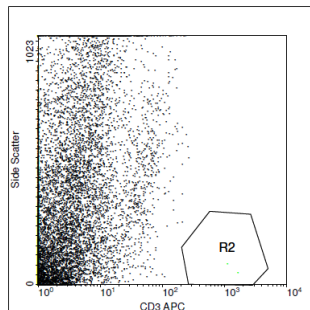
11.3. MACS



Figur 12 - Grafisk fremstilling av plotdata av positivt selektert materiale ved MACS (TARGET).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	18381	91.91	100.00
R2	1990	9.95	10.83

Tabell 4 - Plotdata fra positivt selektert materiale etter presortering.



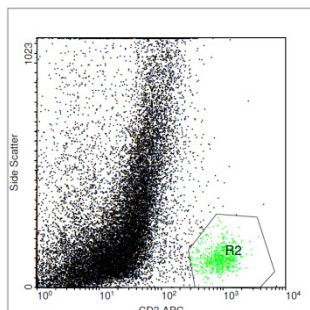
Figur 13 - Grafisk fremstilling av plotdata av negativt selektert materiale ved MACS (WASTE).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	19540	97.70	100.00
R2	3	0.02	0.02

Tabell 5 - Plotdata fra negativt selektert materiale etter presortering.

Figur 12 og 13 med tilhørende tabeller viser at tapet av CD3+ celler er minimalt ved MACS. Dette ut fra den lave prosentandelen CD3+ celler i den negativt selekterte fraksjonen (0.02 %). Den ønskelige eliminasjonen av debris er betydelig slik det fremgår av figur 13.

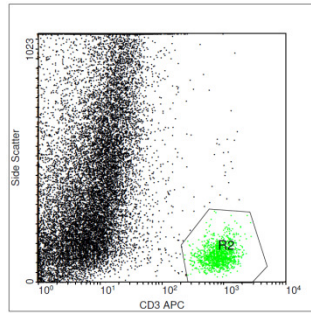
11.4. Dead-Cert



Figur 14 - Grafisk fremstilling av plotdata fra usortert celleduspensjon (RAW) før DeadCert.

Region	Events	%Total	%Gated
R0	40692	81.38	100.00
R2	1215	2.43	2.99

Tabell 6 - Plotdata fra usortert celleduspensjon (RAW).



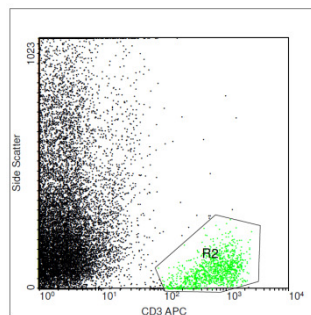
Figur 15 - Grafisk fremstilling av plotdata av suspensjon etter DeadCert.

Region	Events	%Total	%Gated
R0	35753	71.51	100.00
R2	2554	5.11	7.14

Tabell 7 - Plotdata etter magnetisk sortering med DeadCert.

Av figur 14 og tilhørende tabell ser vi at usortert suspensjon (RAW) inneholder 2.99 % CD3+ celler samt mye debris. Det utføres sortering med DeadCert, og ut fra figur 15 og tilhørende tabell ser en at andelen CD3+ øker med en faktor på 2.39, grunnet eliminasjon av debris.

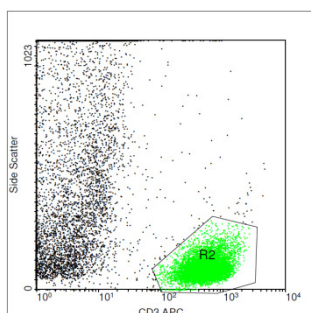
11.5. GentleMACS kombinert med DeadCert etter MACS



Figur 16 - Grafisk fremstilling av plotdata fra usortert cellesuspensjon (RAW).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	36677	73.35	100.00
R2	2492	4.98	6.79

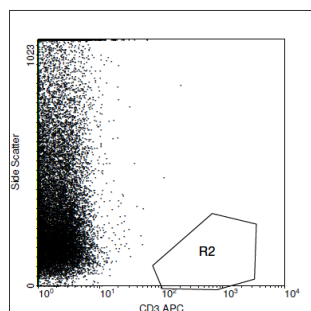
Tabell 8 - Plotdata fra usortert cellesuspensjon (RAW).



Figur 17 - Grafisk fremstilling av plotdata av positivt selektert suspensjon (TARGET), kombinert med gentleMACS og DeadCert.

Region	Events	%Total	%Gated
R0	26758	53.52	100.00
R2	15570	31.14	58.19

Tabell 9 - Plotdata av positivt selektert suspensjon (TARGET), kombinert med gentleMACS og DeadCert.



Figur 18 - Grafisk fremstilling av plotdata av negativt selektert suspensjon (WASTE).

Region	Events	%Total	%Gated
R0	48384	96.77	100.00
R2	0	0	0

Tabell 10 - Plotdata fra negativt selektert suspensjon (WASTE).

Av figur 16 og 17 med tilhørende tabeller ser vi at andelen CD3+ celler øker med en faktor på 8.57, grunnet stor eliminasjon av debris. Figur 18 med tabell viser at tapet av CD3+ celler fortsatt er minimal ved MACS selv etter innføring av gentleMACS og Dead-Cert.

12. Generell diskusjon

I denne oppgaven har vi altså beskrevet utviklingen av protokoll for sortering av enkeltceller fra biopsier av colonslimhinne. Denne prosedyren er utviklet over en toårsperiode i samarbeid med dr. med. Rasmus Goll ved Laboratorium for Gastroeneterologi og Ernæring ved UiT. Ved lignende studier har det blant annet vært vanlig å anvende flow cytometri for isolasjon av enkeltceller. Svakheten ved slik sortering er imidlertid et stort tap av ønskede celler, avhengig av prioriteringen ved sorteringsprosedyren. Andre problemer i forhold til flow-basert celledisortering er høy brukerterskel og stort tidsforbruk. Ved MACS er tapet av ønskede celler betydelig mindre på bekostning av økte mengder debris. Det finnes i dag ingen etablerte prosedyrer for tilstrekkelig ren isolasjon av enkeltceller fra tarmslimhinne ved bruk av MACS.

Under protokollutviklingen har man kontinuerlig evaluert og forsøkt å forbedre ulike trinn i protokollen for å oppnå tilfredsstillende resultater.

Som det innledende mål i prosedyreutviklingen ønsket man å oppnå et tilfredsstillende antall viable celler etter oppløsning av slimhinnebiopsiene. Etter tidlige preliminaire forsøk fant man ut at grovere og et større antall biopsier samt enzymatisk nedbrytning med Hyaluronidase, DNase og Kollagenase var nødvendig for å øke antallet og andelen

viable celler. I tillegg økte man inkubasjonstiden fra 1.25 timer til 16 – 20 timer. Vi benyttet seks grove biopsier med enzymatisk nedbrytning, dette sammen med den økte inkubasjonstiden, økte antallet celler fra 0.8 – 1.0 millioner til 1.0 – 2.0 millioner celler. Andelen viable celler økte fra 30 % til > 80 %.

Den økte inkubasjonstiden skapte imidlertid problemer med bakteriell overvekst i flere påfølgende forsøk. Man forsøkte å løse dette ved å spesifisere at biopsitang ikke skulle komme i kontakt med cellemediet, dette for å unngå unødvendig kontaminasjon, uten at dette resulterte i forbedring. Dette i tillegg til selve begrensningen med den lange inkubasjonstiden vedrørende tidsbruk, valgte en å erstatte dette trinn med gentleMACS.

På dette stadiet i utviklingen viste gjentatte forsøk med MACS og kontroll med flow cytometri, at den videre utfordringen var eliminering av betydelige mengder debris fra targetfraksjonen. Man introduserte derfor presortering og Dead-Cert. Slik det fremgår av resultatet ser vi at mengden debris reduseres betydelig. Presortering har derimot et ikke ubetydelig tap av CD3+ celler.

GentleMACS i kombinasjon med Dead-Cert og MACS viste i påfølgende forsøk at CD3+ celler økte med en faktor på 8.57. Men fortsatt utgjør debris 2/3 av cellene i targetfraksjonen.

Når man driver med isolerte celler vil det første man støter på være spørsmål om representativitet. Cellene gjennomgår en lang rekke trinn, og man mister materiale hver gang. Det kan være fysisk/mekanisk belastning, pH belastning, temperatur, metabolsk stress, ulik tendens til adheranse på de rør som brukes etc. Hver gang en mister celler risikerer man at celletapet er selektivt, og at man står igjen med et ikke-representativt utvalg. En komplisert prosedyre med mange trinn, som denne, øker risikoen for slikt.

Angående hvor mange T-celler en mister i gentleMACS prosedyren, er det vanskelig å si noe om. Dette er et av hovedproblemene med denne type metode. En måte å undersøke det på kunne være å ekstrahere mRNA fra cellerestene som sitter igjen i nylonfilteret. Dersom man kjører en PCR for CD3 mRNA, og sammenligner med liknende ekstrakt fra en hel biopsi vil man få en viss ide om hvor mange av T- cellene som tapes.

Det er selvfølgelig også et problem at metoden ikke er mer effektiv til sortering slik den er nå. En ønsker gjerne en renhetsgrad rundt 80 – 90 %. Videre har man tenkt å forsøke

Fc- blokkering for å øke eliminasjonen. De cellene som utgjør debris i targetfraksjonen, har scatteregenskaper som tilsier at det kan være monocytter, nøytrofile granulocytter eller andre fagocytter som er kjent for å ha Fc- reseptorer. Dermed er det stor sannsynlighet for at denne blokkeringen vil kunne ha god effekt.

Vi mener fortsatt at fordelene oppveier disse problemer. Spesielt muligheten for å måle T- cellerespons på spesifikke antigener og/eller stimulasjon med ulike mediatorer gir muligheter for hypotesetesting som vi ikke har hatt før. Vi flytter oss dermed fra et deskriptivt konsept til et eksperimentelt konsept.

13. Konklusjon

Våre forsøk har vist at kombinasjonen av gentleMACS og Dead Cert sammen med MACS viser lovende resultater vedrørende eliminering av debris, samtidig som positiv seleksjon av ønskede celler affiseres minimalt. Videre ønsker man fortsatt ytterligere forbedring av nåværende protokoll vedrørende eliminering av debris. Det forventes at denne forbedringen oppnås ved bruk av Fc- blokkering.

14. Referanseliste

1. Kumar, V. and S.L. Robbins, *Robbins basic pathology*. 2007, Philadelphia: Saunders Elsevier. XIV, 946 s.
2. Burakoff, R., *Indeterminate colitis: clinical spectrum of disease*. J Clin Gastroenterol, 2004. **38**(5 Suppl 1): p. S41-3.
3. Kildebo, S., et al., *The incidence of ulcerative colitis in Northern Norway from 1983 to 1986. The Northern Norwegian Gastroenterology Society*. Scand J Gastroenterol, 1990. **25**(9): p. 890-6.
4. Day, D.W., B.C. Morson, and I.M.P. Dawson, *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology*. 2003, Malden: Blackwell. XII, 692 s.
5. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
6. Gismera, C.S. and B.S. Aladren, *Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing?* World J Gastroenterol, 2008. **14**(36): p. 5491-8.
7. Galenus, A., *De Sedis Musculis, as quoted by Levy E. Anorectal Musculature*. Am J Surg, 1939. **32**: p. 141-198.
8. Vesalius, A., *De humani corporis fabrica*. 1968, Budapest: Helikon. 111 s.
9. Holck, P. *Store norske leksikon, snl.no - Tykktarm*. 2011; Available from: http://www.snl.no/sml_artikkel/tykktarm.
10. Mescher, A.L. and L.C. Junqueira, *Junqueira's basic histology: text & atlas*, [New York]: Appleton & Lange/McGraw-Hill.
11. Corman, M.L., *Colon and rectal surgery*. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xvii, 1743 s.
12. Valeur, J. and A. Berstad, *Hvorfor har vi tykktarm*. Tidsskrift for Den norske legeförening, 2008. **11**(128): p. 1298-300.
13. Huda-Faujan, N., et al., *The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects*. Open Biochem J. **4**: p. 53-8.
14. Velazquez, O.C., H.M. Lederer, and J.L. Rombeau, *Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia*. Dig Dis Sci, 1996. **41**(4): p. 727-39.
15. Zhu, Y., et al., *Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis*. Cancer Lett. **309**(2): p. 119-27.
16. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
17. Orchard, T., *Inflammatory bowel disease: an atlas of investigation and management*. 2011, Oxford: Clinical Publ. IX, 110 s.
18. Engstrom, G., *Diagnosis and Management of Bowel Diseases*. 2007, Professional Communications Inc.: New York.
19. Davidson, S. and N.A. Boon, *Davidson's principles & practice of medicine*. 2006, Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. xvi, 1381 s.
20. Loftus, E.V., Jr., et al., *Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival*. Gastroenterology, 1998. **114**(6): p. 1161-8.
21. Loftus, E.V., Jr., et al., *Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival*. Gut, 2000. **46**(3): p. 336-43.
22. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. Gut, 1996. **39**(5): p. 690-7.

23. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(2): p. 84-8.
24. Bernstein, C.N. and J.F. Blanchard, *The epidemiology of Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1503-4.
25. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature. **474**(7351): p. 307-17.
26. Jewell, D.P., *Challenges in inflammatory bowel disease*. 2006, Malden: Blackwell. XII, 400 s.
27. Ishihara, S., et al., *Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics*. J Gastroenterol, 2009. **44**(11): p. 1097-108.
28. Russell, R.K. and J. Satsangi, *IBD: a family affair*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(3): p. 525-39.
29. Yang, H., et al., *Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews*. Gut, 1993. **34**(4): p. 517-24.
30. Orholm, M., et al., *Investigation of inheritance of chronic inflammatory bowel diseases by complex segregation analysis*. BMJ, 1993. **306**(6869): p. 20-4.
31. Wang, K., et al., *Comparative genetic analysis of inflammatory bowel disease and type 1 diabetes implicates multiple loci with opposite effects*. Hum Mol Genet. **19**(10): p. 2059-67.
32. Janse, M., et al., *Three ulcerative colitis susceptibility loci are associated with primary sclerosing cholangitis and indicate a role for IL2, REL, and CARD9*. Hepatology. **53**(6): p. 1977-85.
33. Mikhailov, T.A. and S.E. Furner, *Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(3): p. 270-9.
34. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors*. Autoimmun Rev, 2004. **3**(5): p. 394-400.
35. Zheng, J.J., et al., *Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research*. Chin J Dig Dis, 2005. **6**(4): p. 175-81.
36. Desai, H.G. and P.A. Gupte, *Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation?* Indian J Gastroenterol, 2005. **24**(1): p. 23-4.
37. Bernstein, C.N. and F. Shanahan, *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases*. Gut, 2008. **57**(9): p. 1185-91.
38. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
39. Lashner, B.A. and E.V. Loftus, Jr., *True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(5): p. 1003-4.
40. Amre, D.K., et al., *Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(5): p. 1005-11.
41. Bernstein, C.N., et al., *A population-based case control study of potential risk factors for IBD*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(5): p. 993-1002.
42. Feeney, M.A., et al., *A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(5): p. 529-34.
43. Luther, J., et al., *Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature*. Inflamm Bowel Dis. **16**(6): p. 1077-84.

44. Baron, S., et al., *Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study*. Gut, 2005. **54**(3): p. 357-63.
45. Hampe, J., et al., *Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(5): p. 413-7.
46. Montgomery, S.M., et al., *Siblings and the risk of inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(11): p. 1301-8.
47. Powell, J.J., et al., *Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease*. J Autoimmun, 2000. **14**(1): p. 99-105.
48. Green, C., et al., *A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues*. Am J Epidemiol, 2006. **164**(7): p. 615-23; discussion 624-8.
49. Bernstein, C.N., et al., *Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study*. Am J Epidemiol, 1999. **149**(10): p. 916-24.
50. Malekzadeh, F., et al., *Crohn's disease and early exposure to domestic refrigeration*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4288.
51. Declercq, C., et al., *Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **16**(5): p. 807-12.
52. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54.
53. Cornish, J.A., et al., *The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(9): p. 2394-400.
54. Riordan, A.M., C.H. Ruxton, and J.O. Hunter, *A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars*. Eur J Clin Nutr, 1998. **52**(4): p. 229-38.
55. Wild, G.E., et al., *Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 1-7.
56. Klement, E., et al., *Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(5): p. 1342-52.
57. Hildebrand, H., et al., *Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(8): p. 961-6.
58. Card, T., et al., *Antibiotic use and the development of Crohn's disease*. Gut, 2004. **53**(2): p. 246-50.
59. Felder, J.B., et al., *Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(8): p. 1949-54.
60. Cipolla, G., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives*. Pharmacol Res, 2002. **46**(1): p. 1-6.
61. Zahid, A., *The vermiform appendix: not a useless organ*. J Coll Physicians Surg Pak, 2004. **14**(4): p. 256-8.
62. Koutroubakis, I.E., I.G. Vlachonikolis, and E.A. Kouroumalis, *Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(4): p. 277-86.
63. Hallas, J., D. Gaist, and H.T. Sorensen, *Does appendectomy reduce the risk of ulcerative colitis?* Epidemiology, 2004. **15**(2): p. 173-8.
64. Mombaerts, P., et al., *Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice*. Cell, 1993. **75**(2): p. 274-82.

65. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 707-15.
66. Mizoguchi, E., A. Mizoguchi, and A.K. Bhan, *Role of cytokines in the early stages of chronic colitis in TCR alpha-mutant mice*. Lab Invest, 1997. **76**(3): p. 385-97.
67. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
68. Molodecky, N.A. and G.G. Kaplan, *Environmental risk factors for inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y). **6**(5): p. 339-46.
69. Haga, Y., et al., *Absence of measles viral genomic sequence in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction*. Gut, 1996. **38**(2): p. 211-5.
70. Chadwick, N., et al., *Measles virus RNA is not detected in inflammatory bowel disease using hybrid capture and reverse transcription followed by the polymerase chain reaction*. J Med Virol, 1998. **55**(4): p. 305-11.
71. Koloski, N.A., L. Bret, and G. Radford-Smith, *Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 165-73.
72. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 825-32.
73. Gradel, K.O., et al., *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 495-501.
74. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 412-21.
75. Peeters, H., et al., *CARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 in Crohn's disease*. Int J Immunogenet, 2007. **34**(3): p. 181-91.
76. Lapaquette, P., et al., *Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly*. Cell Microbiol. **12**(1): p. 99-113.
77. Hugot, J.P., et al., *Crohn's disease: the cold chain hypothesis*. Lancet, 2003. **362**(9400): p. 2012-5.
78. Mawdsley, J.E. and D.S. Rampton, *Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications*. Gut, 2005. **54**(10): p. 1481-91.
79. Lerebours, E., et al., *Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(1): p. 122-31.
80. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
81. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
82. Sears, C.L., *A dynamic partnership: celebrating our gut flora*. Anaerobe, 2005. **11**(5): p. 247-51.
83. Simon, G.L. and S.L. Gorbach, *Intestinal flora in health and disease*. Gastroenterology, 1984. **86**(1): p. 174-93.
84. Greenberg, G.R., *Antibiotics should be used as first-line therapy for Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(3): p. 318-20.

85. Shen, J., et al., *Meta-analysis: the effect and adverse events of Lactobacilli versus placebo in maintenance therapy for Crohn disease*. Intern Med J, 2009. **39**(2): p. 103-9.
86. Yoon, S.S. and J. Sun, *Probiotics, nuclear receptor signaling, and anti-inflammatory pathways*. Gastroenterol Res Pract. **2011**: p. 971938.
87. McCracken, V.J. and R.G. Lorenz, *The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota*. Cell Microbiol, 2001. **3**(1): p. 1-11.
88. Mukhopadhyay, S., et al., *The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors*. Immunology, 2004. **112**(4): p. 521-30.
89. Chtarbanova, S. and J.L. Imler, *Microbial sensing by toll receptors: a historical perspective*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **31**(8): p. 1734-8.
90. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
91. Kobayashi, K., et al., *RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 194-9.
92. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
93. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, *Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
94. Abraham, C. and R. Medzhitov, *Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1729-37.
95. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
96. O'Connor, R.A., L.S. Taams, and S.M. Anderton, *Translational mini-review series on Th17 cells: CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell-mediated regulation*. Clin Exp Immunol. **159**(2): p. 137-47.
97. Rang, H.P. and M.M. Dale, *Rang and Dale's pharmacology*, Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. XXII, 777 s.
98. Carter, M.J., A.J. Lobo, and S.P. Travis, *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults*. Gut, 2004. **53 Suppl 5**: p. V1-16.
99. Ford, A.C., et al., *Efficacy of 5-aminosalicylates in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol. **106**(4): p. 617-29.
100. Franchimont, D., et al., *Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art. NIH clinical staff conference*. Neuroimmunomodulation, 2002. **10**(5): p. 247-60.
101. Lennard-Jones, J.E., et al., *An assessment of prednisone, salazopyrin, and topical hydrocortisone hemisuccinate used as out-patient treatment for ulcerative colitis*. Gut, 1960. **1**: p. 217-22.
102. Truelove, S.C., G. Watkinson, and G. Draper, *Comparison of corticosteroid and sulphasalazine therapy in ulcerative colitis*. Br Med J, 1962. **2**(5321): p. 1708-11.
103. Summers, R.W., et al., *National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment*. Gastroenterology, 1979. **77**(4 Pt 2): p. 847-69.
104. Malchow, H., et al., *European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment*. Gastroenterology, 1984. **86**(2): p. 249-66.
105. *Felleskatalogen over farmasøytiske spesialpreparater registrert i Norge*. 2011: Felleskatalogen. flere sider.

106. Feagan, B.G., *Cyclosporine has no proven role as a therapy for Crohn's disease*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 1995. **1**(4): p. 335-339.
107. Martinsen, T.C., et al., *[Use of TNFalpha antibodies in treatment of inflammatory bowel disease]*. *Tidsskr Nor Laegeforen*. **130**(3): p. 273-7.
108. *Nasjonale faglige retningslinjer for bruk av TNF- α hemmere og andre biologiske betennelsesdempende legemidler innen revmatologi, gastroenterologi og dermatologi. IS-1478*. 2010, Oslo: Helsedirektoratet.
109. Chung, E.S., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial*. *Circulation*, 2003. **107**(25): p. 3133-40.
110. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(15): p. 1098-104.
111. Shale, M.J., et al., *Review article: chronic viral infection in the anti-tumour necrosis factor therapy era in inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*. **31**(1): p. 20-34.
112. Bongartz, T., et al., *Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials*. *JAMA*, 2006. **295**(19): p. 2275-85.
113. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(6): p. 644-53.
114. Hanauer, S.B., et al., *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial*. *Lancet*, 2002. **359**(9317): p. 1541-9.
115. Rutgeerts, P., et al., *Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(23): p. 2462-76.
116. Hanauer, S.B., et al., *Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(2): p. 323-33; quiz 591.
117. Colombel, J.F., et al., *Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(1): p. 52-65.
118. Targan, S.R., et al., *A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(15): p. 1029-35.
119. Lichtenstein, G.R., et al., *Remission in patients with Crohn's disease is associated with improvement in employment and quality of life and a decrease in hospitalizations and surgeries*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(1): p. 91-6.
120. Sandborn, W.J., et al., *Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2007. **146**(12): p. 829-38.
121. Probert, C.S., et al., *Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial*. *Gut*, 2003. **52**(7): p. 998-1002.
122. Jakobovits, S.L., D.P. Jewell, and S.P. Travis, *Infliximab for the treatment of ulcerative colitis: outcomes in Oxford from 2000 to 2006*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007. **25**(9): p. 1055-60.

123. Mackey, A.C., et al., *Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **44**(2): p. 265-7.
124. FDA. *Safety Review update on reports of Hepatosplenic T-Cell Lymphoma in adolescents and young adults receiving tumor necrosis factor (TNF) blockers, azathioprine and/or mercaptopurine*. 2011; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm250913.htm>.
125. Olsen, T., et al., *Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(11): p. 1312-20.
126. Olsen, T., et al., *Infliximab therapy decreases the levels of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA in colonic mucosa of ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(6): p. 727-35.
127. Olsen, T., et al., *TNF-alpha gene expression in colorectal mucosa as a predictor of remission after induction therapy with infliximab in ulcerative colitis*. Cytokine, 2009. **46**(2): p. 222-7.
128. Invitrogen. *Introduction to Flow Cytometry*. 2011; Available from: http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html
129. Macey, M.G., *Flow Cytometry: Principles and Applications*. 2007, Totowa, NJ: Humana Press Inc.
130. Fulwyler, M.J., *Electronic separation of biological cells by volume*. Science, 1965. **150**(698): p. 910-1.
131. Biotec, M. *MACS Technology Gold standard in cell separation*. 2011; Available from: http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_21_MACS_Cell_Separation.aspx.
132. Patel, D., *Separating cells*. 2001, Oxford: BIOS. vii, 168s.
133. *Dead-cell Removal Technology*. 2011; Available from: <http://www.immunosolv.com/technology/dead-cell-removal>.
134. *gentleMACS™ Dissociator*. 2011; Available from: http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_1126_763_gentleMACS_Dissociator.aspx.
135. Minamoto, Y., et al., *Development of a serum-free and heat-sterilizable medium and continuous high-density cell culture*. Cytotechnology, 1991. **5 Suppl 2**: p. S35-51.
136. Wright, A.K. and M.R. Thompson, *Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence*. Biophys J, 1975. **15**(2 Pt 1): p. 137-41.
137. Auld, D.S., *Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases*. Methods Enzymol, 1995. **248**: p. 228-42.
138. Dulbecco, R. and M. Vogt, *Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses*. J Exp Med, 1954. **99**(2): p. 167-82.
139. Latt, S.A., *Fluorescent probes of chromosome structure and replication*. Can J Genet Cytol, 1977. **19**(4): p. 603-23.
140. Janeway, C.A., et al., *Janeway's immunobiology*. 2008, New York: Garland Science. XXI, 887 s.