

Finska Läkaresällskapet

Handlingar

Årgång 169 Nr 2, 2009

Tema: Medicinska Forskningsinstitutet Minerva

Specialredaktör: Dan Lindholm

Huvudredaktör Johan Lundin:

Pionjärer i global hälsa..... 2

Specialredaktör Dan Lindholm:

Idé och ork i forskningen 4

Albert de la Chapelle:

Håller något stort på att ske inom prediktiv medicin? 6

Kai Simons:

Nanoflottar i cellmembraner: en ny organisationsprincip..... 13

Benoit Dugué:

Vad var och en bör veta om preanalytiska faktorer..... 17

Frej Fyhrquist och Outi Saijonmaa:

Renin-angiotensinsystemet – en uppdatering..... 23

Ilkka Tikkanen, Päivi Lakkisto, Heli Segersvärd, Juha-Matti Siren,

Hanna Forsten, Eeva Palojoki och Mika Laine:

Hjärtats stamceller och regeneration vid hjärtskada 30

Nina Bergelin och Kid Törnquist:

Sfingosinfosfat och cellsignalering..... 36

Anna Kotronen, Robert Bergholm och Hannele Yki-Järvinen:

Fettlever vid metaboliskt syndrom och typ 2 diabetes 42

Ras Trokovic och Dan Lindholm:

Inducerade pluripotenta stamceller

– nya löften och möjligheter för forskning och terapi 50

Paulina Skrobuk, Stephanie von Kræmer,

Johannes Kärkkäinen och Heikki A. Koistinen:

Reglering av glukosmetabolism i skelettmuskel hos människan.. 56

Jakob Stenman:

Riktad analys av genuttryck med genomkontrollerad RT-PCR... 63

Ralph Gräsbeck:

Minerva 50 år..... 68

Tom Ahlfors: Intervju med Jim Schröder 71

In memoriam:

Lennart von Wendt, Johan Ahlqvist och Ulpu Saarialho-Kere ... 73

Helge Roos:

En fältskärs berättelse 75



Redaktion

Huvudredaktör

Johan Lundin
Institutet för molekylärmedicin
i Finland – FIMM
Postadress: PB 20
00014 Helsingfors universitet
Besöksadress: Biomedicum 2U,
Stockholmsgatan 8,
00290 Helsingfors

E-post: johan.lundin@helsinki.fi

Redaktörer

Tom Scheinin, Patrik Schroeder,
Kristian Wahlbeck och Pia Österlund

Språkgranskare

Marianne Saanila
Tel. 02-458 80 46

Finska Läkaresällskapet

Kanslist

Gerd Haglund
PB 82, 00251 Helsingfors
Tel. 09-4776 8090, fax 09-4362 055
E-post: kansliet@fls.fi
Hemsida: www.fls.fi

Besöksadress

Johannesbergsvägen 8
00250 Helsingfors

Finska Läkaresällskapet Handlingar

ISSN 0015-2501

Utges av Finska Läkaresällskapet
Oy Nord Print Ab, Helsingfors 2009

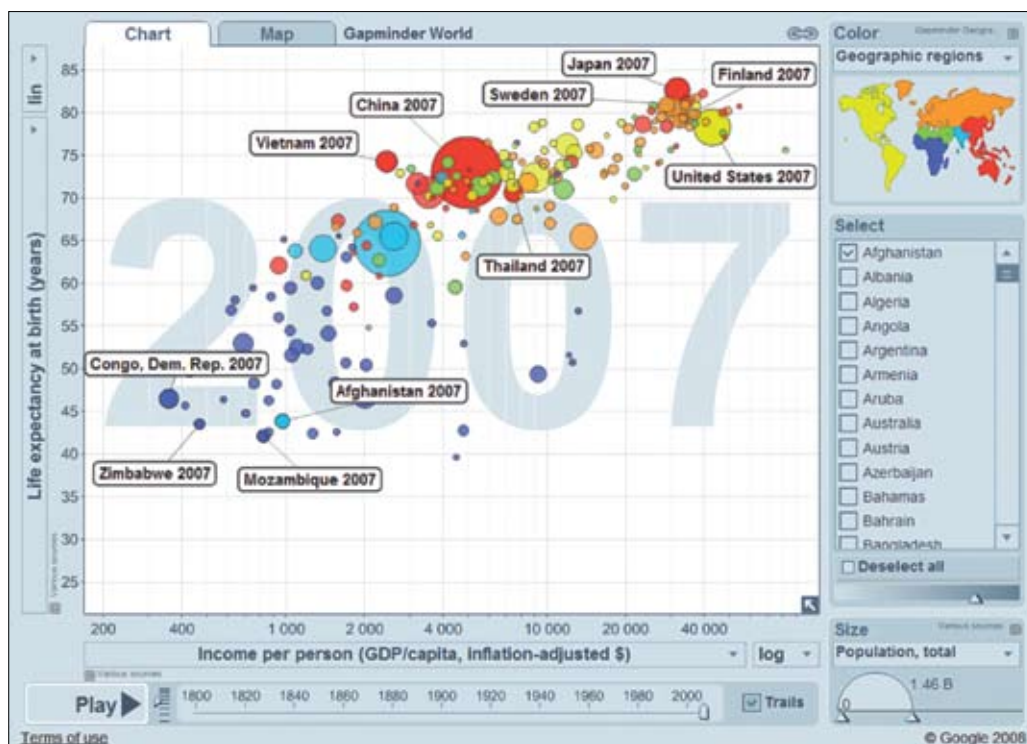
Pionjärer i global hälsa

Världen är sig inte lik. En simpel indelning i industriländer och utvecklingsländer – rika och fattiga – är inte gångbar längre. Enorma förändringar i global ekonomi och hälsa under de senaste decennierna kräver nya begrepp och förhållnings-sätt.

För femtio år sedan bildade världens länder två rätt tydliga kluster – ett med högt BNP och hög medellivslängd och ett med lågt BNP och låg medellivslängd. I dag förekommer ett betydligt jämnare spektrum med ett stort antal länder i transition mot allt bättre hälsa och längre liv. Det är speciellt fascinerande att flera länder, t.ex. Kina, Vietnam och Thailand på kort tid uppnått en livslängd som närmar sig västvärldens, men med betydligt mindre ekonomiska resurser (Figur 1).

En av hemligheterna bakom den positiva utvecklingen är ett allt friare flöde av information och kunskaper. Avancerande utvecklingsländer med gynnsam ekonomisk utveckling (eng. emerging economies) har genomfört effektiva vaccinationer, förbättrat hygien och hälsoundervisningen, dvs de grundläggande åtgärder som tidigare visat sig vara så effektiva i våra länder. Globalt sett har antalet barn som dör före fem års ålder halverats sedan 1960, från 20 miljoner årligen till 9 miljoner (1).

Humanitära hjälpsatser, biståndarbete och ekonomiskt stöd har starkt bidragit till den positiva utvecklingen. En stor del av det gap som uppstod mellan utvecklings- och industriländer mellan 1870 och 1950 har överbrygats. Men trots



Figur 1. Medellivslängd i förhållande till BNP år 2007. För närmare uppgifter se Hans Roslings informationsverktyg Gapminder (www.gapminder.org).

att levnadsstandarden ökar med en oförutspådd hastighet för närmare fem miljarder människor, lever fortfarande närmare en miljard människor i extrem fattigdom. Den fattigaste miljarden ("the bottom billion"), återfinns främst i länder i Afrika och Centralasien, där folk pga. inbördeskrig, svagt styre och lika fattiga grannländer är oväntat resistenta mot bistånd och hjälp utifrån (2).

De avancerande utvecklingsländerna kan fortsättningsvis komma att dra nytta av våra erfarenheter. Vi kan redan nu förutsäga vad den ökande medellivslängden kommer att föra med sig då det gäller "nya" hälsoproblem och sjukdomar i de tidigare utvecklingsländerna. Depressioner, diabetes, cancer, obesitas, lungsjukdomar och kardiovaskulära sjukdomar förutspås öka från 40 procent av sjukdomsbördan år 2002 till närmare 75 procent år 2020 i tidigare u-länder.

Statistikexperten och professorn i global hälsa Hans Rosling vid Karolinska Institutet har lyft fram just detta; att vi vet en hel del om vad som följer då välståndet ökar till den nivå vi har uppnått. Däremot finns det ingen som vet vad som väntar oss själva i de ekonomiskt mest välbärgade länderna. Vi saknar i stort sett förebilder, vi vet inte vad som följer på en eventuell ytterligare

ekonomisk tillväxt. "Ingen har ännu varit där", för att citera Rosling. Kommer vi att kunna ta vara på olika möjligheter till bättre hälsa? Kan livslängden och speciellt det kvalitativt goda livet bli längre? Förmår vi åtgärda de hälsoproblem som är resultatet av högre levnadsstandard? Eller kommer hela världens hälsa bara att bli mer jämlik?

Johan Lundin

Referenser

1. World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2009, May 2009, http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS09_Full.pdf.
2. Collier P. The Bottom Billion: Why the Poorest Countries are Failing and What Can Be Done About It. Oxford University Press, 2007. Pp 224.

Idé och ork i forskningen

Medicinska Forskningsinstitutet Minerva firar sitt 50-årsjubileum i år. I detta nummer av Handlingarna presenteras ett antal artiklar med tonvikt på aktuell medicinsk forskning med anknytning till Minervas verksamhet. Artikelförfattarna är läkare, kolleger och forskare som är aktiva på Minerva i de olika forskargrupperna eller tidigare har varit det men som nu verkar på annat håll. De teman som tas upp spänner över ett brett fält av medicinsk forskning från genetiska frågeställningar och sjukdomsgener till kliniska studier av diabetes, blodtrycksreglering, samt forskning om cellmembraner och cellsignaler. Nya rön om stamcellsforskningen presenteras även liksom en ny metodik för analys av genuttryck i patientmaterial. Därutöver skriver professor Ralph Gräsbeck om hur det hela en gång begav sig, och ger en kort tillbakablick på forskningen på Minerva och dess utveckling under årens lopp till dags dato.

Som det framgår av artiklarna saknar forskningen som bedrivs och har bedrivits på Minerva varken bredd eller djup. Det grundläggande syftet med den är att studera medicinskt betydande sjukdomars uppkomstmekanismer och behandlingsmöjligheter genom att utnyttja såväl kliniska som prekliniska forskningsmetoder. Hur man i de enskilda fallen lyckats med detta är ofta svårt att säga med bestämdhet eftersom forskningen kräver en insats under längre tidsperioder. Ett sätt att mäta vetenskaplig aktivitet är dock att se på bibliometriska faktorer där Minerva trots sin litenhet står sig väl i konkurrensen även med större enheter. Den andra aspekten är att fråga sig vilken roll Minerva spelar som ett oberoende forskningsinstitut i den inhemska vetenskapliga miljön och för dess utveckling. Man kan på goda grunder hävda att Minerva sedan sin tillkomst fungerat som en inspirationskälla och hemvist för flera forskarintresserade läkare. Därutöver har Minerva en funktion som förvaltare av en genuin, finlandssvensk medicinsk forskningsmiljö, om än språket i och för sig inte är av betydelse för vetenskapen som sådan. Kännetecknande för verksamheten på Minerva är den unika konstellationen

av forskargrupper med möjlighet att bedriva fri men målinriktad forskning med ett minimum av byråkratisk reglering och belastning. Fördelarna med Minerva som forskningsmiljö går därför inte att underskatta i det allt kärvare läge som kännetecknar utvecklingen på universiteten i dag och på de kliniska institutionerna i synnerhet. Dessa olägenheter har att göra med en alltför knapp forskningsfinansiering, en tilltagande styrning samt ökade svårigheter med att rekrytera engagerade unga forskare och begåvade studenter till forskningen. Det sistnämnda har även känts av på Minerva, där det inte förekommer någon direkt undervisning av medicinare och andra studerande på grund av institutets fristående ställning i förhållande till universitetsvärlden. Man har således på Minerva försökt lösa detta problem på annat sätt bl.a. genom att skapa nya kontaktytor till studenterna så att Minervaforskare har deltagit i olika forskarskolor och i den övriga verksamheten på universiteten

Från officiellt håll har man nyligen med rätta påpekat att det finns en risk för att den akademiska och kliniska forskningen utarmas och att ett allt färre antal unga läkarestuderande kan eller vill börja forska (1, 2). Orsakerna till detta är komplexa, men en brist på forskarkompetens inom läkarkåren kan på sikt leda till en marginaliserad klinisk forskning med försämrad vård och behandling av patienter som följd (2, 3). För att underlätta läget har statsmakten och universiteten därför försökt satsa på bättre utbildning och nya undervisningsprogram med inrättandet av forskarskolor i olika ämnen. Rätt omhändertaget kan detta leda till en ökad forskaraktivitet och bidra till möjligheten att attrahera även de allra bästa förmågorna till forskningen. Som ett led i detta kan man även se upprättandet av forskningsinriktade magisterprogram bl.a. inom Helsingfors universitet. Sådana satsningar har utomlands visat sig vara utomordentligt lyckade, och utbildningen av forskarstuderande inom området biomedicin vid de medicinska fakulteterna i Sverige är ett bra exempel på detta. Det allra senaste tillskottet

inom medicinsk utbildning vid Helsingfors universitet är det internationella programmet inom translationell medicin i syfte att öka förståelsen för kliniska problem inom grundforskningen och med en direkt tillämpning av resultaten inom vården (4). Denna utvecklingslinje bådär gott för den kliniska forskningen vid universitetet. Minerva har av hävd understött just denna typ av forskning i gränsområdet mellan preklinisk och klinik och kan säkerligen delta i denna utveckling framöver.

Förutom den kliniska forskningen upplever även grundforskningen i Finland stora förändringar och nya utmaningar. I den senaste utvärderingen av forskningen i landet gjord av experter vid Finlands Akademi fäste man sig bl.a. vid att det totala antalet referenser till finländsk forskning sjunkit oroväckande på senare tid (5). Därutöver ingav den ökade splittringen av forskningsfinansieringen inom vissa områden bekymmer, liksom den starka slagsidan åt tillämpad forskning på grundforskningens bekostnad. Expertkommittén efterlyste därför kraftfulla åtgärder för att stimulera forskningen med bl.a. större satsning med förbättrade synergier, en ökad kritisk massa i projekten, flera internationella kontakter och nätverk, bättre ledarskap, samt mer medel för att upprätthålla en fungerande infrastruktur på universiteten och inom andra forskningsmiljöer (5). Detta innebär enligt Akademiens generaldirektör Markku Mattila ett arbete med *"utarbetandet av en ny nationell forskningsstrategi i Finland med vägledning fram till år 2016"* (5). Hur det blir med detta återstår dock att se med tanke på att det nuvarande prekära ekonomiska läget där forskningen liksom mycket annat väger lätt. Besluten om nysatsningar kommer även att kräva en politisk vilja och samstämmighet i syfte att förbättra de nuvarande premisserna för bl.a. grundforskningen. Trots allt är de verkliga nycklarna till framgång och nya idéer en långsiktig satsning på kvalitativ forskning, utöver ett representativt antal engagerade forskare med en välutvecklad kompetens och en god portion frihet parad med disciplin och kreativt tänkande. Vidare behövs en stimulerande forskningsmiljö och en god infrastruktur samt finansiella resurser och en möjlighet att lösa praktiska problem på ett smidigt och obyråkratiskt sätt. Minerva som ett privat forskningsinstitut som upprätthålls av Minervastiftelsen har alla förutsättningar att bidra till att vidareutveckla denna typ av skapande forskningsmiljöer.

I diskussioner med lekmän men även med kolleger kan man ibland ana en tudelad inställning

till forskningen. Dels ses möjligheten att bedriva forskning som ett privilegium förunnat endast ett fåtal, dels kan forskning upplevas som alltför svårt eller betungade. Förvisso är forskningens vardag ingen dans på rosor, inte heller kan genomförandet av ett projekt vara ett självändamål. Kraven på publikationsverksamhet och möjligheterna att hävda sig i den internationella konkurrensen har med tiden blivit allt hårdare. Den som vill åstadkomma en artikel med stort genomslag i de bästa tidskrifterna förutsätts behärska ett stort antal intrikata metoder och tekniker, eller en genomgång av större patientmaterial, vilket inte är möjligt för den enskilda forskaren. Därför är samarbete och nätverk både inom landet och utomlands nödvändiga för att man ska stå sig i konkurrensen. Därutöver har själva arbetsmängden per publicerat arbete tilltagit enormt under de senaste åren och detta kräver även sin tribut i form av tid och möda. Dessvärre kan den kliniskt aktiva läkaren/forskaren och den engagerade grundforskaren uppleva att den tillgängliga tiden ofta splittras upp av skäl som inte direkt har att göra med den vetenskapliga verksamheten. Dock är tidsbrist och energi bara den ena sidan av saken, den andra är den grundläggande idén vars tillkomst kräver både fantasi och fördjupning. Forskaren behöver därför således både idériakedom och uthållighet för att kunna fullfölja sina projekt. Orkidén kan med sin bedårande skönhet och livsvilja bäst symbolisera dessa behov av *ork och idé* som krävs för att bedriva god forskning (6).

Med 50 år av framgångsrik forskning i backspeglarna står Minerva väl rustat att möta de nya och spännande utmaningarna även i framtiden. Forskningen, som den beskrivs i detta nummer, kan på sikt ge ökad kunskap om grundläggande sjukdomsmekanismer och leda till en bättre medicinsk vård och behandling, en allt större grupp av patienter till fromma.

Dan Lindholm

Referenser

1. Pasternack A. Elvyttys! Akateeminen Lääketiede on pulassa. Duodecim 2005; 121: 1740–46.
2. Raivio K. Kliinisestä tutkijasta on tulossa uhanalainen laji. Duodecim 2009; 125, 5–6.
3. Finlands Akademi. Den kliniska forskarkarriären - en källa till utmaningar. Finlands Akademis publikationer 9/2009.
4. TRANSMED. The Master's Degree Programme in Translational Medicine at Medical Faculty 16 november 2009, se www.helsinki.fi/transmed
5. Finlands Akademi. Vetenskapens tillstånd och nivå i Finland. Lägesrapport den 11 november 2009.
6. Fyhrquist F. Ork-idé. Bevingade ord på Minerva 2008.

Håller något stort på att ske inom prediktiv medicin?

ALBERT DE LA CHAPELLE

Det medför uppenbara medicinska och preventiva fördelar om man kan förutsäga individers benägenhet att insjukna i en given sjukdom. Benägenheten bestäms av yttre faktorer (livsstil) och inre faktorer (gener). Tills nyligen har de gener som bidrar till de vanliga sjukdomarna (folksjukdomarna) varit i stort sett okända. Framsteg inom genforskningen har lett till att sjukdomsalstrande mutationer och polymorfier kan spåras med stor tillförlitlighet. Det visar sig att många sjukdomar uppstår som ett resultat av talrika samverkande genförändringar som var för sig har en svag effekt. Enbaspolymorfier Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) tjänar som markörer för de mestadels oidentifierade verkliga mutationerna. Man kan föreställa sig att personlig hälsovård i framtiden baserar sina prediktioner på individens SNP-uppsättning. I den rådande SNP-euforin torde det vara hälsosamt att understryka att SNP endast är markörer medan de underliggande mekanismerna är okända. Det är för tidigt att basera medicinska beslut på dessa SNP. Den nyligen upplågnade kommersiella exploateringen av enbaspolymorfier borde stoppas eller kontrolleras.

Arv eller miljö (*Nature versus nurture*)

Benägenheten att insjukna i sjukdomar bestäms av yttre faktorer (livsstil) och inre faktorer (gener). Den relativa andelen av dessa riskfaktorer varierar markant. Genernas betydelse är nära 100 procent hos många s.k. mendelskt ärftliga sjukdomar (längst till vänster på diagrammet) (Figur 1). Hit hör t.ex. de sjukdomar som utgör det mångomtalade "finländska sjukdomsarvet". I Minervasammanhang är det lämpligt att som exempel nämna selektiv malabsorption av vitamin B12 som orsakas av mutationer i en av tre gener (1), och som vi känner som Imerslund-Gräsbecks syndrom. För denna typ av sjukdomar gäller regeln att alla eller nästan alla som har genmutationen insjuknar, medan de som inte har genmutationen inte kan få sjukdomen. Mutationens penetrans ligger alltså nära 100 procent. Märk dock att penetransen kan vara betydligt lägre vid många mendelskt ärftliga sjukdomar, särskilt vid dem som nedärvs dominant. Bland personer som är bärare av mutationer för cancersjukdomen Lynchs syndrom (även kallad ärftlig icke-polypös kolorektal cancer, HNPCC) insjuknar "endast" ca två tredjedelar. Orsakerna bakom varierande penetrans är för det mesta outredda men består sannolikt

av en kombination av modifierande gener och yttre faktorer (t.ex. diet).

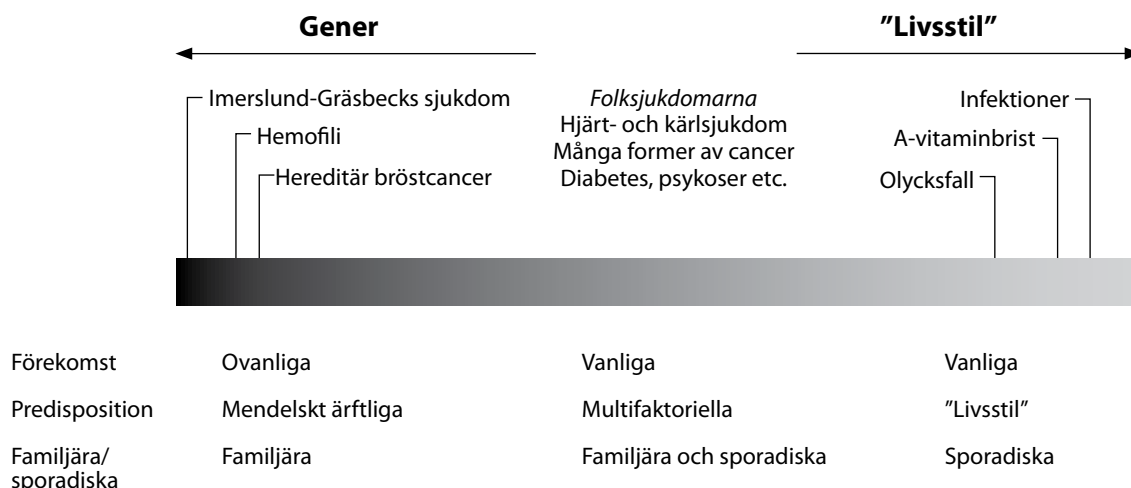
Längst till höger på diagrammet (Figur 1) har jag placerat infektioner. Olyckshändelser kunde också placeras långt till höger. Men de yttre faktorernas andel av benägenheten är inte 100 procent. Benägenheten att råka ut för olyckor är ju också en karaktärs- och temperamentsfråga där gener spelar en liten men klar roll. Benägenheten att insjukna i infektionssjukdomar är i många fall tydligt bunden till immunologiska och andra genetiskt betingade egenskaper.

Vi har nu begrundat de två ytterligheterna i diagrammet. Men det intressantaste finns i mitten: de vanliga sjukdomarna, folksjuk-

FÖRFATTAREN

MKD **Albert de la Chapelle** är specialist i invärtesmedicin och klinisk genetik. Professor i medicinsk genetik vid Helsingfors universitet 1974–1997 därjämte överläkare i klinisk genetik. Professor i cancergenetik vid The Ohio State University, USA från 1997 och grundare av dess cancergenetiska forskningsprogram.

Sjukdomsorsaker: ett spektrum från gener till "livsstil"



Figur 1.

Våra sjukdomar kan placeras på ett spektrum som anger andelen gener jämfört med yttre faktorer, "livsstil". Längst till vänster är genernas andel störst, längst till höger de yttre faktorernas. De flesta vanliga sjukdomar placerar sig i mitten (multifaktoriell uppkomst).

domarna. Vi tänker då genast på hjärt- och kärlsjukdomar, diabetes, många cancerformer, neurodegenerativa sjukdomar och psykoser. Typiskt för denna kategori är att benägenheten är uppenbart multifaktoriell med starka inslag av både genetiska och yttre faktorer. Det är ingen hemlighet att man inom den medicinska forskningen länge satsat stort på att utreda mekanismerna bakom dessa sjukdomar. Framsteg har noterats, men varje steg har varit oändligt kort, och man måste medge att framstegen har varit blygsamma i förhållande till insatserna. Tänk bara på komplexet obesitas, hypertension, diabetes, lipider och hjärt-kärlsjukdom. Något tillspetsat kan man säga att forskningen kring uppkomstmekanismerna har lett till tämligen blygsamma praktiska konsekvenser, medan bl.a. kärllkirurgi (t.ex. bypassoperationer) åstadkommit underverk. Vi ska heller inte glömma den allt viktigare roll rådgivning inom hälsovården och publicitet kring livsstilens andel i dessa sjukdomar kan spela.

Nya vindar

Vi kommer nu in på frågan om vi eventuellt står inför ett nytt skede där djupare insikter

kan väntas i accelererande takt. Jag tänker snarast på att genmutationer som bidrar till de multifaktoriella sjukdomarna har börjat upptäckas allt oftare. Detta ger hopp om att de kemiska och metabola signalkaskaderna kan identifieras närmare, vilket dramatiskt ökar chanserna att utveckla specifika läkemedel. Men även om framstegen just nu syns svindlande, är vägen lång och besvärlig, inte minst ifråga om framtagningen av mediciner. Innan vi kommer dit ska vi rekapitulera hittills använda metoder och strategier.

Metoder att bestämma generns andel i sjukdomar

För att karakterisera vilken andel gener (identifierade och oidentifierade) har vid uppkomsten av en sjukdom tillämpas främst fall-kontroll, s.k. *case control study*. Man identifierar en kohort patienter (probander; t.ex. $n = 500$) med sjukdomen, och identifierar probandernas släktingar (t.ex. av första graden: föräldrar, syskon och barn, t.ex. $n = 2\,000$). Med hjälp av register bestämmer man hur många av släktingarna som har samma sjukdom som probanderna (t.ex. $300/2\,000$). Därefter identifierar man en kohort individer som inte har

sjukdomen (kontrollprobander, t.ex. $n = 500$), identifierar deras motsvarande släktingar och bestämmer hur många av dem som har sjukdomen (t.ex. 100/2 000). Med dessa siffror på hand räknar man ut den så kallade familjära riskfaktorn (family risk ratio) som i exemplet blir 300/2 000 dividerat med 100/2 000, dvs. 3,0. Detta är ett mått på genernas andel i sjukdomen, dock med den viktiga reservationen att miljöfaktorer kan medverka till att höja värdet eftersom släktingar ofta påverkas av liknande yttre faktorer. – För de flesta vanliga sjukdomar ligger denna riskfaktor mellan 2 och 5.

För att eliminera effekten av yttre faktorer kan man gå in för *tvillingstudier*. Man identifierar monozygota och dizygota tvillingpar och undersöker hur ofta båda tvillingarna har fått samma sjukdom (konkordans). Ju högre konkordansen är hos monozygota par i jämförelse med dizygota par, dess större är genernas inflytande. Yttre faktorer roll är liten därför att tvillingar i allmänhet lever i samma miljö och har samma vanor. Med denna metodik beräknas den s.k. proportionen av varians som i procent uttrycker geners andel i sjukdomsmekanismerna. För många vanliga multifaktoriella sjukdomar ligger värdena mellan 20 och 60 procent.

Båda de beskrivna metoderna ger en allmän bild av genetikens andel, men säger ingenting om vilka och hur många gener det är fråga om.

För att identifiera gener som leder till sjukdomar har *kopplingsanalysen* (linkage analysis) under de senaste 50 åren varit den förhärskande metoden. Principen är enkel och bygger helt på förekomsten av afficerade familjer. De familjemedlemmar som har sjukdomen ska ha samma mutation, eller i varje fall ärva det DNA-segment där mutationen finns. Vid hög penetrans ska de familjemedlemmar som inte har sjukdomen inte alls eller endast i undantagsfall ha mutationen. Kopplingsanalys ledde under 1980- och 1990-talen till att den genetiska bakgrunden till ett stort antal ärftliga sjukdomar kunde klarläggas, inte minst exempelvis de s.k. finländska sjukdomarna, där den sista av ca 40 torde ha blivit klarlagd så sent som 2009. Kopplingsanalysen är fortfarande en viktig metod. Men den stora nackdelen är att den fungerar endast då en gen har hög penetrans. Om penetransen däremot är låg, påträffas av lättförståeliga skäl många individer med mutationen men utan sjukdomen, och analyserna blir omöjliga att tolka.

Det nyaste nya

Förest bör vi introducera ett par allmänna begrepp. *Alleler* är alternativa former av en given DNA-sekvens. För det allra mesta är våra två alleler (en från far, en från mor) identiska. Men om de är olika, t.ex. nukleotiden A från den ena och nukleotiden G från den andra föräldern, har vi två olika alleler, i detta fall en A-allel och en G-allel. Flertalet sjukdomsframkallande mutationer är just en enda förändrad nukleotid i någon gen. Men vårt genom består endast till < 5 procent av gener; resten har för det mesta ingen klar funktion. Till och med inom de kända generna är stora delar av DNA-sekvensen icke-kodande intro-ner. Variationer i dessa sekvenser saknar ofta biologisk effekt och kallas då *polymorfier*. Den vanligaste formen av polymorfier är just en enda förändrad nukleotid, på engelska Single Nucleotide Polymorphism eller SNP (ofta uttalat snip). Med en lindrig överdrift kan man säga att den medicinska forskningens modeord framför andra idag är SNP, varom mera i det följande.

Associationsstudier av *alleler* i stor skala är det nya men själva principen är inte ny. Om man identifierat en kandidatmutation, t.ex. en SNP och om man har anledning att tro att precis samma SNP/mutation nedärvt under många generationer (vilket är typiskt) och den bidrar till en viss sjukdom, bör den ena allelen vara vanligare hos patienter ("fall") än hos friska ("kontrollpersoner"), och för att bevisa detta behövs inga familjer som vid kopplingsanalys. Så om man har en SNP (t.ex. A/G) vars eventuella sjukdomsframkallande effekt man vill undersöka, jämför man helt enkelt allelerna hos fallen och kontrollpersonerna. En typisk associationsstudie kunde ge resultatet att A-allelen förekommer hos 40 procent av fallen och hos 30 procent av kontrollpersonerna. På detta kalkyleras en oddskvot (odds ratio, OR) som ett mått på riskens "styrka". Tillförlitligheten uttryckt som t.ex. 95 procent konfidensintervall är starkt beroende av det studerade antalet fall och kontrollpersoner. Om resultatet vore 40/100 bland fallen och 30/100 bland kontrollpersonerna vore $OR = 1,55$, konfidensintervallet 0,83; 2,9 och p-värdet 0,18. Med tiofalt fler fall och kontrollpersoner blir oddskvotens samma, men konfidensintervallet blir 1,29; 1,88 och p blir $3,37 \times 10^{-6}$.

Vad som ovan beskrivits gäller alltså undersökning av en SNP hos ett antal fall och kontrollpersoner. Man undersöker alltså en

kandidatmutation där det på olika grunder finns anledning att tro att den är sjukdomsframkallande. Det är emellertid viktigt att observera att det även om association föreligger, är långt ifrån säkert att den undersökta SNP-förändringen är "skyldig" till sjukdomsbenägenheten. Själva mutationen kan vara en annan SNP eller annan sekvensvariant som befinner sig i närheten av den undersökta SNP. Mutationen nedärvs då för det mesta tillsammans med den undersökta SNP tack vare fenomenet kopplingsobalans (linkage disequilibrium) Den undersökta SNP fungerar som "markör" och själva mutationen kan ibland hittas relativt lätt.

Associationsanalys som omfattar hela genomet

Den eufori som just nu råder i fråga om allel-associationer är baserad på en utveckling som redan ägt rum på många håll. Det stora genomprojektet fullbordades på sätt och vis år 2002 då nästan hela genomet hade blivit sekvenserat. Undersökningar av individer från olika mänskliga populationer har fortsatt under namnet HapMap. Redan nu har detta lett till att hela 3 miljoner SNP blivit identifierade. Då vårt genom omfattar ca 3 miljarder nukleotider betyder detta att man redan har funnit en SNP per 1 000 nukleotider. Dessa SNP gör det möjligt att utföra allelassociationsstudier som täcker hela genomet. Man letar alltså "anonymt" igenom hela genomet för att hitta en eller flera SNP som associeras med den undersökta sjukdomen. Den teknik som gör detta möjligt har tills helt nyligen varit baserad på mikrochip, och den akronym som mången läsare redan sett och kanske undrat över är GWAS vilket står för *Genome Wide Association Study*. Gör man en studie med 1 miljon SNP och tusentals fall och kontrollpersoner, har man en god chans att något fastnar i håven. I själva verket fastnar det alltid något i håven, frågan är bara vad som är viktigt och vad som möjligen är tillfälligheter utan betydelse. Litteraturen om GWAS efter bara ett par tre år är redan ganska omfattande. Jag använder nedan koloncancer som exempel på vad slags fynd man gjort. Det nedanstående är baserat främst på tre GWAS beskrivna i tidskriften *Nature Genetics* augustinummer 2007 (2–4) och några uppföljande artiklar (sammansfattade i ref. 5).

Tomlinson et al. (2) samlade in 930 fall av koloncancer med viss anrikning av familjärt

uppträdande fall. Studien omfattade två faser. I den första studerades ca 550 000 SNP hos de 930 fallen och hos 960 kontrollpersoner. Här upptäcktes många (antalet inte publicerat) SNP som uppvisade association med ett p-värde $<0,0000001$, ett allmänt utnyttjat gränsvärde för signifikans i dessa studier. I den andra fasen bekräftades dessa utpekade SNP i tre nya serier av fall ($n = 4\ 361$, $1\ 901$ och $1\ 072$) och kontrollpersoner ($n = 3\ 752$, $1\ 079$ och 415). Resultatet var att en SNP (kallad rs6983267) visade ytterst övertygande association ($p = 1,27 \times 10^{-14}$). Observera ytterligare några fakta:

*Oddskvoten (OR) var endast 1,21 (95 procent konfidensintervall 1,15;1,27)

* Den allel som var vanligare hos fallen än hos kontrollpersonerna ("riskallelen", i detta fall G vid en G/T polymorfi) är ytterst vanlig hos européer (ca 55 %)

*Den utpekade SNP befinner sig på långa armen av kromosom 8 (8q24) och ligger långt från närmaste gen. Den ligger faktiskt i ett område som kan betecknas som en genetisk öken (inga gener, ingen känd funktion).

*En känd cancerogen (MYC) ligger dock inom rimligt avstånd (ca 350 kb) från SNP, men preliminära försök kunde inte påvisa skillnader i uttrycket av MYC mellan bärare av G jämfört med individer utan G.

Ganska oväntat utpekades samma SNP i de båda andra samtidigt publicerade GWAS-baserade artiklarna (3, 4). Då man kombinerar alla tre blir OR ca 1,18. Det påvisades också att G-allelens frekvenser hos amerikaner av afrikansk härkomst var ytterst hög (85 %) och hos hawaiianer betydligt lägre (31 %), alltså starkt variabel.

Vad betyder nu allt detta? Olika perspektiv ger olika konklusioner.

1. *Betydelse för enskilda individer.* En OR kring 1,2 har knappast någon betydelse alls. Märk att över hälften av alla européer har denna "riskallel" och den antas ge en 1,2-faldig ökning av risken för koloncancer, vilket är så gott som försumbart. Den kumulativa incidensen av koloncancer är ca 5 procent. För den som har den "farliga" G-allelen är risken kanske ända upp till 6 procent, en skillnad helt utan praktisk betydelse. Någon med G kanske tänker mera på sin diet eller på koloskopi, medan andra kanske upplever fyndet som oroande eller irriterande utan att för den skull ändra på livsstilen. Läkare ger knappast specifika råd till bärare av G.

2. *Betydelse för populationer.* Om mörkhyade i USA har högre frekvens av G än ljushyade, och koloncancerfrekvensen anses vara högre hos mörkhyade, betyder detta något? Det kommer att kräva större undersökningar för att utreda vilken roll rs6983267 eventuellt spelar för dessa frekvenser. Detta ska ses mot bakgrunden av att yttre faktorer ("livsstil") kan medföra betydligt större variation. Likväl har man kalkylerat att den etiologiska fraktionen för populationen (*population attributable risk*), dvs. den andel av all koloncancer som hos européer är associerad med rs6983267, skulle vara hela 20 procent (5).
3. *Betydelse för forskning.* Ingen som helst insikt i vad rs6983267 åstadkommer eller leder till tycks ha vunnits under de två år som förflutit sedan de första publikationerna utkom. Här finns dock de stora möjligheterna. Förr eller senare kommer vi att veta om SNP möjligen trots allt ligger i en hittills oidentifierad gen (t.ex. en RNA-gen) som har en cancerframkallande effekt. Alternativt kan det tänkas att SNP påverkar en sådan DNA-sekvens som utövar kontroll över uttrycket av andra gener, t.ex. MYC (i närheten) eller vilken annan gen som helst i genomet. Nya metabola signaler kan bindas till disposition för koloncancer, t.ex. i form av cellernas interaktioner med tarminnehållet, tarmfloran eller dieten. När detaljerna har utretts kan man kanske sätta in läkemedel som ingriper i processerna. För att förhindra uppkomsten av koloncancer är det av primär betydelse att patogenesen är känd på molekylnivå. Här kan GWAS-upptäckta nya "riskassocierade" DNA-regioner eller gener spela en avgörande roll. Ett antal ytterligare arbeten har redan publicerats. Minst 10 associerade kromosomregioner har beskrivits, av vilka 6 finns uppräknade i Tabell I.

GWAS har utförts vid många vanliga sjukdomar. Inga forskare har blivit tomhänta: varje undersökning har lett till upptäckten av mer eller mindre starkt associerade SNP. Mycken aktiv forskning har bedrivits på t.ex. Crohns sjukdom där ett 30-tal mutationer och SNP är kända. Vid Crohns sjukdom skymtar man redan detaljerade beskrivningar av patogenetiska sammanhang (6). Genetisk associationsanalys vid diabetes av typ 1 och typ 2 har bedrivits länge, och vissa färskare resultat synes

ge hopp om kommande genombrott. Neurodegenerativa sjukdomar som Alzheimers och Parkinsons sjukdomar undersöks intensivt och genombrott kan möjligen väntas. När det gäller psykosser ser det kanske mindre ljus ut. Möjligen kan det bero på att sjukdomarna är svåra att definiera med strikt objektiva mått (jfr histologi vid cancer och blodsocker vid diabetes).

Nya perspektiv

Vi har fått nya slagord, som *prediktiv medicin* och *personlig hälsovård* (Personalized Health Care). Båda koncepten baserar sig delvis på de nya SNP-markörerna med låg penetrans som har upptäckts via GWAS. Jag tvivlar inte på att detta område kommer att utvecklas lavinartat i en nära framtid, men processen är inte enkel. Man har beräknat att antalet SNP som signifikant associeras med en sjukdom (t.ex. koloncancer) kan stiga till 200–400 (5). I de flesta fall är det mer än oklart hur dessa påverkar varandra, med andra ord om effekten är additiv eller multiplikativ. Än mer oklar är interaktionen mellan markörer som *ökar* och markörer som *minskar* risken för en sjukdom. Interaktion med livsstilsfaktorer är inte lätt att bedöma. För prediktiva test hos rådsökande individer krävs att testerna kan upprepas tillförlitligt, har solid vetenskaplig bakgrundsinformation, och röner stöd från läkare och annan sjukvårdspersonal. För närvarande uppfylls dessa krav nästan inte alls. Exempelvis läkarkårens kunskaper om betydelsen av allelassociationer är obetydliga av förståeliga skäl.

Det verkar riktigt att proklamera att dörren till något stort står på glänt. Lika rätt är att i detta skede avstå från balda löften om en ny sorts individualiserad hälso- och sjukvård. Vi bedriver ju redan i verkligheten just detta men med verktyg som vi förstår (blodtryck, kolesterolvärde, blodsockervärde, familjeanamnes, släktträd). De nya verktygen behöver ännu utvecklas innan de kan tas på allvar.

Kommersialiserad prediktion

Till slut är det viktigt att komma med en skarp varning för den kommersialism som håller på att utvecklas i denna bransch. Det kostar idag mindre än 1 000 euro att utgående från ett salivprov undersöka en miljon SNP hos en individ. Dylrika "tester" har lanserats av ett par dussin företagare, främst i USA men

Tabell I.

Ett urval kromosomregioner där SNP associerade med koloncancer har påvisats.

Kromosom-region	SNP	Oddsquot* (95 % konfidensintervall)	Gener i området	Referens
8q24	rs6983267 rs7842552 rs7014346	1,26 (1,12–1,38) 1,21 (1,15–1,27) 1,17 (1,12–1,23) 1,19 (1,15–1,23) 1,24 (1,17–1,33)	Inga kända gener i området POUSFIPJ i närheten men inget samband påvisat MYC ligger 350 kb från SNP men inget samband påvisat	Haiman et al. 2007 (4) Tomlinson et al. 2007 (2) Zanke et al. 2007 (3) Tenesa et al. 2008 (9) Tomlinson et al. 2008 (7)
18q21	rs4939827 rs12953717 rs4464148	0,85 (0,80–0,91) 1,20 (1,16–1,24) 0,85 (0,81–0,89)	En av dessa SNP ligger i intron 3 av SMAD7, men samband ej säkert påvisat	Broderick et al. 2007 (8) Tenesa et al. 2008 (9) Tomlinson et al. 2008 (7)
15q13	rs4779584 rs10318	1,23 (1,14–1,34)	I närheten av ett område som tidigare visat koppling till koloncancer	Tomlinson et al. 2008 (7)
10p14	rs10795668	0,89 (0,86–0,91)	Inga gener av intresse	Tomlinson et al. 2008 (7)
8q23	rs16892766	1,25 (1,19–1,32)	Flera gener i närheten, inget påvisat samband	Tomlinson et al. 2008 (7)
11q23	rs3802842	1,11 (1,08–1,15)	Mycket genrik region; inget påvisat samband	Tenesa et al. 2008 (9)

*OR över 1 innebär predisposition medan OR under 1 innebär protektion.

även i andra länder. Man kan gott tänka sig att denna mani snart sprids i de stora asiatiska länderna med avancerad teknik. Intresserade läsare vill kanske bekanta sig med ett par av dessa företag (se t.ex. www.23andme.com och www.navigenics.com). Vad är det fråga om? Ja, kunden skickar in ett salivprov och får i retur en förteckning över SNP-resultaten. Så långt påminner företagets utbud om varandra. Däremot är det stora skillnader mellan bolagens sätt att kommunicera med kunderna. Somliga säger sig ge ut "alla" resultat medan andra ger ut ett obetydligt antal SNP-resultat med motiveringen att det bara är deras prediktiva förmåga som är väl dokumenterad och tillförlitlig. Den ovanbeskrivna markören rs6983267 som är associerad med koloncancer finns på vissa listor. Vidare marknadsförs sådana nonsensbetonade SNP som associerats med t.ex. öronvaxets konsistens (tjockt eller tunt). Ett bolag marknadsför en SNP som påstås förutsäga kroppslängden. Somliga bolag uppmanar kunderna på det skarpaste att inte ändra sin livsföring på basis av resultaten

(av rädsla för åtal) medan andra marknadsför kunskapen om risk som ett sätt att motarbeta sjukdom. Det är alltså rena villervallan. Helt förkastligt finner jag att minst ett bolag meddelar resultat av markörer som i själva verket utgör genmutationer för bröstcancer med hög penetrans. Samma bolag uppmanar kunden att inte låta resultaten påverka sitt handlande!

Denna kommersiella verksamhet har på sina håll mötts med berättigad skepsis och kritik. Mycket av den lagstiftning som reglerar sådana ärenden i USA sker på delstatsnivå. Vissa delstater (t.ex. Kalifornien) förbjöd i ett skede all marknadsföring av dessa tester direkt till kunden ("Direct To Customer", DTC). Läget i USA är i detta avseende kaotiskt och debatten livlig. De viktigaste reservationerna mot marknadsföringen av den här typen av undersökningar är följande:

- Det normala sättet att initiera medicinska tester är att läkare ordinerar dem, inte att bolag gör reklam för dem.

- Resultaten av medicinska tester ska tolkas av läkare. Genetiska tester ska helst tolkas av genetiker eller utbildade genetiska rådgivare. Vad bolagen gör kan jämföras med att ta EKG eller EEG av kunden och sedan ge dem kurvorna.
- Vissa bolag erbjuder genetisk rådgivning. Genetisk rådgivning per e-post eller telefon rekommenderas inte av experter.
- De allra flesta resultaten är *inte* vetenskapligt tillförlitliga och kan alltså inte tolkas. Markörernas effekt på sjukdomsbenägenheten är i de flesta fall oklar.
- Det är i skrivande stund oklart om DNA från ett postat salivprov ger tekniskt så tillförlitliga resultat som bolagen hävdar (>99 % konkordans med DNA från blod).
- Direkt marknadsföring av detta slags tester till kunder borde inte alls förekomma och i synnerhet inte när det gäller barn.

Konklusion

Det är uppenbart att, något stort håller på att ske inom prediktiv medicin men vägen är lång och slingrande.

Prof. Albert de la Chapelle
Human Cancer Genetics Program
Comprehensive Cancer Center
The Ohio State University
460 W. 12th Ave., Room 804
Columbus, OH 43210
USA
albert.delachapelle@osumc.edu

Referenser

1. Gräsbecks R. Imerslund-Gräsbecks syndrom. Finska Läkaresällskapets Handlingar 2008; 168:44–51.
2. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 2007;39(8):984–988.
3. Zanke BW, Greenwood C MT, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 2007;39(8): 989–994.
4. Haiman CA, Le Marchand L, Yamamoto J, Stram DO, Sheng X, Kolonel LN et al. A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer. *Nat Genet* 2007;39(8):954–956.
5. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2009;10:353–358.
6. Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, Russell RK, et al. Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2009;84(3):399–405.
7. Tomlinson IPM, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM et al. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet* 2008; 40:623–630.
8. Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A et al. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2007; 39:1315–17.
9. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet* 2008; 40:631–637.

Nanoflottar i cellmembraner: en ny organisationsprincip

KAI SIMONS

Allt liv på denna planet består av celler; cellen är livets grundenhet. Det finns organismer som består av en enda cell, som amöbor, eller multicellulära species, som *Homo sapiens* med miljarder celler. Alla eukaryotiska celler är uppbyggda enligt samma principer. Cellen kan förliknas vid en stad med cellkärnan som rådhus. Där lagras den genetiska informationen och därifrån skickas meddelanden ut i form av budbärar-RNA som styr proteinsyntesen i cytosolen.

Cellen är ett nanoteknologiskt underverk där det myllrar av nanomaskiner som består av proteiner som utför all produktion, regulation, metabolism, energiförsörjning, kommunikation, nedbrytning och återanvändning. Det finns kraftverk i cellen: mitokondrier, proteinfabriker för export; det endoplasmatiske retiklet, postanstalter för distribution av proteinpaket till olika adresser; Golgikomplexet, lysosomer för återvinning av avfall osv.

Alla dessa olika organeller i cellen är omsluttade av membraner som bildar en barriär kring organellen. Cellmembranet utgörs av ett dubbelskikt av lipider bestående av glycerofosfolipider, sfingolipider och kolesterol och är fullbelamrat med proteiner som flyter omkring i lipiderna och utför olika funktioner bundna till membranet. Ungefär 30 procent av vårt DNA kodar för membranproteiner, och flera icke membranproteiner tillbringar en del av sin livscykel där för att utföra sitt arbete membranbundna. Det betyder att en stor del av alla funktioner i våra celler sker i cellmembraner.

FÖRFATTAREN

MKD **Kai Simons** har varit professor i biokemi vid Helsingfors universitet 1976–1979. Gruppleddare och chef för cellbiologiprogrammet vid European Molecular Biology Laboratory 1975–1998, direktör för Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics i Dresden 1998–2006, sedan 2006 gruppleddare vid samma institut.

Membranforskning förr och nu

Membranforskningen har djupa anor i Finland. En modell med dubbelskikt (bilayer) för biomembraner ställdes upp redan 1925 av Gorter och Grendel och baserades bl.a. på viktiga experiment av vår landsman Rune Collander. Vid denna tidpunkt stod lipiderna i förgrunden. Proteinerna i membranerna kom in i bilden senare. I Singer och Nicolson's membranmodell från 1972 illustrerades för första gången membranernas vätskekaraktär (1). Dubbelskiktet är ett 5 nanomillimeter tunt vätskeskikt där de enskilda lipiderna och proteinerna flyter omkring.

Här kommer våra studier in i bilden. Min forskning har alltsedan tiden på Minerva befattat sig med cellmembraner. År 1988 ställde vi upp en banbrytande hypotes som postulerade att dubbelskiktet av lipider inte bara är en vätska i vilken proteinerna simmar omkring på måfå utan att det i detta fluidum bildas små flottor av sfingolipider som transporterar specifika proteiner (2). Senare fann vi att kolesterol är en viktig beståndsdel i dessa flytande flottor (3). Flottornas vätskeplattformar innehåller lipider i dubbelskiktet och förekommer där tätare packade än i det omgivande vätskeskiktet. En av kolesterolns funktioner är att packa samman de lipider och proteiner som bildar dessa flottor. Det börjar bli klart att en av de viktigaste uppgifterna för kolesterol i vår kropp är att fungera som ett molekylärt lim för att binda ihop flottorna.

Våra arbeten med cellpolaritet i epitelceller gav mig idén till flottorna. Epitelcellerna bildar skikt som täcker alla våra organ och fungerar som en barriär mellan den externa

och den kroppsinterna miljön. I till exempel tarmen bildar epitelet ett skyddsskikt där den del av plasmamembranet som vetter mot tarmlumen, det så kallade apikala plasmamembranet, är isolerad från det basolaterala plasmamembranet, riktad mot insidan och blodförsörjningen. Mellan de apikala och de basolaterala membrandomänerna finns en diffusionsbarriär, zonulae occludentes, som också bildar en förbindelsezon mellan cellerna i epitelet. De apikala och den basolaterala membranerna har olika funktioner och därför också olika proteinsammansättning. Även lipiderna är olika apikalt och basolateralt. Glykosfingolipider är starkt anrikade apikalt och bildar en tätt packad skyddsbarriär mot tarminnehållet.

Vi var intresserade av hur nysyntetiserade proteiner och lipider transporteras apikalt och basolateralt. Hur klarar cellen av detta sorteringspussel? För att alla funktioner ska fungera normalt byter cellen ständigt ut sina beståndsdelar genom nysyntes, precis som delar i ett flygplan ersätts. För att förklara hur apikala proteiner och glykolipider skickas ut i paket från postanstalten i cellen, Golgikomplexet, postulerade vi att dessa lipider tillsammans med sina proteinpassagerare bildar plattformar i Golgimembranet, dvs. flottor för apikal transport. Först trodde vi att det här enbart var ett fenomen i epitelceller, men det visade sig att flottorna var generella och utgjorde en allmänt funktionerande princip i våra celler. De hade inte bara transportfunktioner utan var verksamma i ett flertal membranprocesser, t.ex. signalering och metabolism.

Vår nya modell var tekniskt svår att påvisa och ledde länge till meningsskiljaktigheter och kontroverser. En orsak var att flottorna med sina lipider och proteiner visade sig vara svårslösliga i detergentia. Denna påvisningsmetod började användas som ett bevis för att demonstrera att en membranprocess skedde i sfingolipid-kolesterinflottor. Plötsligt uppkom en trend att utföra dessa enkla detergentsexperiment och ibland manipulera resultatet så att proteinet blev svårslösligt(4). Det ledde till en uppsjö av publikationer vars tillförlitlighet var svår att bedöma (5).

Denna fas är nu förbi. Nya sofistikerade metoder har gjort sitt intåg på fältet. Främst är det fråga om att avancerad singelmolekylmikroskopi och spektroskopisk teknik har revolutionerat forskningen. Dessa metoder har visat att membranflottorna är dynamiska strukturer. De dissocierar och associerar i millisekundhastighet (6). Vidare har det visats

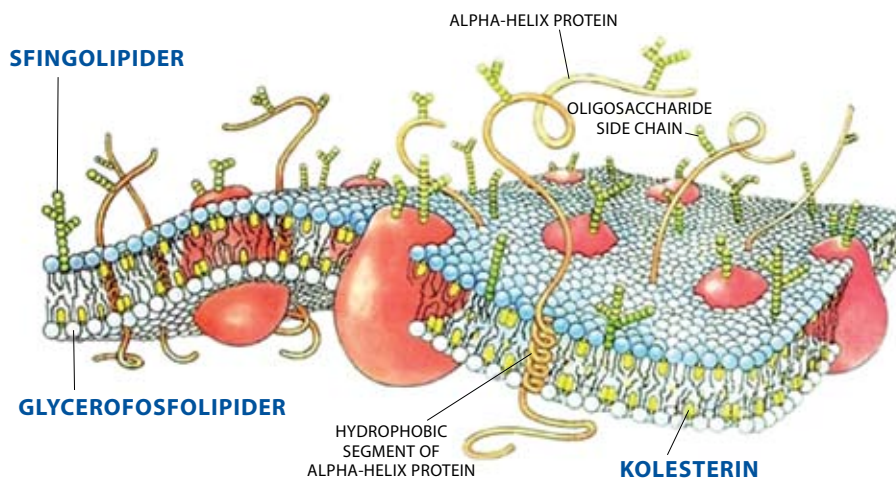
att dessa fluktuerande nanoflottor kan stabiliseras för att bilda mera hållbara plattformar som fungerar i membrantrafik, cellsignalering och många andra membranprocesser.

Ett exempel för en process där dessa flottor spelar en viktig roll är T-cellssignaltransduktion. När en T-cell möter en antigenpresenterande cell bildas mellan dessa celler en kontaktzon – en immunologisk synaps – där T-cellsreceptorn binder till antigenet i MHC-proteinet (7). Denna process leder till en anhopning av nanoflottor med T-cellsreceptorer som smälter ihop till en synaps där ett komplicerat maskineri av proteiner aktiverar T-cellen för att åstadkomma ett specifikt immunsvär.

Lipidforskning i framtiden

Ett område som har kommit på efterkälken i den snabba utvecklingen av genomik och proteomik är lipidanalytiken. Utvecklingen av nya metoder har revolutionerat analysmetodiken i molekylärbiologin. Och nu gör masspektrometrin sitt intåg i lipidanalytiken och kommer att revolutionera lipidologin. Vårt Max-Planckinstitut i Dresden har varit en banbrytande pionjär på detta område, och med den metodologi vi där har utvecklat kan vi analysera de hundratals olika lipider som utgör byggstenarna i cellmembraners lipiddubbelskikt och dessas flottor. I ett samarbete med Thomas Harders forskargrupp i Oxford har vi isolerat T-cellssynapsen och demonstrerat att lipider som vi postulerat ska finnas i membranflottorna i själva verket anrikas i synapsen (8). Efter alla kontroverser speciellt på detta område är det ett synnerligen tillfredsställande resultat för vår forskning. Flottorna används som funktionsprincip i flera olika immunologiska processer, bland annat också i B-cellsimmunsvär och allergiska reaktioner.

Det fascinerande i all denna komplexitet som möter oss i dag i den biomedicinska forskningen är att grundprinciperna trots allt är relativt enkla, medan den kemiska sammansättningen är komplicerad. Den molekylära diversitet som vi påträffar i naturen är enorm. Tänk bara på alla olika slags proteiner som finns i olika organismers proteom! Men genom att denna komplexitet har uppstått under evolutionen från en enda urcell kan vi spåra släktskapet på all nivåer i biologin. Inte bara det genetiska språket, kodat i våra geners DNA, är identiskt i alla levande organismer. Många andra släktdrag kan också påvisas om vi bara tränger tillräckligt djupt i våra analyser.



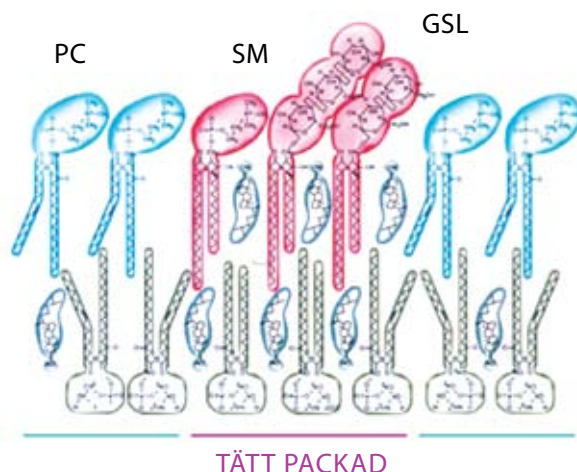
Figur 1.
Singer och Nicolson's membranmodell. Här ser vi proteinerna simma omkring i ett lipiddubbelskikt av fosfolipider, sfingolipider och kolesterol.

Det gäller också för vår modell för dynamisk membrankompartimentalisering. Den grundar sig egentligen på fasseparering, det fenomen som får olja och vatten att separera i två olika faser. När nanoflottarna i cellmembranen smälter ihop till större plattformar bildas ett mera tätpackat men flytande dubbelskikt som skiljer sig från det omgivande membranet. En vätske-vätske imiscibilitet formulerade att antalet faser i ett slutet system i jämvikt förenklat uttryckt är $n-1$ där n är antalet kemiska komponenter i systemet. Det skulle betyda att ett cellmembran som innehåller över 1 000 lipid- och proteinkomponenter kunde uttrycka bortåt 1 000 olika faser. Men så är det inte! Vi har visat att vi, om vi producerar "ballonger" av plasmamembraner från celler, kan inducera en fasseparation i plasmamembranet som vi kan iaktta i mikroskop: en fas där flottarna har smält samman och en annan fas där membranets andra beståndsdelar har flutit ihop. Dessa båda faser är segregerade från varandra (9). Med andra ord uppför sig plasmamembranets kemiska komponenter som två kollektiv. Det kunde betyda att membranets lipider och proteiner under evolutionstrycket har utvecklats så att egenskaper med förmågan att fasseparera har fokuserats på två eller ett fåtal kemiska grupperingar som gör det möjligt för cellen att med en obetydlig energiinsats dynamiskt kompartimentalisera sina membraner för att genomföra olika funktioner. Trots den molekylära komplexitet som är nödvändig för att upprätthålla alla membranfunktioner är grundprincipen för membrankompartimentalisering i princip därför rätt enkel. Flottarna

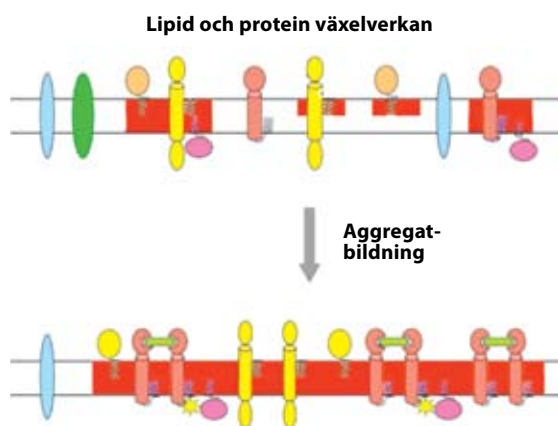
möjliggör att parallella processer samtidigt kan äga rum i samma cellmembran; plattformarna skapar separerade reaktionsrum för olika cellulära processer. Dessa konstruktionsprinciper för dynamisk membranarkitektur har också stor betydelse i patogenesen för olika sjukdomsprocesser. Lipidnivåerna, inte bara kolesterinkoncentrationen, måste regleras exakt för att kroppen ska fungera normalt. Vi vet att denna homeostas tar en avsevärd del av vårt genom i anspråk.

Membranflottar

Vi har studerat en sjukdom där membranflottarna spelar en viktig roll, nämligen Alzheimers sjukdom. Vi vet att familjär alzheimer orsakas av genetiska mutationer som gäller APP (amyloid precursor protein). Detta membranprotein spjälkas av två proteolytiska enzymer, beta- och gammasekretas, i ett fragment – beta-amyloid. Beta-amyloid är svårlösligt och kan avlagras i hjärnan om produktionen blir för hög. Denna amyloid är också toxisk för neuroner. Vi har visat att beta-sekretasspjälkningen äger rum i endosomer, det kompartment som bildas genom endocytos från plasmamembranet. Där sker produktionen av beta-amyloid genom en sammansmältning av sfingolipid-kolesterinflottar som är bärare av både beta-sekretas och en minoritetspopulation av APP (10). Beta-amyloid produceras under hela vårt liv i stort sett i alla celler i kroppen, men vid någon tidpunkt efter ca 65 års ålder blir belastningen för stor för de patienter som får alzheimer, och hjärnan klarar inte av renhållningen av



Figur 2.
En schematisk bild av sfingolipid (röda) – kolesterolmembranflottar – utan proteiner. Flotten flyter i ett dubbelskikt av omättade fosfolipider (blå).



Figur 3.
Schematisk bild av en plasmamembran där dynamiska nanoflottar (röda) med proteiner (gula och lätt röda) flyter omkring. Dessa flottor kan aktiveras genom att oligomerisera proteiner eller lipider i flottor så att dessa nanoflottar smälter samman till en stabilare plattform (röd) där t.ex. en T-cellsreceptor aktiverar en signalprocess som förs vidare in i cellen.

beta-amyloid. För patienter som har ärftlig alzheimer uppträder sjukdomen redan i åldern 40–50 år för att produktionen av beta-amyloid är genetiskt förhöjd.

För närvarande finns inga verkksamma läkemedel för patienter med Alzheimers sjukdom. Om man kunde inhibera beta-sekretasenzymet åtminstone partiellt, vore en alzheimerterapi potentiellt möjlig. Än så länge existerar inga effektiva beta-sekretasinhistorer på marknaden. Ett problem är att en beta-sekretasinhistor måste passera två cellmembraner för att nå sitt mål. Först måste

läkemedlet transporteras genom plasmamembranet och sedan måste det nå endosomens inre genom endosomens membran. Vi håller på att utveckla en ny strategi för att finna en lösning på detta problem. För att underlätta transporten till endosomerna och för att slussa in inhibitorn i endosomflottarna har vi försett en beta-sekretasinhistor som biter på isolerat enzym men som inte är aktiv i cellförsök med ett ankare som består av ett kolesterinderivat. Och det fungerar! Genom att förankras inne i plasmamembranet åker inhibitorn snålskjuts in i cellen rakt till endosomen där den via sitt sterolankare också inkorporeras i APP-sekretasplattformen för att inhibera proteolysen (11). Nu söker vi efter vägar att slussa in en sådan förankrad inhibitor i hjärnan. Vi hoppas att på detta sätt kunna använda den kunskap vi har vunnit genom våra biokemiska och cellbiologiska experiment till att utveckla nya strategier för läkemedelsutveckling.

Prof. Kai Simons
Max Planck Institute
for Molecular Cell Biology and Genetics
Pfotenhauerstrasse 108
01307 Dresden
Tyskland
simons@mpi-cbg.de

Referenser

1. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(23):720–731.
2. Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988;27(17):6197–202.
3. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387(6633):569–72.
4. Lingwood D, Simons K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc* 2007;2(9):2159–65.
5. Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 2003;115(4):377–388.
6. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, et al. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 2009;457(7233):1159–62.
7. He HT, Marguet D. T-cell antigen receptor triggering and lipid rafts: a matter of space and time scales. *Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation. EMBO Rep* 2008;9(6):525–530.
8. Zech T, Ejsing CS, Gaus K, de Wet B, Shevchenko A, Simons K, et al. Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *Embo J* 2009;28(5):466–476.
9. Lingwood D, Ries J, Schwill P, Simons K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(29):10005–10.
10. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 2003;160(1):113–123.
11. Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, et al. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* 2008;320(5875):520–523.

Vad var och en bör veta om preanalytiska faktorer

BENOIT DUGUÉ

De faktorer som påverkar resultatet av laboratorieprover kan indelas i 1) In vivo-preanalytiska faktorer (t.ex. ålder, kronobiologisk rytm, diet, sjukdom o.s.v.), 2) In vitro-preanalytiska faktorer (t.ex. provtagning, utrustning, transport, lagring o.s.v.) och 3) analytiska faktorer (analysmetod o.s.v.) samt 4) postanalytiska faktorer (t.ex. hur resultaten rapporteras och tolkas). För att förbättra laboratoriediagnostiken måste de faktorer som kraftigt inverkar på resultaten kunna kontrolleras. Detta kan åstadkommas genom användning av standardiserade metoder för analys och provtagning.

I den kliniska verksamheten beaktar man tyvärr inte tillräckligt ofta de preanalytiska faktorerna. Denna översikt understryker därför hur mycket dessa faktorer inverkar på resultatet av laboratorieprover och hur viktig inverkan är. Speciellt framhålls undersökningar som har initierats och utförts av nuvarande eller tidigare medlemmar i Biokemigruppen vid Minerva.

Inledning

När jag lämnade Minerva för nästan 10 år sedan ordnades en liten fest. Institutets medlemmar och Ralph Gräsbeck, chef för Biokemigruppen och min handledare, gav mig en avskedsgåva som sades vara en lista över de ställen där jag borde föreläsa om hur preanalytiska faktorer, dvs. faktorer som verkar under perioden mellan beslutet att ta ett prov och den slutliga analysen, inverkar på resultaten av laboratorieprover. Denna märkliga present var en världsatlas!

Jag har försökt följa denna apostoliska mission att göra laboratoriepersonal (t.ex. tekniker, laboratorieskötare, studerande) och kolleger som ansvarar för tolkningen av laboratoriedata (t.ex. läkare, vetenskapsmän) medvetna om betydelsen av de talrika preanalytiska faktorer som kan påverka laboratorieresultaten och således också tolkningen av dem. Denna uppgift är verkligen inte lätt; också nära kolleger kan förbli skeptiska. Studerande verkar vara de som lättast kan acceptera, lära sig och också arbeta med preanalytiska faktorer. Detta gäller i själva verket hela filosofin med referensvärden, som äldre kolleger har svårt att tillägna sig.

Denna artikel är därför en del av en serie framställningar om betydelsen av preanalytiska faktorer vid laboratoriearbete och då man tolkar laboratoriedata.

Referensvärden och preanalytiska faktorer – två viktiga begrepp utvecklade vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva

Begreppet eller paradigmet referensvärden är i grund och botten filosofiskt; det uppfanns av Ralph Gräsbeck vid Minerva och utvecklades sedan vidare i samarbete med inhemska, skandinaviska och internationella kolleger. Begreppet kan definieras som att man fastställer och använder relevanta data för att tolka medicinska iakttagelser. Ett annat sätt att uttrycka saken är att kliniska iakttagelser ska tolkas med användande av ett ordentligt

FÖRFATTAREN

FD **Benoît Dugué** är för närvarande professor i fysiologi vid fakulteten för idrottsvetenskap vid universitetet i Poitiers, Frankrike. Bosatt i Finland i ungefär tio år medan han arbetade inom Biokemigruppen vid Minerva där han skrev sin avhandling. Han utnämndes till docent i biokemi vid Helsingfors universitet 1998. Han har fortsatt samarbetet med finländska kolleger inom områdena referensvärden samt idrotts- och motionsmedicin, och har också studerat fysiskt handikappade personer.

kontrollmaterial, i likhet med experimentella data. Begreppet behöver inte nödvändigtvis begränsas till laboratoriemedicin (1–3). I grund och botten är det frågan om att tolka ett mätresultat (ett observerat värde) genom att jämföra det med en eller flera samlingar av data (referensvärden) som har insamlats med samma teknik från lämpliga kontrollpersoner (referensindivider). Referensvärden bör därför noggrant samlas in från ett tillräckligt stort antal representanter för den population som ska undersökas. Det är viktigt att inte bara bestämma referensvärden för subjektivt friska personer (hälsorelaterade referensvärden), utan också för personer som lider av olika slags sjukdomar (sjukdomsrelaterade referensvärden). Referensvärden kan också vara statiska (resultat vid en viss tidpunkt) eller dynamiska, då de återspeglar en tidsrelaterad process. Det nya begreppet referensförändring (reference change) har på senare tid använts för den sistnämnda situationen (4). Man kan få gruppbaseade referensvärden genom att dela upp referenspopulationen i mindre grupper. Det kan till exempel vara relevant att under vissa förhållanden ha olika referensvärden för män och kvinnor eller för olika åldersgrupper. Personbaseade (individuella) referensvärden som tidigare har uppmätts på individen själv kan verka vara idealiska, speciellt om det populationsbaseade referensintervallet för ett mätvärde är för stort. Man bör studera resultatens noggrannhet med avseende på olika material och omständigheter. Olika medicinska specialiteter och olika kliniska och preventiva medicinska situationer kan kräva olika slags procedurer (1, 5, 6).

Variationer i resultaten av laboratorieprover kan bero av ett stort antal olika faktorer som kan kategoriseras som i Figur 1. De kan indelas i preanalytiska, analytiska och postanalytiska faktorer (5, 7, 8). Preanalytiska faktorer inverkar före den slutgiltiga analysen, och de kan indelas i *in vivo*- (biologiska) och *in vitro*-faktorer. *In vivo*-faktorer inverkar i den undersökta personen före och under provtagningen; en del av dessa faktorer kan kontrolleras, som diet, läkemedelsbehandling, fysisk aktivitet och kroppsställning, medan andra inte är kontrollerbara, som genetiska faktorer, kön eller ålder. *In vitro*-faktorerna omfattar provtagningen och provtagningsutrustningen samt behandlingen av provet (transport, lagring, förberedelse för analysen). En lista över en del *in vivo*- och *in vitro*-preanalytiska faktorer visas i Tabell I. Eftersom det viktigaste ändamålet med laboratorie-

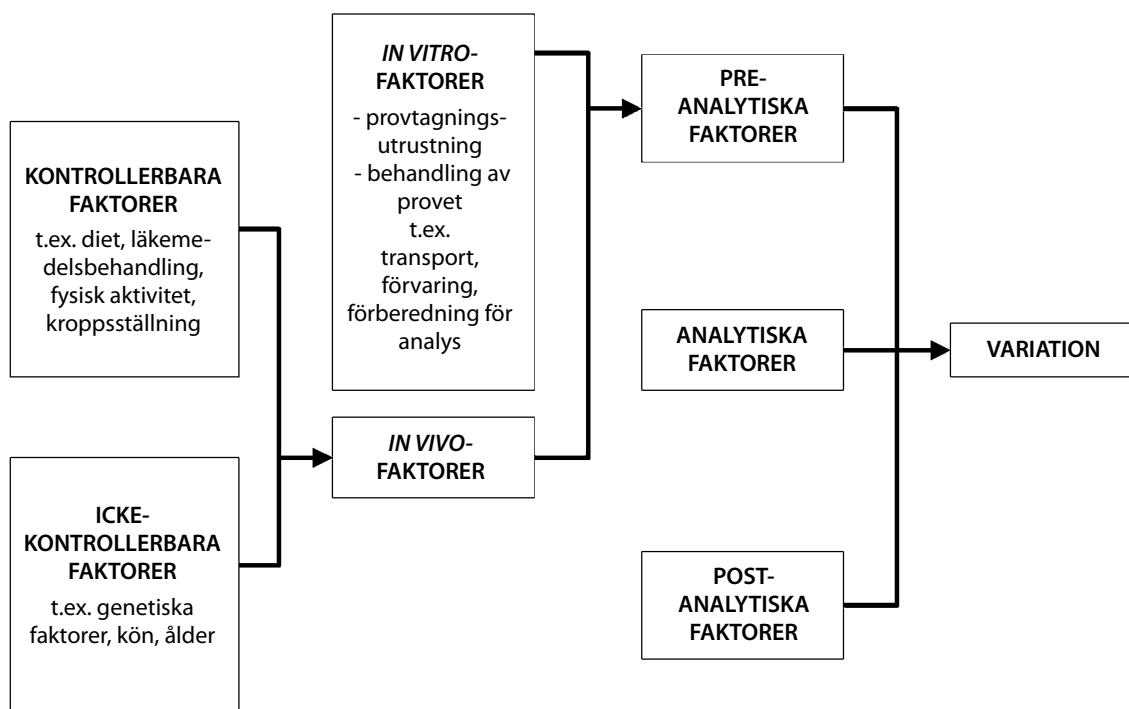
undersökningar är att särskilja patologiska (eller avvikande) resultat och bakgrundsdata från kontrollpersoner (eller från tidigare data från samma person), är det viktigt att minska bruset (variationen) som beror på icke-patologiska faktorer.

Hur kan man minska de preanalytiska faktorernas inverkan?

De finns flera sätt att minska inverkan av dessa faktorer. Man kan mycket strikt standardisera förberedelsen av patienterna för testerna, insamlingen och behandlingen av data samt de analytiska metoder som används. För att utveckla standardiseringsprocedurerna måste faktorer som potentiellt inverkar på resultatet upptäckas och studeras. Om de orsakar en klar förskjutning av data borde man utveckla strategier för att undvika att sådana faktorer inverkar på resultaten. Om det är frågan om kontrollerbara faktorer kan man använda procedurer som dämpar dessa faktorer inverkan, och sedan förbättra standardproceduren med lämpliga nya regler. Om faktorerna inte kan kontrolleras, borde undersökningar genomföras för att klarlägga hur mycket (t.ex. i procentuell förändring) en faktor eller en kombination av faktorer kan påverka data. Möjligheten att använda speciella set av referensvärden eller att korrigera data bör övervägas. Om en inverkan faktor konstateras före eller under mätproceduren, borde detta åtminstone meddelas klinikern eller forskaren som utnyttjar data för att fatta beslut, till exempel genom att bifoga en varning till laboratoriesvaret.

Borde inverkan av preanalytiska faktorer utvärderas så snart en ny undersökning blir kommersiellt tillgänglig? Vem borde ansvara för en utvärdering?

Den preanalytiska fasen har större inverkan på resultatet av laboratorieundersökningar än själva analysen; det analytiska felet är alltså mycket mindre än den preanalytiska variationen. Jag anser att kvalitetskontrollen för ett laboratorieprov borde omfatta preanalytiska faktorer långt mer än vad nu är fallet. Inte ens internationella standarder beaktar tillräckligt detaljerat patientens fysiologiska tillstånd och hur patienten förbereds innan provtagningen. Klinikern borde vara medveten om att en förändring i laboratorieresultaten inte nödvändigtvis innebär en förändring i patientens hälsotillstånd. Kliniska beslut borde basera sig på fakta snarare än på erfarenhet och välgrundade gissningar. Man kan därför fråga sig



Figur 1.
Faktorer som påverkar resultatet av laboratorieprover.

om inte undersökningar av de preanalytiska faktorerna borde finnas med i valideringsprocessen för en ny undersökning. Min åsikt är att sådana studier borde krävas. Till dags dato har ett sådant krav tyvärr inte övervägts. En annan fråga är vem som borde ansvara för sådana undersökningar, en officiell instans, företaget som säljer undersökningsmetoden, eller någon annan?

Några exempel på bidrag av nuvarande eller tidigare medlemmar av Biokemigruppen vid Minerva till studiet av inverkan av preanalytiska faktorer

Vi har studerat inverkan av ett rätt stort antal preanalytiska faktorer, som kroppsställning (9–12), fysisk och psykisk stress (13–18), fysisk ansträngning (18–23), näringsupptag (6, 24) eller tid på dygnet (6, 24), på resultatet av många prover som används rutinmässigt eller som håller på att utvecklas.

En av de mest framgångsrika undersökningarna studerade kroppsställningens inverkan; den presenteras nedan mer i detalj. Redan under min tid vid Minerva diskuterade vi mycket

den sammanlagda effekt som en kombination av preanalytiska faktorer har på resultatet av laboratorieprov. Det står klart att flera preanalytiska faktorer samverkar vid provtagningen, t.ex. näringsintag, kroppsställning och användning av stång. En av mina studerande skrev nyligen sin doktorsavhandling om faktorer (eller kombinationer av faktorer) som påverkar den endogena produktionen av androgener hos kvinnor.

Som jag tidigare har nämnt vore det viktigt att preanalytiska faktorer äntligen skulle studeras då ny teknologi utvecklas. Vi har nyligen framlagt preliminära resultat som klart visar att fysisk ansträngning är en preanalytisk faktor som bör beaktas då man undersöker metabolomik med urinprov.

Inverkan av kroppsställningen

Med avseende på referensvärden är det av grundläggande betydelse att provtagningsförhållandena är desamma för referenspersonerna och patienterna: värden för sittande patienter ska jämföras med värden från sittande kontrollpersoner och värden från liggande patienter med värden från liggande kontrollpersoner. Men i praktiken tas rutinblodprov

Tabell I.
Exempel på preanalytiska faktorer som orsakar variation.

IN VIVO-FAKTORER	IN VITRO-FAKTORER
ålder blodtyp	koagulation (tid, temperatur, underlättande agens) utrustning (provtagningstillbehör: typ, storlek, form, material; förvaringskärl: kapillärrör eller större rör av glas, plast; tillsatsämnen)
kronobiologiska faktorer diet (typ, mängd) sjukdom miljö	förberedelse för analys (upptining, blandning)
etnisk grupp	separation av serum, plasma och fasta beståndsdelar
motion och fysisk kondition feber	element (centrifugkraft, tid, temperatur) förvaring (behållare, varaktighet, temperatur, konserveringsmedel)
genetiska faktorer menstruation, menopaus	teknik (punktering, uppsamling: fritt flöde eller sug)
farmakologiskt aktiva ämnen kroppsställning	transport (behållare, konserveringsmedel, temperatur, tid)
graviditet pubertet kön socioekonomisk ställning stress	

ofta på morgonen på rörliga polikliniska patienter som har ansträngt sig måttligt fysiskt (vanligen genom att komma gående), medan sjukhuspatienter ofta ligger i sina bäddar nästan helt utan fysisk aktivitet (11).

Små molekyler påverkas minst av kroppsställningen vid blodprovtagningen eftersom de fritt kan röra sig mellan interstitiella rummet och blodbanan (10). Medan den fria fraktionen av en metabolit, ett läkemedel, ett hormon eller en metalljon vanligen inte påverkas av kroppsställningen, påverkar kroppsställningen den fraktion som är bunden till protein, t.ex. albumin. I blodprover från personer i sittande ställning ses i allmänhet en ökning av de flesta cellulära och makromolekylära substanserna jämfört med blodprover från personer i liggande ställning (10).

Behovet att standardisera patientens kroppsställning vid provtagning är uppenbart. Åtminstone måste man veta i vilken omfattning och riktning förändringarna sker då ställningen ändras från liggande till sittande.

Enligt den skandinaviska rekommendationen för sammanställning av referensvärden (25) borde rörliga patienter sitta i minst 15 minuter före provtagning. Förändringar i plasmavolymer i samband med förändrad kroppsställning eller vid användning av stasslang kan påverka koncentrationen av flera substanser. Det har föreslagits att blodprov borde tas sedan patienten suttit i 15 minuter, utan stasslang och helst på morgonen på fastande mage (26). Detta förfaringsätt minskar effekten av många preanalytiska faktorer, vilket vi har visat för en del substanser (9–11). Tyvärr bryr man sig ofta inte om sådana procedurer. Det finns ett anmärkningsvärt undantag: Idrottsmän verkar vara mycket noga med att inta en standardiserad kroppsställning innan de lämnar blodprov för mätning av hemoglobinkoncentrationen (3).

Samverkan av flera preanalytiska faktorer

Vi har nyligen hos unga kvinnor undersökt inverkan av menstruationscykeln, oral kon-

traception och fysisk träning på tränings-inducerade (kort- och långvariga intensiva övningar) förändringar i cirkulerande dehydroepiandrosteron (DHEA) -sulfat samt testosteron, urinutsöndring av DHEA, dess metabolit androsteron och nandrolonmetaboliter (19-norandrosteron och 19-noretiocholanon) (8, 20–22). Nandrolonutsöndringen påverkades inte av menstruationscykelns fas (tidig/follikulär jämfört med mellan/luteal), föregående motion, oral kontraception eller akut fysisk ansträngning. Hos alla försökspersoner orsakade långvarig ansträngande motion en signifikant stegring av cirkulerande DHEA-s och testosteron samt av androsteronutsöndringen i urinen. Kortvarig motion orsakade en signifikant stegring i cirkulerande DHEA hos otränade försökspersoner och hos vältränade försökspersoner med fysiologisk menstruationscykel. Oral kontraception minskade de förändringar som orsakades av kortvarig motion.

Dessa resultatserier är av vikt när man tolkar data från dopingkontroll på idrottare.

Fysisk ansträngning och metabolomik

Metabolomik är det systematiska studiet av de unika kemiska fingeravtryck som specifika cellulära processer lämnar efter sig; mer specifikt studiet av metabolitprofiler med avseende på små molekyler (27). Metabolomik är därför en vittomfattande metod för metabolanalys, där man mäter biologiska provers övergripande metabola profil. Vi använde detta tillvägagångssätt för att undersöka förändringar i urinens biokemiska profil orsakad av fysisk ansträngning (23). Den ansträngning vi undersökte var intensiv men kortvarig (30 sekunder). Proverna analyserades med ¹H NMR-spektroskopi, och multivariata statistiska metoder användes för att analysera data. Som väntat orsakade intensiv fysisk ansträngning många förändringar i provernas metabola profil, både hos otränade och vältränade försökspersoner. Förändringarna förblev signifikanta mer än en timme efter avslutad ansträngning. Därför borde hård fysisk ansträngning beaktas som en viktig biologisk faktor som påverkar experimentresultaten vid studier i metabolomik inom farmakologi och toxikologi samt vid kliniska studier, och betydelsen av att undvika denna faktor borde beaktas då en studie planeras. I ljuset av våra data är metabolomik å andra sidan ett lovande verktyg med vilket man kan

profilera idrottares urin för att få en insikt i det fysiologiska tillståndet samt klargöra de förändringar som orsakas av kortvarig intensiv fysisk ansträngning.

Nuvarande och framtida forskning om preanalytiska faktorer

Antalet publikationer om preanalytiska faktorer i Medline är för närvarande över 500. Detta antal är globalt sett rätt litet, men det är intressant att 20 procent av artiklarna har publicerats under de två senaste åren, vilket återspeglar den ökande förståelsen av hur viktigt området är. Ett tidigt undantag är Donald Youngs bok (28). Det är också lovande att författare nu för tiden beaktar inverkan av preanalytiska faktorer då nya tekniker utvecklas (29, 30). Dessutom publiceras allt fler artiklar om faktorer som kan inverka på resultatet av laboratorieprover, också om de oftast inte kallas preanalytiska faktorer. Därför har vårt pionjärbete inte varit förgäves, och det står klart att mycket mera sådan forskning är i antågande.

Slutsats och budskap att ta till sig

Ändamålet med denna översikt är att uppmärksamma läsaren på inverkan av det stora antal preanalytiska faktorer som kan påverka resultatet av laboratorieprover och andra kliniska tester. För att förbättra testernas värde borde man därför bemöda sig om att begränsa inverkan av förvrängande faktorer, när detta är nödvändigt. En nyckelstrategi är att införa och följa (!) standardiserade procedurer för hur prover ska tas och behandlas, och att rutinmässigt rapportera till klinikern då man har avvikit från de rekommenderade procedurerna. Flera andra problem borde också angripas, som behovet av en standardisering av de analytiska metoderna och utvecklingen av lämpliga samlingar av referensvärden och referensintervall.

Prof. Benoit Dugué
Université de Poitiers
Faculté des Sciences du Sport et Laboratoire
des Adaptations Physiologiques aux Activités
Physiques (EA 3813)
4 allée Jean Monnet
86000 Poitiers
Frankrike
benoitdugue@hotmail.com

Referenser

- Advances in Clin Chem 1989;27:1-79.
- Gräsbeck R. Reference values, why and how. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1990;50 Suppl 201:45-53.
- Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med 2004;42:692-697.
- Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Voipio-Pulkki L-M, Peltola O, Irjala K. Method for determining reference changes from patients' serial data: example of cardiac enzymes. Clin Chem 1993;39:2298-304.
- Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors and the measurement of cytokines in human subjects. Int J Clin Lab Res 1996;26:99-105.
- Leppänen E, Dugué B. When to collect blood specimens: mid-morning vs fasting samples. Clin Chem 1998;44:2537-42.
- Gräsbeck R. Terminology and biological aspects of reference values. Logic and Economics of Clinical Laboratory Use Vol. New York: Elsevier, 1978:77-90.
- Enea C, Boisseau N, Diaz V, Dugué B. Biological factors and the determination of androgens in female subjects. Steroids 2008;73:1203-16.
- Leppänen E. Experimental basis for standardisation of blood specimen collection. Doktorsavhandling Helsingfors, 2004.
- Leppänen E, Gräsbeck R. Experimental basis of standardized specimen collection: Effects of posture on blood picture. Eur J Haematol 1988;40:222-226.
- Leppänen E, Luisto M, Dugué B. Surgical patients with surprising laboratory data. Br J Clin Pract 1995;49:121-122.
- Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Packed-cell volume in athletes. Lancet 1998;352:1387-8.
- Dugué B, Leppänen E, Zhou H-P, Gräsbeck R. Preanalytical factors and standardised specimen collection: influence of psychological stress. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1992;52:43-50.
- Dugué B, Leppänen E, Teppo A, Fyhrquist F, Gräsbeck R. Effects of psychological stress on plasma interleukins-1 beta and 6, C-reactive protein, tumor necrosis factor, antidiuretic hormone and serum cortisol. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1993;53:555-561.
- Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors and standardised specimen collection: the effect of industrial noise. Stress Medicine 1994;10:185-189.
- Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. Preanalytical factors (biological variation) and the measurement of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 in man. Influence of the time of the day, food intake, psychological and physical stress. Clin Chem 1999;45:1543-47.
- Dugué B, Leppänen E, Gräsbeck R. The driving licence examination as a stress model. Effects on blood picture, serum cortisol and the production of pro-inflammatory interleukins in subjectively healthy volunteers. Life Sciences 2001;68:1641-7.
- Dugué B, Smolander J, Westerlund T, Oksa J, Nieminen R, Moilanen E, Mikkelsen M. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidant capacity in healthy women. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 2005;65:395-402.
- Dugué B, Leppänen E. Adaptation related to cytokines in man. Effects of regular swimming in ice-cold water. Clin Physiol 2000;20:114-121.
- Bayle M, Enea C, Goetinck P, Lafay F, Boisseau N, Dugué B, et al. Quantitative analysis of DHEA and Androsterone in female urine: application to the evaluation of sport and contraceptive pill intake influences. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009;393:1315-25.
- Enea C, Boisseau N, Bayle M, Flament M, Denjean A, Diaz V, Dugué B. Nandrolone excretion after exhaustive exercises in females: influence of menstrual cycle, oral contraception and training level. Scand J Med Sci Sports 2009; i tryck.
- Enea C, Boisseau N, Ottavy M, Mulliez J, Millet C, Ingrand I, Dugué B. Effects of menstrual cycle, oral contraception, and training on exercise-induced changes in circulating DHEA-sulfate and testosterone in young women. Eur J Appl Physiology 2009;106:365-373.
- Enea C, Seguin F, Petitpas-Mulliez J, Boisseau N, Delpech N, Diaz V, Dugué B. Physical exercise is a preanalytical factor to consider in urine metabolomic studies: an investigation in the profile changes induced by acute and chronic physical exercise. Acta Physiologica (supplement 671) 2009; O7.
- Dugué B, Leppänen E. Short term variability in the concentration of serum IL-6 and its receptor in subjectively healthy persons. Clin Chem Lab Med 1998;36:323-325.
- Alström T, Gräsbeck R, Hjelm M, Skandsen S. Recommendations concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report by the Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1975;144:1-44.
- Alstrom T, Gräsbeck R, Lindblad B, Solberg H, Winkel P, Viinikka L. Establishing reference values from adults: recommendation on procedures for the preparation of individuals, collection of blood, and handling and storage of specimens. Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 1993;53:649-652.
- Daviss B. Growing pains for metabolomics. The Scientist 2005;19:25-28.
- Young D. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. Washington, DC: AACC Press, 1993.
- Banks R. Preanalytical influences in clinical proteomic studies: raising awareness of fundamental issues in sample banking. Clin Chem 2008 54:6-7.
- Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. Clin Chem Lab Med 2009;47:724-744.

Renin-angiotensinsystemet – en uppdatering

FREJ FYHRQUIST OCH OUTI SAIJONMAA

Renin-angiotensinsystemet (RA) är av central betydelse för regleringen av hela kroppens vätskebalans och blodtryck men också för den lokala regleringen av funktioner i flera organ och vävnader, t.ex. blodkärl, njurar, hjärta och hjärna. Läkemedel med hämmande verkan på renin-angiotensinsystemet – här kallat RA-systemet – har visat sig effektiva både vid prevention och behandling av kardiovaskulära sjukdomar, främst hypertension och hjärtsvikt, vilket har understrukt RA-systemets patofysiologiska roll vid dessa tillstånd. Detta är relativt väl känt, medan de nyaste forskningsrönen om RA-systemets nyupptäckta komponenter och deras funktioner är relativt okända. Detta gäller negativa, proinflammatoriska effekter, såsom induktion av oxidativ stress, hypertrofi och fibros, men också positiva verkningar, t.ex. vasodilaterande och antihypertrofiska. Den uppdaterade bilden av systemet är synnerligen komplex och dess mångfasetterade funktioner är delvis outredda. Nya lovande molekyler utvecklas med sikte på ytterligare förbättring av våra terapeutiska möjligheter genom modulering av RA-systemets funktioner.

Inledning

Robert Tigerstedt, sedermera medlem av och ordförande för Finska Läkaresällskapet, beskrev 1898 en blodtryckshöjande substans extraherad ur kaninnjure och kallade denna substans renin (1). Han rapporterade helt korrekt, att renin är ett protein och antog att renin är av betydelse för blodtryckets reglering och hjärthypertrofi, vilket senare visade sig vara riktigt. På den tiden fanns inte de protein-kemiska och molekylbiologiska metoder som har möjliggjort identifieringen och karakteriseringen av komponenterna i det komplexa renin-angiotensinsystem som vi i dag känner till det över 110 år senare. Läkemedel som blockerar RA-systemet, först *ACE-hämmare*, sedan *angiotensinreceptorblockerare* har spelat en viktig roll vid behandling av hypertension och hjärtsvikt, de har även visat sig effektiva vid prevention av hjärt- och kärlsjukdomar. Nyligen har även *reninhämmare* visat sig sänka blodtrycket, men än så länge saknas uppgifter om deras preventiva effekt. Fortfarande upptäcks nya funktioner och aspekter av RA-systemet.

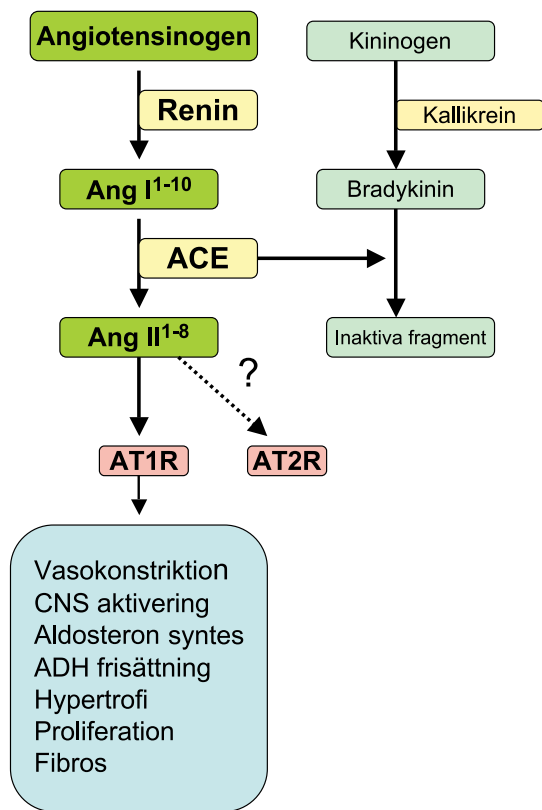
Angiotensin(er)

Inte förrän sent på 1930-talet, nära 40 år efter upptäckten av reninet, kom forskningen på renin-angiotensin i gång på allvar. Två forskargrupper, en i Argentina och en i USA, visade att renin inte har direkt vasokonstriktiv effekt utan enzymatiskt spjälkar en vasokonstriktiv decapeptid från ett postulerat substrat, angiotensinogen (som identifierades långt senare).

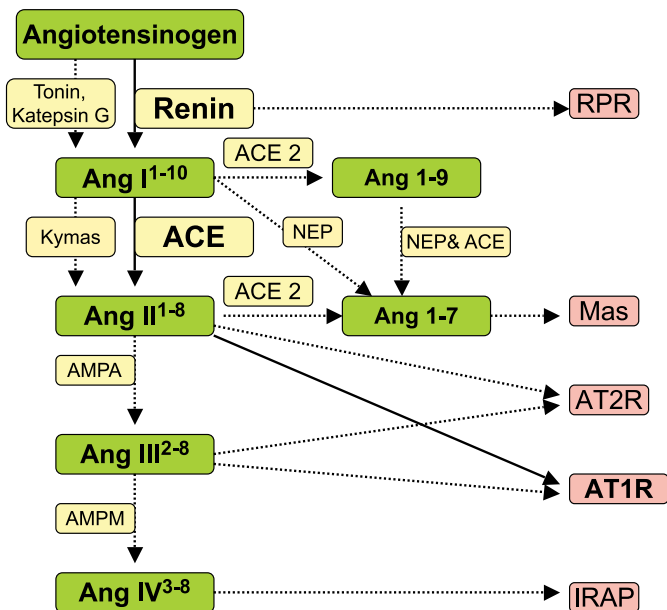
FÖRFATTARNA

MKD **Frej Fyhrquist** är professor emeritus och specialist i invärtesmedicin. Han har forskat i renin-angiotensinsystemet och vasoaktiva peptider vid Minerva och i USA.

FD **Outi Saijonmaa** är docent i experimentell endokrinologi vid Helsingfors universitet. Hon har forskat i renin-angiotensinsystemet, endotelin och andra vasoaktiva peptider vid Minerva.



Figur 1.
Ett förenklat schema över det "klassiska" renin-angiotensinsystemet och dess samband med kallikrein-kininsystemet. Kliniskt obevisad relevans anges med streckad pil och frågetecken. CNS = Det centrala sympatiska nervsystemet (Modifierat från ref. 2, med tillstånd).



Figur 2.
Den nuvarande uppfattningen om RA-systemet. Observera att endast heldragen pil anger kliniskt väl dokumenterad effekt, medan streckad pil anger verkningar som härletts ur experimentell forskning men ännu inte verifierats kliniskt. (Modifierat från ref 2, med tillstånd)

De argentinska forskarna kallade denna peptid *angiotonin*, medan den amerikanska gruppen benämnde den *hypertensin*; man enades till slut om en kompromiss, *angiotensin*.

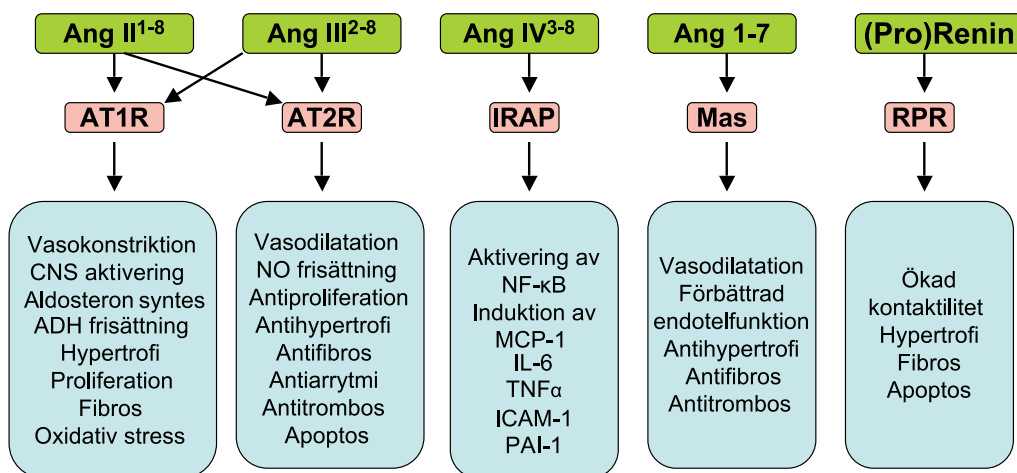
Det "klassiska" renin-angiotensinsystemet

Intensiv forskning ledde till fördjupade insikter om RA-systemet, och i början av 1970-talet hade bilden av det "klassiska" renin-angiotensinsystemet (Figur 1) tagit form. Man ansåg att dess komponenter främst finns i blodomloppet och att dess verkningar huvudsakligen medieras av angiotensin typ 1-receptorn (AT1R). Det hade klarlagts att renin bildar en biologiskt inaktiv decapeptid, angiotensin 1, från vilken angiotensinkonvertas (ACE) därefter spjälkar två aminosyror, vilket resulterar i oktapeptiden angiotensin II (Ang II), som

fortfarande anses vara den viktigaste mediatoren av RA-systemets verkningar. Betydelsen av angiotensin typ 2-receptorn (AT2R), som medierar motsatta effekter jämfört med AT1-receptorn, är ännu oklar.

RA-systemet uppdaterat

Vår uppfattning om RA-systemet har diversifierats (2) och blivit långt mer komplex än på 1970-talet (Figur 2). Nya komponenter som identifierats är bl.a. heptapeptiderna angiotensin III (Ang III) och angiotensin 1-7, samt hexapeptiden angiotensin IV (Ang IV), och enzymet ACE2. Dessutom har man identifierat och karakteriserat "nya" receptorer: renin/prorenin-, mas-, och IRAP-receptorn (Figur 2) och beskrivit talrika biologiska verkningar medierade av dessa receptorer (Figur 3). Intensiv forskning pågår för att klarlägga



Figur 3.
Biologiska verkningar medierade av angiotensin-peptider och renin/prorenin via motsvarande receptorer (modifierat från ref. 2, med tillstånd).

den fysiologiska och kliniska betydelsen av dessa senare upptäckta renin-angiotensin-komponenter.

Efter 1970-talet har det också klarlagts att det utom det "klassiska, cirkulerande" RA-systemet finns lokala RA-system i nästan alla organ och vävnader. Även intracellulärt har RA-systemets komponenter påvisats, systemet har alltså såväl en *endokrin* och en *parakrin*, som en *intrakrin* dimension. Speciellt intressant är att flera lokala RA-system, t.ex. njurarnas, hjärnans och hjärtats, har en hög grad av autonomi.

RA-systemets många funktioner

RA-systemet intar en central position vid regleringen av blodtryck och vätskebalans. Mindre väl känd är systemets betydelse för cellproliferation, hypertrofi, fibros, oxidativ stress och inflammation bl.a. i aterosklerotiska blodkärl. RA-systemets aktiva komponenter utövar sina komplexa effekter via olika receptorer. Dessa verkningar kan vara motsatta (Figur 3), vilket kan uppfattas som en "ny" nivå (yin och yang) för en balanserad reglering av RA-systemets funktioner. Då man beaktar att de olika receptorernas uttryck vid organskada varierar från organ till organ till följd av ålder och påverkan av vissa läkemedel, blir den sammanlagda "nettoeffekten" av RA-systemet mycket svårbedömd. Resultatet av kliniska undersökningar med inhibitorer (ACE-hämmare, AT1R-blockera-

re) kan härvidlag vara av nytta till vilket vi återkommer.

Angiotensin II (Ang II) kvarstår som den kliniskt viktigaste och bäst dokumenterade peptiden inom RA-systemet. Ang II verkar via AT1- och AT2-receptorerna, som medierar principiellt motsatta verkningar (Figur 3). Ang II reglerar blodtrycket och vätskebalansen via vasokonstriktion, sympatikusstimulering, aldosteronsyntes och ökad bildning av antidiuretiskt hormon. Senare har man observerat att Ang II även stimulerar cellproliferation, hypertrofi och fibros. Ökad produktion av oxidativa radikaler leder sannolikt till accelererad inflammation och ateroskleros. Tack vare tillgången till ACE-hämmare och AT1R-blockerare har den främsta kliniska betydelsen av Ang II och dess verkningar via AT1R-receptorn blivit väl dokumenterad, medan den kliniska betydelsen av Ang III, Ang IV och de övriga receptorerna inom RA-systemet (Figur 3) ännu är oklar.

Angiotensin III (Ang III), en heptapeptid, verkar liksom Ang II via både AT1R- och AT2R-receptorerna. Vissa djurexperiment tyder på att Ang III kan spela en viktig roll i njurarna genom att inducera natriures via AT2R-receptorer (3) och genom att stimulera frisättning av ADH ur hypofysen (4).

Angiotensin IV (Ang IV) är en hexapeptid och verkar via en receptor kallad IRAP (Insulin Regulated Amino Peptidase) (5). Ang IV

orsakar renal vasodilatation, hypertrofi, och inducerar transkriptionsfaktorn NF- κ B, vilket leder till ökad syntes av proinflammatoriska faktorer såsom PAI-1, interleukin-6 och tumor necrosis factor- α (6, 7). Sannolikt har Ang IV en roll i kardiovaskulär patofysiologi.

Angiotensin 1-7 (Ang 1-7), uppkommer främst ur Ang II genom enzymatisk spjälkning via ACE2 (Figur 2). Denna heptapeptid ansågs länge vara biologiskt inaktiv. Verkningarna av Ang 1-7 är motsatta jämförda med Ang II (8-10) och medieras av mas-receptorn (Figur 3). Ang 1-7 är vasodilaterande, förbättrar endotelfunktionen och stimulerar NO-bildning samt inhiberar proliferation och fibros. Därmed kan Ang 1-7 betraktas som en positiv faktor inom kardiovaskulär patofysiologi, men de kliniska bevisen för detta saknas än så länge.

Angiotensinkonvertas (ACE eller ACE 1) är genom sin centrala position i RA-systemet (Figur 2) ett naturligt mål för utvecklandet av inhibitorer, vilket vi återkommer till. Regleringen av ACE och dess uttryck i olika vävnader och organ har studerats med intressanta resultat. Uttrycket av ACE ökar bl.a. i lungor och njurar vid behandling med ACE-hämmare (11), och i myokardiet vid hjärtinfarkt. Atorvastatin minskar ACE-uttrycket i makrofager (12). Det är oklart om dessa observationer har klinisk betydelse.

Angiotensinkonvertas 2 (ACE 2) upptäcktes år 2002 (13-15). Den viktigaste uppgiften för ACE 2 anses vara att bilda Ang 1-7 från Ang II (Figur 2). Detta intressanta "nya" enzym uttrycks rikligast i njure, hjärta, hypothalamus och stora blodkärl. ACE 2 har rapporterats vara väsentligt för hjärtats normala funktioner (16), vilket vissa forskare har betvivlat (17). ACE 2 antas reglera balansen mellan Ang 2 och Ang 1-7 i hjärta, blodkärl och njurar och anses utgöra en motvikt till Ang 2 (18, 19). Uttrycket av ACE 2 ökar i myokardiet vid hjärtinfarkt (20) och vid behandling med ACE-hämmare eller AT1R-blockerare. Dessa och liknande iakttagelser har lett till antagandet att ACE 2 har en kardiovaskulärt balanserande och skyddande funktion.

Alternativa uppkomstsätt för Ang 2 och Ang 1-7 (Figur 2) har beskrivits, men deras eventuella kliniska betydelse har inte klarlagts. Till exempel kymas kan enzymatiskt bilda Ang II från Ang I *in vitro*, men solida bevis saknas

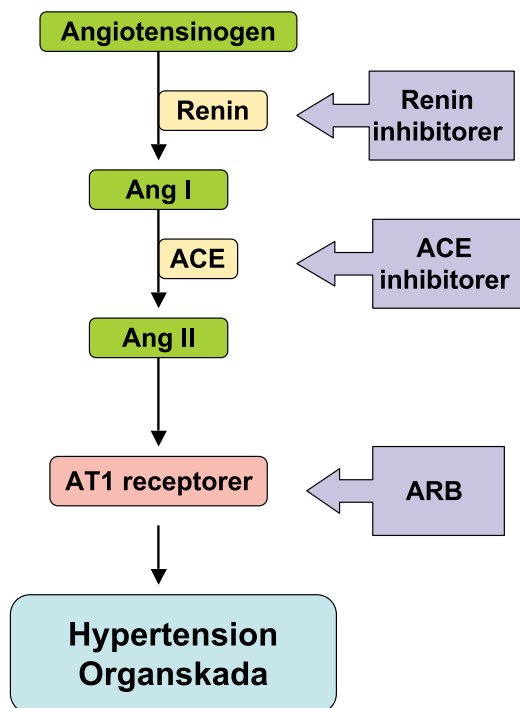
för att detta kunde ha klinisk betydelse. Ang 1-7 kan även bildas ur Ang 1 och Ang 1-9 med hjälp av neutralt endopeptidas och ACE (Figur 2).

Renin/proreninreceptorn (RPR) klonades år 2002 (21). Denna receptor binder både renin och inaktivt prorenin, som aktiveras då det binds till receptorn (22). RPR-receptorn aktiverar generna för TGF β , PAI-A, och kollagen, och befördrar inflammation och fibros. Det finns rikligt med RPR-receptorer i hjärta, hjärna och placenta, mindre mängder finns i njure, lever och visceral fettvävnad (22). RPR-receptorn anses bidra till den lokala bildningen av angiotensiner i olika vävnader.

Lokala RA-system

Lokala RA-system har identifierats i de flesta organ och vävnader (23). Dessa system innehåller alla RA-systemets komponenter, men största delen eller t.o.m. 100 procent av reninet torde härstamma från njurarna (23). Vissa lokala RA-system fungerar autonomt, t.ex. i hjärnan och binjurarna, medan andra lokala RA-system anses samverka med det cirkulerande RA-systemet (23). Lokala RA-system har lokala vävnadseffekter som omfattar reglering av proliferation, hypertrofi och organfunktion, t.ex. i njurar, hjärta, hjärna och pankreas (23, 24). Det cirkulerande RA-systemet anses närmast vara en reglerare av blodvolym, elektrolytbalans och blodtryck (23).

Aktuell forskning har speciellt intresserat sig för RA-systemen i *hjärta, hjärna och fettvävnad*. ACE 2 induceras vid *myokardiet* vid hjärtinfarkt (20), vilket leder till ökad koncentration av den protektiva peptiden Ang 1-7 i den periischemiska zonen. Också behandling av hjärtsvikt (25) med ACE-inhibitorer (26) inducerar ACE 2 i hjärtmuskel. Eventuellt förklarar detta delvis den gynnsamma effekten av ACE-inhibitorer vid dessa tillstånd. *Hjärnans* RA-system medverkar via AT1-receptorn till regleringen av blodtryck, intag av salt och vatten samt frisättning av antidiuretiskt hormon (27), medan AT2-receptorn medierar regeneration av nervceller (28). Ang II, III, IV och Ang 1-7 anses påverka vissa centralnervösa processer, bl.a. inlärning och minne (28). *Fettvävnad* innehåller också alla RA-systemets komponenter. Systemet anses reglera ackumuleringen av visceralt fett, och kan spela en viktig roll i det metabola syndromets patofysiologi (29).



Figur 4.
RA-systemet kan blockeras på tre- punkter. ARB =
AT1-receptorblockerare (modifierat från ref. 2, med
tillstånd).

Mutationer

Mutationer inom RA-systemet har visat sig ha signifikanta samband med hypertension och kardiovaskulära sjukdomar (30–32), inte oväntat med tanke på systemets betydelse för hemodynamiken och cirkulationens fysiologi. Singel-nukleotid polymorfier i generna för angiotensinogen, AT1- och AT2-receptorerna, är relaterade till högt blodtryck. En mutation i AT2-receptorn visades nyligen leda till mental retardation (33) medan en mutation i RPR-receptorn leder till mental retardation och epilepsi (34). Dessa och andra observationer har avslöjat att RA-systemet är viktigt också för hjärnans utveckling och kognitiva funktioner.

Farmakologiska synpunkter

Farmakologisk inhibiton av RA-systemet blev kliniskt möjligt genom utvecklandet av den första oralt verksamma ACE-hämmaren

kaptopril (35), som för en tid blev världens mest sålda läkemedel. Kaptoprilets utvecklingshistoria från ett ormgift till läkemedel är fascinerande (35). Andra ACE-hämmare med förbättrade egenskaper utvecklades snabbt. ACE-hämmare hör nu till de mest använda blodtrycksmedicinerna i Finland. ACE-hämmarnas svaghet är biverkningarna (hosta och mycket sällan angioneurotiskt ödem). AT1-receptorblockerare kom i början av 1980-talet, först losartan, senare följt av andra "sartaner". Sartanerna har erövrat en betydande del av marknaden och ökar alltjämt sin andel. De är så gott som fria från biverkningar. År 2008 lanserades den första renin-inhibitorn (36) i Finland, också den nästan fri från biverkningar. ACE-hämmare, sartaner och renininhibitorer sänker blodtrycket lika effektivt (37). Medan både ACE-hämmare och AT1-receptorblockerare minskar kardiovaskulär morbiditet och mortalitet, finns det ännu inga kliniska bevis för detta när det gäller renininhibitorer.

ACE-hämmarnas och AT1-receptorblockerarnas gynnsamma effekter anses av en del forskare bero nästan uteslutande på blodtryckssänkning (37), medan andra anser att både ACE-hämmare och AT1-receptorblockerare har gynnsamma verkningar oberoende av blodtryck (38–41). Speciellt hos patienter med diabetes har dessa läkemedel klart renoprotektiva effekter som inte helt kan förklaras med en sänkning av blodtrycket (42, 43). Det har också visats att ACE-hämmare och AT1-receptorblockerare minskar risken för ny diabetes jämfört med andra blodtrycksmediciner (15, 40). Mekanismerna bakom denna iakttagelse har inte ännu helt förklarats, men gynnsamma effekter på insulinfrisättning, insulinresistens, muskelgenomblödning, kalium- och magnesiumbalans samt minskad uppkomst av oxidativa radikaler har föreslagits (43).

Utom minskad risk för utveckling av diabetes har AT1-receptorblockerare visat sig förhindra slaganfall (stroke) bättre än betablockerare (15). Detta har förklarats med att AT1-receptorblockerare sänker det centrala blodtrycket betydligt mera än betablockerare (44), men också andra gynnsamma effekter av AT1-receptorblockad kan medverka. I LIFE-studien visades också att risken för utveckling av förmaksflimmer minskade med 33 procent hos patienter som behandlades med AT1-receptorblockerare jämfört med atenonol (45). Detta kan förklaras av att angiotensin II kan framkalla arytmier via AT1-receptorn.

Vi har här nämnt några viktiga fördelar av att behandla hypertension med ACE-hämmare eller AT1-receptorblockerare. Dessa och andra fördelar kan förklara dessa läkemedels allt starkare position bland blodtryckssänkande mediciner och en allt mer restriktiv inställning till betablockerare vid okomplicerad hypertension. Eftersom majoriteten av patienter med högt blodtryck kräver terapi med minst två läkemedel, är valet av rätt läkemedelskombination en av de hetaste frågorna inom behandlingen av hypertension. Det har varit ett axiom att ACE-blockerare eller AT1-receptorblockerare helst kombineras med diuretika. ACCOMPLISH-studien visade nyligen att en kombination med kalciumkanalblockerare kan vara ännu bättre (46).

Framtiden får utvisa om pågående forskning leder till ytterligare möjligheter att modulera RA-systemets aktivitet och förbättrad behandling av kardiovaskulära sjukdomar. Ett intressant exempel är stimulering av AT2-receptorn, som förmedlar gynnsamma verkningar (Figur 3). En sådan AT2-receptoragonist har nyligen visat sig skydda myokardiet mot apoptos och inflammation vid experimentell hjärtinfarkt (47) och kommer att genomgå klinisk prövning. Agonister för mas-receptorn (Figur 3) kan även komma ifråga, likaså blockad av renin/proreninreceptorn. Vi kan vänta oss en intressant ytterligare utveckling av våra kunskaper och terapimöjligheter relaterade till RA-systemet.

Prof. Frej Fyhrquist
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Haartmansgatan 8
00290 Helsingfors
frej.fyhrquist@helsinki.fi

Docent Outi Saijonmaa
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
outi.saijonmaa@helsinki.fi

Referenser

1. Tigerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol (Germany)* 1898; 8: 223–271.
2. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264: 224–236.
3. Padia SH, Howell NL, Siragy HM, Carey RM. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor blocked rat. *Hypertension* 2006; 47: 537–544.
4. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase

inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11968–73.

5. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 48623–6.
6. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 1995; 96: 2515–20.
7. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2728–37.
8. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47: 515–521.
9. Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* 2005; 45: 163–169.
10. Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1–7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47: 996–1002.
11. Fyhrquist F, Forslund T, Tikkanen I, Grönhagen-Riska C. Induction of angiotensin converting enzyme in rat lung with captopril (SQ14225). *Eur J Pharmacol* 1980; 67: 473.
12. Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Atorvastatin inhibits angiotensin converting enzyme induction in differentiating human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1917–21.
13. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res* 2000; 87: E1–9.
14. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 33238–43.
15. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1–7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 122–128.
16. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Koziarzdzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822–828.
17. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 2218–25.
18. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 2006; 98: 463–471.
19. Der Sarkissian S, Huentelman MJ, Stewart J, Katovich MJ, Raizada MK. ACE2: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 91: 163–198.
20. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005; 26: 369–375.
21. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417–27.
22. Nguyen G. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 129–33.
23. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747–803.
24. Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol* 2007; 580: 31–7.
25. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1–7). *Cardiovasc Res* 2007; 73: 463–469.
26. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1–7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 2005; 68: 2189–96.

27. von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 599–616.
28. Thone-Reineke C, Steckelings UM, Unger T. Angiotensin receptor blockers and cerebral protection in stroke. *J Hypertens Suppl* 2006; 24: S115–121.
29. Ernsberger P, Koletsky RJ. Metabolic actions of angiotensin receptor antagonists: PPAR-gamma agonist actions or a class effect? *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 140–145.
30. Su X, Lee L, Li X, Lv J, Hu Y, Zhan S, Cao W, Mei L, Tang YM, Wang D, Krauss RM, Taylor KD, Rotter JI, Yang H. Association between angiotensinogen, angiotensin II receptor genes, and blood pressure response to an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation* 2007; 115: 725–732.
31. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charu A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169–180.
32. Mellen PB, Herrington DM. Pharmacogenomics of blood pressure response to antihypertensive treatment. *J Hypertens* 2005; 23: 1311–25.
33. Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 2002; 296: 2401–3.
34. Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs HA, Engert S, Stevenson RE, Meindl A, Schwartz CE, Nguyen G. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1019–27.
35. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441–444.
36. Azizi M, Webb R, Nussberger J, Hollenberg NK. Renin inhibition with aliskiren: where are we now and where are we going? *J Hypertens* 2006; 24: 243–256.
37. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration, Turnbull F, Neal B, Pfeffer M, Kostis J, Algert C, Woodward M, Chalmers J, Zanchetti A, MacMahon S. Blood pressure-dependent and independent effects of agents that inhibit the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2007; 25: 951–958.
38. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 995–1003.
39. Casas JP, Chua W, Loukogeorgakis S, Vallance P, Smeeth L, Hingorani AD, MacAllister RJ. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2005; 366: 2026–33.
40. Aguilar D, Solomon SD. ACE inhibitors and angiotensin receptor antagonists and the incidence of new onset diabetes mellitus: an emerging theme. *Drugs* 2006; 66: 1169–77.
41. Krum H, Gilbert RE. Novel therapies blocking the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of hypertension and related disorders. *J Hypertens* 2007; 25: 25–35.
42. Leibovitz E, Schiffrin EL. Novel drugs targeting hypertension: renin inhibitors and beyond. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 3–8.
43. Braga MFB, Leiter LA. Role of renin-angiotensin system blockade in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2009; 104: 835–839.
44. Hirata K, Vlachopoulos C, Adji A, O'Rourke MF. Benefits from angiotensin-converting inhibitors "beyond blood pressure lowering"; beyond blood pressure or beyond the brachial artery? *J Hypertens*. 2005; 23: 551–556.
45. Wachtell K, Lehto M, Gerdtts E, Olsen MH, Horneftam B, Dahlöf B, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Nieminen MS, Devereux RB. Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 712–719.
46. Jamerson K, Weber MA, Bakris GL, Dahlöf B, Pitt B, Shi V, Hester A, Gupta J, Gatlin M, Velazquez EJ; ACCOMPLISH Trial Investigators. Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2417–28.
47. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008; 118: 2523–32. Epub 2008 Nov 24.

Hjärtats stamceller och regeneration vid hjärtskada

ILKKA TIKKANEN, PÄIVI LAKKISTO, HELI SEGERSVÄRD,
JUHA-MATTI SIREN, HANNA FORSTEN, Eeva PALOJOKI OCH MIKA LAINE

Nya forskningsresultat har visat att hjärtat, benmärgen och vissa andra vävnader innehåller stamceller eller progenitorceller som kan aktiveras för att bilda nya hjärtmuskelceller och blodkärl vid hjärtskada. Denna upptäckt öppnar en alldeles ny möjlighet för att förhindra och behandla hjärtsvikt efter hjärtinfarkt eller vid andra hjärtsjukdomar. Genom förstärkning av hjärtats egen regenerationsförmåga kan det i framtiden bli möjligt att betydligt förbättra behandlingsresultaten vid hjärtsjukdomar. Detta kan åstadkommas antingen med cellterapi där man injicerar isolerade, kardiomyogena stam/progenitorceller i hjärtcirkulationen eller direkt i hjärtmuskeln eller genom att stimulera hjärtats egna stamceller och regenerationsmekanismer. Det sistnämnda alternativet tycks för tillfället vara mer lovande eftersom effekten av direkt cellterapi på hjärtats funktion och hjärtinfarktens storlek hittills har varit begränsad i kliniska studier. Fortsatt forskning behövs för att utreda regleringen av hjärtats stamceller eller deras och andra progenitorcellers roll i regenerationen av hjärtat vid olika hjärtsjukdomar.

FÖRFATTARNA

Docent **Ilkka Tikkanen** är specialist i invärtesmedicin och nefrologi och arbetar som avdelningsöverläkare vid HUCS, Medicinska enheten. Han är ledare för Helsinki Hypertension Centre of Excellence (certified by European Society of Hypertension) och gruppchef för forskningsgruppen vid Minerva.

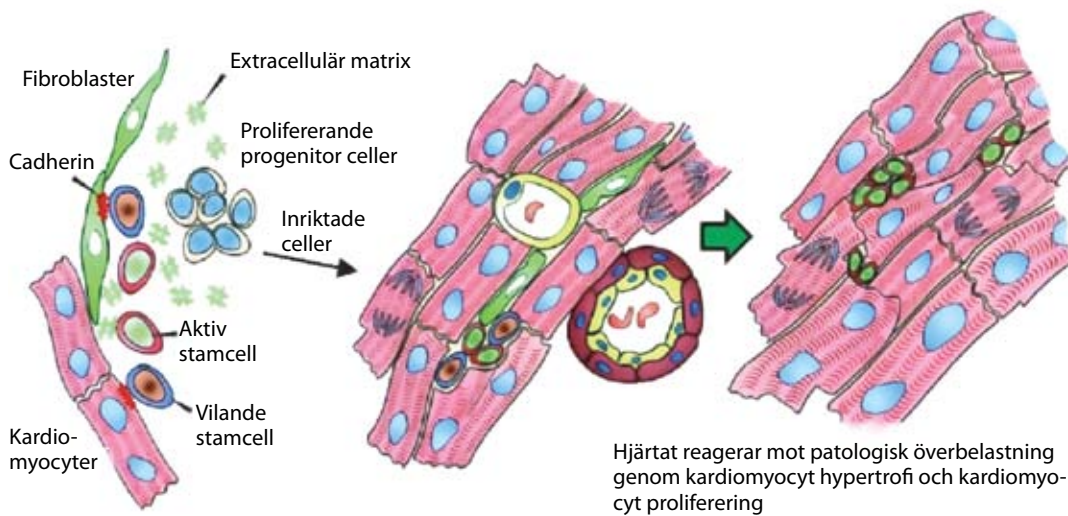
ML Päivi Lakkisto, MK Heli Segersvärd, MK Juha-Matti Siren och VML Hanna Forsten är alla forskare i Ilkka Tikkans forskningsgrupp. Till forskningsgruppen hör också MD **Eeva Palojoki** som är specialist i inre medicin och kardiologi och arbetar på kardiologiska kliniken vid HUCS samt docent **Mika Laine** som är specialist i invärtesmedicin och kardiologi och avdelningsöverläkare vid HUCS.

Inledning

Väsentliga strukturella förändringar vid utvecklingen av hjärtsvikt innehåller hjärtcellernas överväxt och ökad bildning av bindvävnad samt förlust av hjärtceller på grund av programmerad celldöd, apoptos. Dessa förändringar är typiska för fenomenet med ombyggnad (remodelling) efter hjärtinfarkt men förekommer i alla former av hjärtsvikt. Ischemisk hjärtsjukdom, hypertension med hypertrofi av hjärtat, idiopatisk dilaterande kardiomyopati, samt diabetisk kardiomyopati kan alla leda till dessa förändringar i hjärtat och till kronisk, irreversibel förlust av hjärtats funktion. Liknande förändringar ser man även i det åldrande hjärtat vid hög ålder. Nuvarande kardiovaskulära mediciner kan fördröja utvecklingen av dessa målorganskador men slutligen endast delvis förhindra morbiditet och mortalitet i hjärt- och kärlsjukdomar.

Man har tidigare ansett att hjärtceller inte kan fördelas eller förnyas efter hjärtinfarkt eller vid andra kroniska hjärtsjukdomar. Å andra sidan vet man att den apoptosinducerade förlusten av hjärtmuskelceller leder till minskningen av cellantalet om nya celler inte bildas. Man har beräknat att apoptos med en

HJÄRTAT ÄR ETT SJÄLVFÖRNYANDE ORGAN



Figur 1.

Nya forskningsresultat har visat att hjärtat innehåller stamceller som kan aktiveras för att bilda nya hjärtmuskelceller och blodkärl vid hjärtskada (1).

hastighet av 0,1–0,3 % leder till en förlust av hela hjärtat inom några år. Därför har man föreslagit att hjärtat måste innehålla en regenerationsmekanism som bildar nya hjärtceller efter hjärtskada. Nya forskningsresultat har faktiskt kunnat bevisa att det finns stamceller i hjärtat som kan aktiveras och fördelas för att bilda ny hjärtvävnad vid hjärtskadan (1, 2), (Figur 1).

Upptäckten av hjärtats egna stamceller öppnar en alldeles ny möjlighet för att förhindra och behandla hjärtsvikt efter hjärtinfarkt och vid andra kroniska hjärtsjukdomar. Genom att kombinera nuvarande behandlingsprinciper för hjärtsvikt med möjliga behandlingsmetoder för att förstärka hjärtats egen regenerationsförmåga blir det kanske möjligt att betydligt förbättra behandlingsresultat av hjärtsjukdomar i framtiden. En alternativ behandlingsmöjlighet är att tillämpa cellterapi med stamceller eller progenitorceller isolerade från vävnaden utanför hjärtat. För närvarande vet man dock alldeles för litet om regleringen av hjärtats stamceller eller deras och andra progenitorcellers roll i regenerationen av hjärtat vid olika hjärtsjukdomar (3).

Ursprunget till hjärtats stamceller

Kardiomyogena stamceller utanför hjärtat

Utöver att äkta embryonala stamceller kan bilda alla former av hjärtceller och blodkärls-celler, har man kunnat identifiera många olika stamceller som förekommer vid vuxen ålder

(adult type) och har kardiomyogen potential (4, 5). Dessa celler kan vara antingen hjärtats egna stam/progenitorceller eller celler som har ursprung utanför hjärtat i andra vävnader (non-resident), särskilt i benmärgen. Benmärgen innehåller olika cellpopulationer som har förmåga att proliferera, migrera och differentiera till hjärtmuskelceller, bindvävnadsceller, endotelceller och blodkärlens glattmuskelceller. Hematopoetiska stamceller, endotelialprogenitorceller, mesenkymala stamceller, multipotenta adulta progenitorceller och så kallade side population-celler kan alla ge upphov till celler som behövs för hjärtats regeneration och nyformation av blodkärl. Navelsträngen innehåller flera progenitorcellspopulationer inklusive hematopoetiska stamceller, mesenkymala stamceller samt endoteliala progenitorceller. Cirkulerande endoteliala progenitorceller visar också viss kardiomyogenisk potential. Nyligen har man kunnat bevisa att även fettvävnadsceller har kapacitet att förvandlas till hjärtmuskelceller och blodkärl. Vid cellterapi för hjärtskada har man ytterligare använt skelettmyoblaster som har potential för differentiering till fungerande myotuber och skelettmuskelfibrer (Figur 2).

Hjärtats egna stamceller

På grund av uttrycket av speciella stamcells-markörer i celler isolerade från hjärtat har flera forskningsgrupper kunnat demonstrera att hjärtat självt innehåller stamceller eller progenitorceller. Dessutom kan dessa celler

aktiveras för att proliferera och bilda nya hjärtmuskelceller och blodkärlsceller (1, 4, 5). Fyra av hjärtats olika stamcells- eller progenitorcellspopulationer har isolerats: 1) c-Kit-celler (the receptor tyrosinekinase-c-Kit), 2) Sca-1-celler (stem cell antigen-1) 3) side population-celler, och 4) Isl-1-celler. Skeptiska forskare har dock kritiserat dessa fynd för att vara artificiella på grund av cellfusion eller t.ex. dedifferentiering av hjärtmuskelceller beroende på experimentförhållandena. Man har också påstått att även hjärtats "egna" stamceller ändå kan ha sitt ursprung utanför hjärtat.

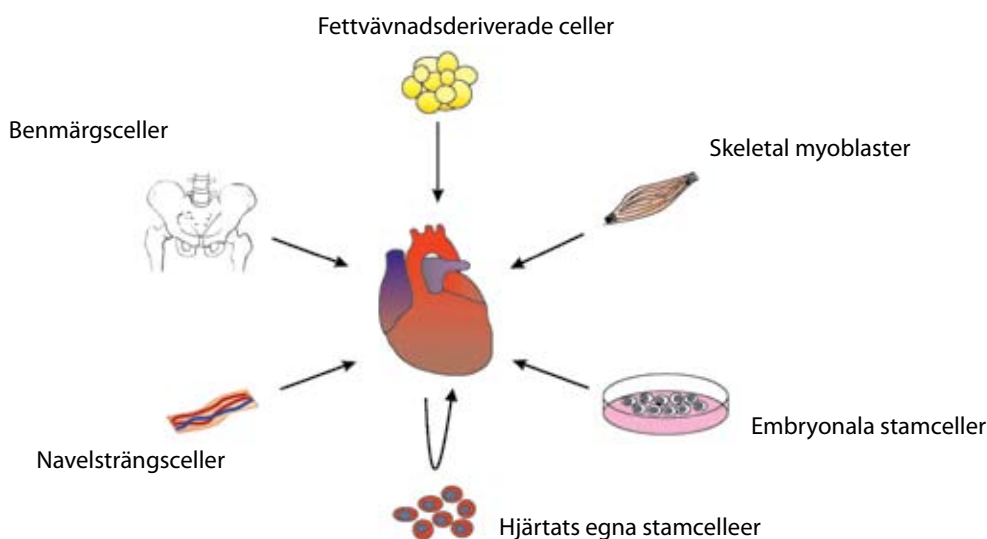
Cellterapi vid hjärtskada

Experimentella studier har visat att cellterapi med kardiomyogena celler kan förbättra hjärtperfusion och hjärtats kontraktilitet (6, 7). Det finns flera olika möjligheter för cellterapi att kunna påverka hjärtats funktion och struktur (Figur 3). Stam- eller progenitorceller kan transdifferentieras till hjärtmuskelceller, endoteliala celler och glattmuskelceller samt bilda nya blodkärl och fungerande ny hjärtmuskel (4, 7). En annan mekanism skulle vara fusion med existerande hjärtmuskelceller eller blodkärlsceller. Under både experimentella och kliniska förhållanden bevaras endast ett fåtal av de injekterade stamcellerna, och största delen införlivas- inte i hjärtvävnaden på lång sikt. Man har därför föreslagit att effekten av cellterapi på hjärtats struktur och funktion

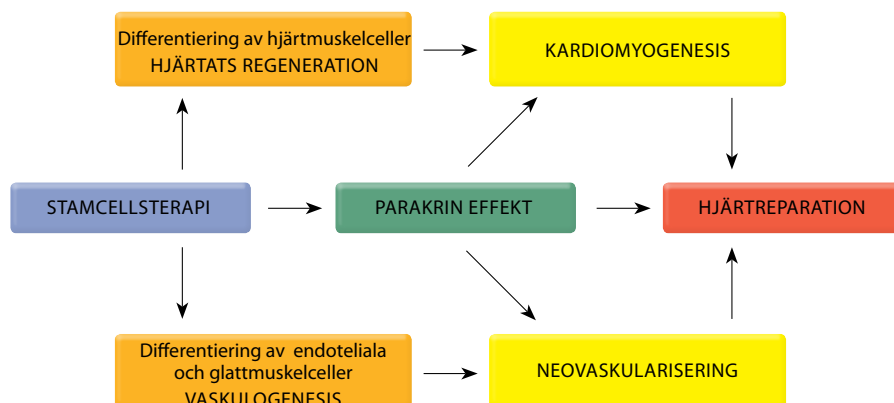
till största delen beror på parakrina mekanismer genom sekretionen av proangiogena cytokiner eller mobiliseringen av hjärtats egna stamceller eller aktiveringen av andra regenerationsmekanismer (4, 7, 8). Å andra sidan kan cellterapi förhindra det negativa fenomenet med remodelling efter hjärtskada genom att förhindra hypertrofi och ofördelaktig ärrbildning.

Olika celltyper inklusive benmärgsceller, skelettamyoblaster, hjärtats egna progenitorceller, fettvävnadsceller, navelsträngsceller och embryonala stamceller har prövats för hjärtreparation både experimentellt och i kliniska studier. Vid kliniska studier kan cellterapi ges intravenöst, genom intrakoronär infusion eller genom direkt injektion i hjärtmuskeln (4, 7).

I kliniska undersökningar tycks cellterapi med benmärgsceller vara trygg både på kort och på lång sikt. Transplantation av skelettamyoblaster har varit associerad med en ökad risk för biverkningar i form av ventrikulära rytmstörningar, som ventrikulär takykardi. Funktionella resultat av kliniska celltransplantationsundersökningar har däremot varit en besvikelse. Effekten på hjärtats funktion eller hjärtinfarktens storlek efter hjärtinfarkt i olika kliniska serier har varit kliniskt obetydlig eller ytterst bristfällig (7). Orsaken för misslyckade resultat kan vara antingen att antalet celler som använts för celltransplantation redan teoretiskt sett har varit för litet eller att cellernas överlevnad i ett ischemiskt



Figur 2. Ursprunget till celler som har använts för hjärtregeneration (7).



Figur 3. Möjliga mekanismer som förklarar hur cellterapi kan åstadkomma hjärtats regeneration efter hjärtskada (8).

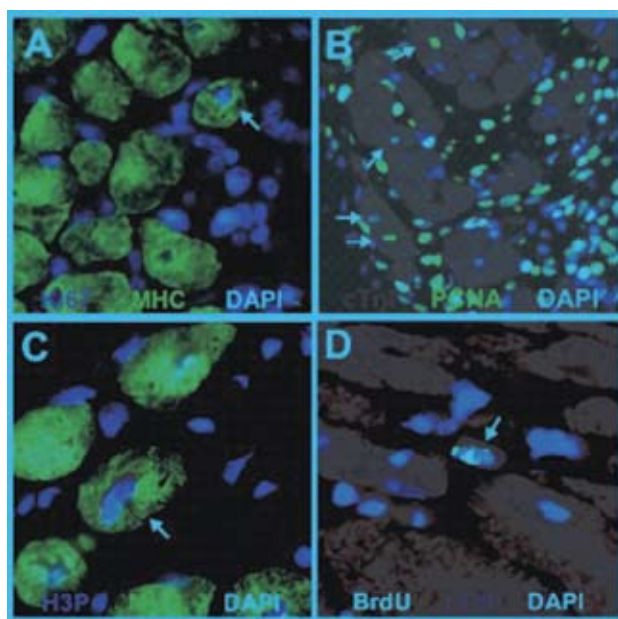
område i hjärtat har blivit omöjligt eller alltför kort för att åstadkomma ny muskelvävnad och nya blodkärl.

Förstärkning av hjärtats endogena regenerationsförmåga

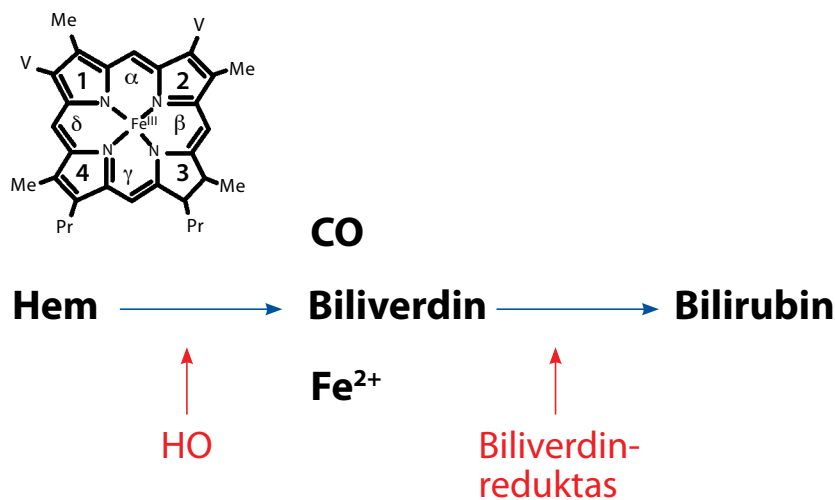
Eftersom effekten av exogen cellterapi har varit mer eller mindre begränsad, har man föreslagit en alternativ strategi som baserar sig på att förstärka hjärtats egen regenerationsförmåga (1). Man har kunnat visa att vissa tillväxtfaktorer (framför allt HGF, hepatocyt-tillväxtfaktorn; och IGF-1, insulinliknande tillväxtfaktorn-1) stimulerar mobiliseringen och proliferationen av hjärtats progenitorcel-

ler (9). Genom att behandla hjärtats stamceller med HGF och IGF-1 har man lyckats åstadkomma regeneration av hjärtskada efter experimentell hjärtinfarkt. Nygenererat, fungerande myokardium i stället för ärrbildning kunde påvisas i kombination med förbättrad hjärtfunktion (5, 9).

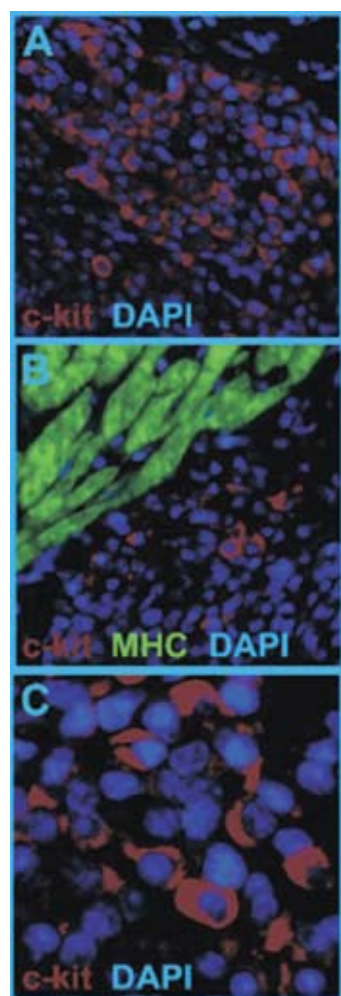
Man vet att stamcellerna själva utsöndrar flera olika cytokiner och andra parakrina och angiogena faktorer (4, 5, 8). Dessa cytokiner och tillväxtfaktorer kan inducera cellprotektion och regeneration samt neovaskularisering. Deras roll i regleringen av stamcellssignalering, differentiering och mobilisering tycks vara komplex, vilket man bara preliminärt har börjat förstå. Stamcel-



Figur 4. Hjärtats regeneration efter experimentell hjärtinfarkt. Hjärtmuskelceller, som uttrycker de hjärtmuskelcellsspecifika antigenerna MHC eller cTnI, uttrycker också proliferationsmarkörerna Ki67 (A) eller PCNA (B). C: En hjärtmuskelcell i mitos (HistH3P+). D: BrdU-positivitet användes för att märka nya, nyligen uppkomna hjärtceller efter hjärtinfarkt (14).



Figur 5.
Hemoxygenas (HO)-1 och biologiska aktiva molekyler som bildas genom nedbrytningen av hem.



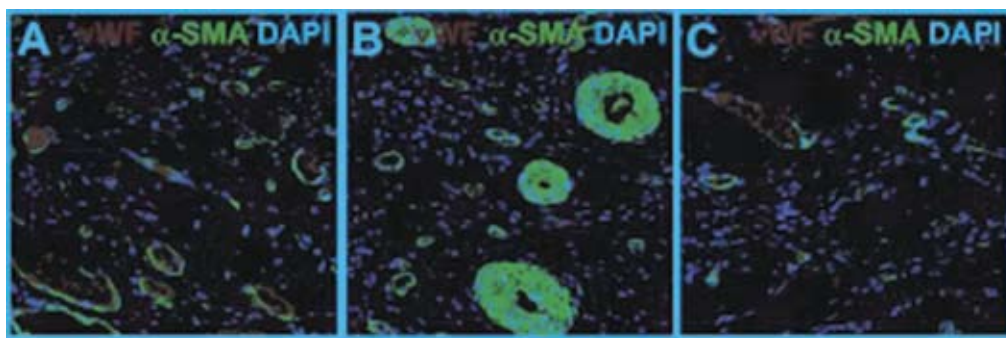
Figur 6.
Ackumulering av C-kit-positiva stamceller i infarktområdet (10).

ler och deras parakrina faktorer kan även påverka fenomenet remodelling i hjärtat, kontraktilitet och hjärtmetabolism. Å andra sidan vet man alldeles för litet om hur andra regleringsmekanismer och faktorer påverkar hjärtats stamcellsfunction.

Egna studier. I våra egna studier har vi också kunnat bevisa att nybildning av hjärtmuskelceller definitivt ökar efter experimentell hjärtinfarkt och att denna process kan påverkas genom olika interventioner (10). (Figur 4).

En intressant ny mekanism som gäller hjärtats regeneration och cellprotektion i detta sammanhang är axeln hemoxygenas-1-kolmonoxid (HO-1-CO). Man har kunnat bevisa att HO-1 fungerar som en endogen skyddsmekanism i olika stressituationer. HO-1 har antioxidativa, antiapoptotiska, antiinflammatoriska och antiproliferativa egenskaper genom nedbrytningen av prooxidativ hem och produktionen av biologiskt aktiva molekyler, biliverdin och CO (11, 12), (Figur 5). HO-1 och CO deltar också i regleringen av angiogenes (13).

Vi har tidigare kunnat påvisa att HO-1 (mRNA, protein) induceras efter akut hjärtinfarkt (14). Våra nya forskningsresultat antyder att HO-1-förmedlade skyddsmekanismer påverkar inte bara antiapoptotiskt utan även ökar nybildningen av hjärtceller och blodkärl i det ischemiska området i hjärtat efter hjärtinfarkt. En del av dessa skyddseffekter tycks vara CO-beroende, eftersom behandling med en CO-donator (metylenklorid) verkade synnerligen stimulerande på antalet stamceller i



Figur 7. Induktion av hemoxygenas-1 med CoPP-behandling ökar angiogenes (A), medan behandling med en CO-donator stimulerar nybildningen av större blodkärl (B) efter hjärtinfarkt i råtta. C: Obehandlade kontrollinfarktgruppen (10).

hjärtat (Figur 6) och deras differentiering till hjärtmuskelceller och blodkärl i infarktområdet (Figur 7). Samtidigt ökade genuttrycket av tillväxtfaktorn VEGF (vascular endothelial growth factor) och SDF-1 (stromal cell derived factor 1), vilket står i samklang med den centrala roll dessa faktorer har i aktiveringen av stamceller och regleringen av angiogenes (10).

Till slut

Stamcellsforskningen har blivit ett av kärnområdena inom kardiovaskulär medicin i hela världen. I fortsättningen blir det aktuellt att ytterligare undersöka regleringen av hjärtats stamcellsfunktion och deras roll i regenerationen vid hjärtskada och i utvecklingen av kronisk hjärtsvikt vid olika hjärtsjukdomar. Prognosen vid svår systolisk hjärtsvikt är dålig trots effektiv behandling med nuvarande kardiovaskulära läkemedel. Genom förstärkning av hjärtats egen regenerationsförmåga blir det kanske möjligt att i framtiden åstadkomma betydligt bättre behandlingsresultat vid hjärtsjukdomar.

Docent Ilkka Tikkanen
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
ilkka.tikkanen@hus.fi

Referenser

1. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells. A paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006;113:1415–63.
2. Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature Medicine* 2007;13:970–974.
3. Kajstura J, Urbanek K, Rota M, Bearzi C, Hosoda T, Bolli R, Anversa P, Leri A. Cardiac stem cells and myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:505–513.
4. Perino MG, Yamanaka S, Li J, Wobus AM, Boheler KR. Cardiomyogenic stem and progenitor cell plasticity and the dissection of cardiopoiesis. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:475–494.
5. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ Res* 2008;102:1155–68.
6. Rota M, Padin-Iruegas E, Misao Y, De Angelis A, Maestroni S, Ferreira-Martins J, Fiumana E, Rastaldo R, Arcarese ML, Mitchell TS, Boni A, Bolli R, Urbanek K, Hosoda T, Anversa P, Leri A, Kajstura J. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescue scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res* 2008;103:107–116.
7. Beeres SLMA, Atsma DE, van Ramshorst J, Schali J, Bax JJ. Cell therapy for ischaemic heart disease. *Heart* 2008;94:1214–26.
8. Gnechchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204–19.
9. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, Nurzynska D, Torella D, Rotatori F, Rastaldo R, Musso E, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that following activation regenerate the infarcted myocardium improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005;97:663–673.
10. Lakkisto P, Kytö V, Forsten H, Siren J-M, Segersvärd H, Voipio-Pulkki L-M, Laine M, Pulkki K, Tikkanen I. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide promote cardiac neovascularization after myocardial infarction by modulating the expression of Hif-1 α , SDF-1 α and VEGF-B. Submitted.
11. Ndisang JF, Tabien HE, Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens* 2004;22:1057–74.
12. Otterbein LE. The evolution of carbon monoxide into medicine. *Respir Care* 2009;54:925–932.
13. Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* 2008;117: 231–241.
14. Lakkisto P, Palojoki E, Bäcklund T, Saraste A, Tikkanen I, Voipio-Pulkki LM, Pulkki K. Expression of heme oxygenase-1 in response to myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2002 ;34:1357–65.

Sfingosinfosfat och cellsignalering

NINA BERGELIN OCH KID TÖRNQUIST

Sfingomyelin förekommer i cellmembranet hos alla eukaryotiska celler. Längre antog man att dess funktion närmast var strukturell. De senaste femton åren har vi dock kunnat ta del av ett enormt uppsving i intresset för denna lipid. Speciellt har forskning rörande metaboliterna ceramid, sfingosin och sfingosinfosfat (S1P) visat att dessa utgör synnerligen viktiga intracellulära och extracellulära signalmolekyler. Ceramid och sfingosin har närmast visat sig inhibera cellers proliferation och delta i initieringen av programmerad celldöd (apoptos). Flera olika typer av jonkanaler blockeras också av dessa metaboliter. Effekten av S1P är däremot den diametralt motsatta, och S1P anses allmänt vara en molekyl som stimulerar överlevnad, proliferation och migration. Dessutom är S1P en effektiv reglerare av cellernas kalciumhomeostas. Då dessa metaboliter på ett så markant sätt påverkar cellernas funktion, har de även väckt mycket intresse som mål för läkemedelsutveckling.

Inledning

Sfingomyelin bildas i cellerna genom *de novo*-syntes i det endoplasmatiska nätverket utgående från serin och palmitat med hjälp av flera transferaser, reduktaser och syntaser (1). En viktig mellanprodukt är ceramid, som också kan hydrolyseras till sfingosin med hjälp av ett ceramidase. Sfingomyelin hydrolyseras till ceramid med hjälp av flera olika sfingomyelinaser. Metaboliterna ceramid, sfingosin och sfingosinfosfat (S1P) är mycket bioaktiva lipider som påverkar så gott som alla celler i organismen (1, 2). S1P, som bildas genom att sfingosinkinaser fosforylerar sfingosin, stimulerar cellernas proliferation och modulerar mångsidigt cellers kalciumhomeostas. Förutom detta kan S1P reglera bl. a. neuritretrektion, hjärtats embryonalutveckling samt stimulera angiogenes. Vid ischemi har S1P också en markant kardioprotektiv effekt. Dessutom kan S1P antingen stimulera eller inhibera cellers migration.

S1P utsöndras från trombocyter och erytrocyter till cirkulationen där det binds till albumin och HDL. Utsöndrat S1P uppnår fysiologiskt relevanta koncentrationer i blodet, vilka överskrider EC_{50} -värdena för S1P-receptorerna. De flesta effekterna av S1P medieras troligtvis via aktivering av G-protein-kopplade receptorer. Fem receptorer för S1P (S1P₁₋₅) har klonats (2). Receptorerna

kopplar till olika typer av G-protein (G_{q/11}, G_i eller G_{12/13}), och olika receptorer har en klar preferens för vissa typer av G-protein. Receptor-G-proteinkomplexet kan sedan aktivera olika effektorer i cellerna och leda till t. ex. aktivering av mitogenaktiverande proteinkinaser (MAP-ERK1/2-kinaser) eller inhibering av stress-aktiverade kinaser. Receptorerna kan via aktivering av fosfolipase C och produktionen av inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) mobilisera intracellulärt bundet kalcium

FÖRFATTARNA

FM **Nina Bergelin** är doktorand vid Turku Graduate School of Biomedical Sciences och vid Åbo Akademi (cellbiologi). Hennes forskning berör betydelsen av sfingolipiders signalering i sköldkörtelcancer, och hon sammanställer för tillfället sin doktorsavhandling vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva.

FD **Kid Törnquist** är professor i fysiologi (cellbiologi) vid Åbo Akademi. Hans forskargrupp undersöker främst cellers kalciumreglering och betydelsen av sfingolipider vid sköldkörtelcancer. Han är verksam både vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva och vid Åbo Akademi.

(2). Receptorerna kan även aktivera små GTPaser. Flera olika S1P-receptorer uttrycks ofta i samma cell, och stimuleringens slutresultat beror på vilka receptorer som uttrycks och vilka G-proteiner som finns i cellerna. Situationen kompliceras av att man även har identifierat även intracellulära effekter av S1P, om än förekomsten av en intracellulär receptor för S1P inte är påvisad. Eftersom de flesta celltyperna i organismen uttrycker receptorer för S1P, är denna metabolit en betydelsefull reglerare av cellernas funktion. Detta antagande stöds även av de resultat som erhållits från S1P-receptor "knock-out" möss: avsaknad av receptorer (eller kombinationer av receptorer) leder till grava störningar i embryogenesen och kan vara embryonalt letala (2). Likaså är "knock-out" av sfingosinkinas embryonalt letal (3).

De två andra metaboliterna, ceramid och sfingosin, inhiberar vanligen cellernas proliferation och medverkar ofta vid initieringen av apoptos. I vissa celltyper blockerar de kaliumkanaler och kalciumkanaler (4). Ceramid har därför ansetts fungera som en endogen tumörsuppressör. Man antar att aktiviteten av sfingosinkinas tillsammans med den relativa förekomsten av ceramid, sfingosin och S1P utgör en "rheostat" i cellerna: ifall sfingosinkinaset är inaktivt, ökar mängderna av sfingosin och ceramid, proliferationen blockeras och cellerna kan bli apoptotiska. Ifall sfingosinkinas aktiveras, produceras S1P som transporteras ut från cellen och stimulerar cellerna, tillväxer och prolifererar. Eventuellt fungerar S1P som en intracellulär budbärarmolekyl, men de flesta effekterna uppstår då S1P transporteras ut från cellen och stimulerar celler via en autokrin eller parakrin mekanism (5).

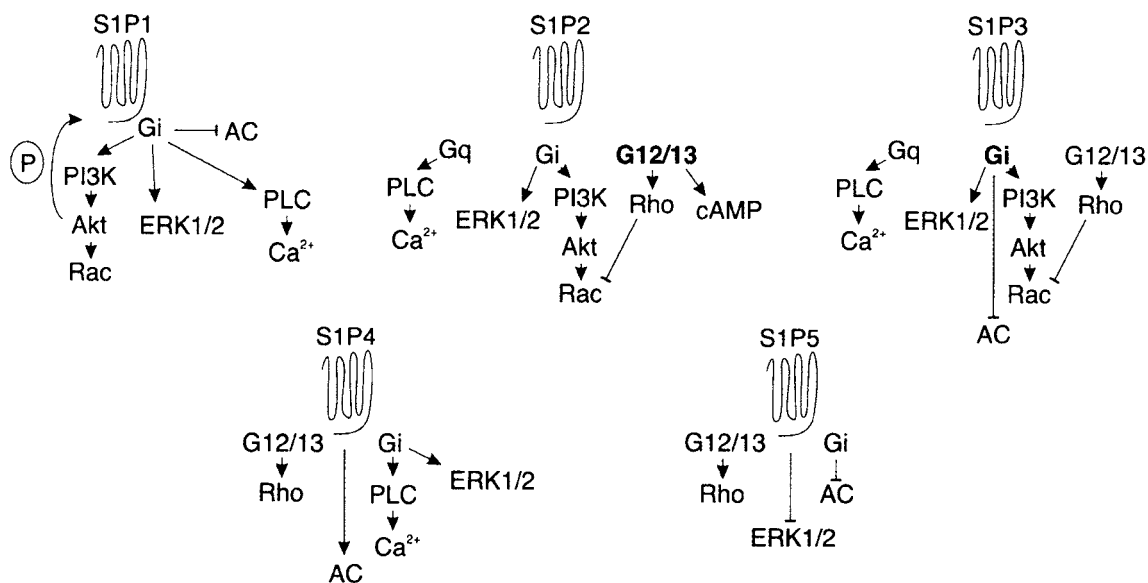
Sfingosinfosfat som intracellulär budbärarmolekyl

Flera studier tyder på att S1P kan fungera som en intracellulär budbärare (6, 7). Normalt är koncentrationen av intracellulärt S1P låg i cellerna. Troligen uttrycker alla celltyper sfingosinkinas och enzymet aktiveras av flera mitogener (t.ex. VEGF och PDGF) och G-protein-kopplade receptorer. Aktiveringen ger upphov till en snabb ökning i intracellulärt S1P, som sedan kan frigöra kalcium från det endoplasmatiske nätverket eller stimulera cellernas proliferation. Cellerna uttrycker också ett S1P-fosfat och ett S1P-lyas, som

nedbryter S1P. Dessa enzymer gör att produktionen av S1P vid stimulering enbart är transient (så som det bör vara för en budbärarmolekyl) (2). Två isoformer av sfingosinkinas har klonats och den mera undersökta isoformen (sfingosinkinas-I, SKI) aktiveras via en kalcium-kalmodulin- och protein kinas C-beroende mekanism. Den SKI-inducerade produktionen av S1P har visat sig betydelsefull för regleringen av cellernas proliferation och för inhiberingen av apoptos. SKII har en diametralt motsatt effekt till SKI, emedan den inducerar apoptos då den överuttrycks (se (1)). Mycket tyder på att SKI är av stor betydelse för cellernas kalciumhomeostas och proliferation, och att detta eventuellt regleras via en intracellulär effekt.

Sfingosinfosfat och regleringen av intracellulärt fritt kalcium

Många undersökningar har visat att flera G-proteinkopplade receptorer ökar intracellulärt S1P genom att aktivera sfingosinkinas och att detta S1P mobiliserar kalcium från intracellulära förråd (2). En ökning i intracellulärt fritt kalcium erhöles också då S1P mikroinjicerades i celler. Mekanismen för hur S1P frigör kalcium från intracellulära förråd i det endoplasmatiske nätverket (ER) är för tillfället okänt, men eventuellt samverkar S1P med IP_3 (8). Intracellulärt S1P har visats aktivera inflöde av kalcium över plasmamembranen genom att fungera som en kalcium-influxfaktor (9). Detta är intressant emedan sfingosin, prekursor till S1P, inhiberar de s.k. CRAC-kanalerna (calcium release-activated channels); (10)). Mycket tyder alltså på att S1P kan vara en del av en komplex signal-kaskad som reglerar cellers fria intracellulära kalciumnivå, antingen genom att mobilisera bundet kalcium från ER eller genom att öka inflödet över plasmamembranen. I denna reglering har sfingosinkinas troligen en viktig roll. I vaskulära glatta muskelceller kan S1P däremot aktivera TRPC5-kanalen (en icke-selektiv katjonkanal hörande till TRP-superfamiljen av jonkanaler) via aktivering av en G-proteinkopplad receptor (11). Denna aktivering är nödvändig för cellernas motilitet. Mycket tyder också på att inflöde av kalcium via TRPC-jonkanaler reglerar icke-exciterbara cellers motilitet. Dessa observationer är av klinisk betydelse då flera TRPC-kanaler är överuttryckta i cancerceller. Vi har också resultat som tyder på att S1P kan aktivera



Figur 1.
Schematisk framställning av sfingosinfosfat-inducerad signalering via sina olika receptorer. Då de flesta celler uttrycker flera olika receptorer för sfingosinfosfat, blir signaleringsmönstret i cellerna mycket komplicerat. I cancer-celler uttrycks ofta S1P1 och S1P3 starkt, vilket ökar sannolikheten för cellmigration och metastasering.

en medlem av TRPC-familjen av jonkanaler i sköldkörtelceller via en autokrin receptor-reglerad mekanism (12). Denna aktivering är troligen betydelsefull för produktionen av sköldkörtelhormon (Figur 1).

I exciterbara celler, så som myocyter och hypofysceller, inhiberar sfingosin spännings-reglerade kalciumkanaler (13, 14) och ger i myocyter upphov till en negativ inotrop effekt. Sfingosin förlänger den tid kanalerna hålls stängda via en effekt som är beroende av intracellulärt kalcium (alltså någon form av återkoppling mellan intracellulärt fritt kalcium och kanalproteinet) (14). Vi har också visat, att då vi uttrycker ett inaktivt SKI i GH₄C₁-hypofysceller, minskas inflödet av kalcium via spänningsreglerade kalciumkanaler (15). Det har visats att sfingosin inhiberar ryonodinreceptorer i exciterbara celler (16). Därtill kan både ceramid och sfingosin blockera natrium-kalcium utbytarproteinet, och ceramid inducera en internalisering och inaktivering av HERG-kaliumkanaler (17). Sammanfattningsvis tyder resultaten på att aktiviteten av sfingosinkinas är av största betydelse för regleringen av cellernas exciterbarhet, och då det gäller t.ex. myocyter, deras kontraktionsförmåga. Detta kan vara av betydelse vid olika patologiska tillstånd. Till exempel har man visat att mängden ceramid ökar i myocyter vid

ischemi, vilket i sin tur kraftigt kan modulera både kalium- och kalciumkanalers funktion. En intressant observation är att S1P har visat sig ha en markant kardioprotektiv effekt vid ischemi. Denna effekt är troligen följden av en autokrin- eller parakrin signalering, då inhibering av sfingosinkinas i myocyter klart försämrar cellernas överlevnad vid ischemi både *in vitro* och *in vivo* (18).

Sfingosinfosfat och cancer

S1P påverkar uppkomsten av cancer-celler och metastasering genom att inducera centrala processer såsom tillväxt, överlevnad, adhesion, migration, samt vaskulogenes och angiogenes till tumörer. Exogent S1P kan stimulera migration via S1P₁- och S1P₃-receptorerna, medan migrationen kan inhiberas via S1P₂-receptorn (1, 5). Verkningsmekanismerna för hur S1P inducerar migration har beskrivits för S1P₁-receptorn. S1P aktiverar via S1P₁-receptorn PI3-kinas, som i sin tur rekryterar Akt till cellmembranen, där Akt aktiveras och vidare aktiverar Rho-kinaset Rac (19). Akt kan via positiv återkoppling aktivera S1P₁-receptorn, och uttrycket av Akt är ofta uppreglerat i t.ex. cancer-celler från sköldkörteln (20). S1P₃-receptorn kan även aktivera Rac via p38-MAP-kinas (21).

Signalering via S1P₂-receptorn däremot inhiberar cellernas motilitet, antingen genom att stimulera ett Rac-GTPas aktiverande protein eller genom att inhibera Akt (22). S1P-receptorer kopplar även till flera andra nedströms effektormolekyler som förknippas med migration och proliferation, t.e.x. MAP-ERK1/2-kinaskaskaden. Därtill kan S1P-signalering också reglera andra centrala processer som är involverade i migration och metastasering, såsom aktivering av matrix metalloproteinaser vilka bryter ner det extracellulära matrixet, samt aktivering av integriner (23).

I den follikulära sköldkörtelcancer cellinjen ML-1 inducerar S1P (10–100 nM) migration via S1P₁- och S1P₃-receptorerna. Motsvarande koncentrationer av S1P ökar även den kemotaktiska effekten av fetalt kalvserum. Migrationen kan inhiberas av pertussistoxin (Ptx), vilket indikerar att ett G_{i/o}-protein är involverat. S1P-inducerad migration medieras via PI3-kinas och Akt, medan S1P-inducerad migration inhiberas av Rho och ROCK. Migrationen hos ML-1-celler påverkas även av PKC α , ERK1/2 och sfingosinkinas. Däremot påverkar S1P inte migrationen av normala sköldkörtelceller (24).

Såsom tidigare nämnts upprätthålls normalt en balans mellan de pro-apoptotiska molekylerna ceramid och sfingosin, och S1P genom enzymet sfingosinkinas. Ett ökat uttryck av sfingosinkinas i MCF7 bröstcancer celler har kopplats till ökad proliferation och migration, och i NIH 3T3-celler, i vilka sfingosinkinas överuttrycks, stimuleras en snabbare övergång från G1-fasen till S-fasen i cellcykeln (25), vilket stimulerar cellproliferationen. Ökat uttryck av sfingosinkinas är också en markör för försämrad prognos vid bröstcancer (26), och sfingosinkinas har därmed klassats som en onkogen (25). Sfingosinkinas påverkar migrationen och proliferationen av ML-1 celler. I SKI-överuttryckande ML-1 celler utsöndras S1P via transportören ABCC1 och cellerna har en uppreglerad basal migration (samt en ökad basal fosforylering av ERK1/2), vilket indikerar att SKI har en central roll i progressionen av cancer (27).

Sfingosinfosfat och tillväxtfaktorer

S1P:s roll i den vaskulära utvecklingen har fastställts med hjälp av S1P₁-receptor ”knock-out”- möss (28). Eftersom den optimala tillväxten av en tumör är beroende av tillförsel av syre och näringsämnen är det av intresse att undersöka mekanismerna bakom angiogene-

sen. S1P har föreslagits delta i bildningen och mognaden av blodkärl. Kapillärer i tumörer och större blodkärl på tumörer uttrycker S1P₁-receptorn, och en optimal tillväxt av tumören är beroende av S1P₁-receptorn (29). Studier som gjorts i endotelceller och glatta muskelceller visar att S1P stimulerar proliferationen, migrationen och bildningen av blodkärl. S1P kan tillsammans med vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF) bidra till bildningen av nya blodkärl till tumörer. En samverkan mellan aktiverade S1P-receptorer och tyrosinkinaserceptorer, t.ex. VEGF-receptor-2 har föreslagits för aktiveringen av intracellulära signalkaskader (30).

Flera typer av sköldkörtelcancer cellinjer producerar VEGF. S1P har tidigare visats stimulera cellmotilitet i samverkan med PDGF (31) och i andra cellinjer i samverkan med VEGF (32). Det är därför troligt att S1P i samverkan med VEGF inducerar angiogenes vid metastasering. I ML-1-sköldkörtelcancer celler modulerar VEGF-receptor-2 uttrycket av mRNA för S1P₁- och S1P₃-receptorerna (33), vilket kan öka cellers sensitivitet för S1P-signalering. ML-1-cellerna både utsöndrar VEGF och uttrycker receptorer för VEGF, och S1P stimulerar utsöndring av VEGF-A (33) och expressionen av VEGF-receptor-2 i dessa celler (Bergelin et al., manus). Både S1P-inducerad aktivering av Akt och ERK1/2 är beroende av VEGF-receptor-2, vilket tyder på att både Akt och ERK1/2 spelar en roll i samverkan mellan receptorerna. Mycket tyder på att migrationen av sköldkörtelcancer celler regleras via ett komplext samspel mellan S1P- och VEGF-receptorer, möjligtvis via en autokrin signalering. Förutom att sköldkörtelcancer cellers migration minskar, erhålls också en minskad proliferation då VEGF-receptor-2 inhiberas.

Korsaktivering mellan S1P-receptorer och tillväxtfaktorreceptorer kan antingen ske sekventiellt eller integrativt. Sekventiell aktivering innebär att en tillväxtfaktorreceptor binder sin ligand varpå receptorn kan aktivera sfingosinkinas. Kinaset fosforylerar sfingosin till S1P som utsöndras och kan därmed aktivera S1P-receptorer och nedströmssignalering. Vid integrativ aktivering befinner sig receptorerna i ett komplex på cellmembranet och aktiveringen av nedströmssignalering initieras från komplexet, antagligen genom bidirektionell signalering, så att vardera receptorn kan aktivera den andra. Den ena mekanismen utesluter dock inte den andra, och båda formerna av korsaktivering förekommer

antagligen samtidigt i cellen (34). I ML-1 -celler bildar S1P₁-receptorn tillsammans med VEGF -receptor- 2 ett signaleringskomplex på cellmembranen. Via detta komplex regleras både aktiveringen av effektormolekyler och cellernas migration. Liksom S1P-inducerad migration och aktivering av Akt- och ERK1/2-kaskaderna är beroende av VEGF-receptor- 2, är också VEGF- A- inducerad fosforylering av ERK1/2 och migration (haptotaxis) beroende av S1P₁-receptorn. Därtill är både migrationen och fosforyleringen av ERK1/2 beroende av G_{i/o}-protein. Det är därför troligt att korsaktiveringen mellan S1P₁-receptorn och VEGF-receptor- 2 i ML-1 -celler är integrativ och bidirektionell (opublicerat rön).

Förutom ett uppreglerat uttryck av sfingosinkinas, har även ökade koncentrationer av fosfolipider i vissa cancertyper påvisats (35). Ett ökat intresse för S1P-signaleringen har därför under det senaste årtiondet resulterat i utvecklingen av inhibitorer för sfingosinkinas (35) och en antikropp som är specifik för S1P (36). Dessa har föreslagits vara kandidater för en mer specifik cancerbehandling. Trots lovande *in vitro* -resultat är sfingosinkinas-inhibitorerna fortfarande i den pre-kliniska fasen. S1P-antikroppen (ASONEP™) har däremot framskridit till fas 1 -kliniska studier. Antikroppen torde fungera genom att med hög affinitet binda det S1P som cirkulerar i blodet, vilket hindrar S1P-receptorerna från att aktiveras. Detta förväntas minska både tumörvolymen och mängden metastaserande celler, samtidigt som inga nya blodkärl kan bildas till tumören. Potentiellt kunde antikroppen även motverka S1P-stimuleringens anti-apoptotiska effekt och därmed även öka effekten av de pro-apoptotiska kemoterapeutika som normalt används vid cancerbehandling (37).

FM Nina Bergelin
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
nbergeli@abo.fi

FD Kid Törnquist
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
ktornqvi@abo.fi

Referenser

- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstein S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 2006;1758:2016–26.
- Spiegel S, Milstein S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4:397–407.
- Mizugishi K, Li C, Olivera A, Bielawski J, Bielawska A, Deng C-X, et al. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2993–3006.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 2004;4:604–616.
- Alvarez J, Milstein S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *TRENDS Endocrinol. Metab.* 2007;18:300–307.
- Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993;365:557–560.
- Choi OH, Kim J-H, Kinet J-P. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcεRI antigen receptor. *Nature* 1996;380:634–636.
- Blom T, Slotte JP, Pitson SM, Törnquist K. Enhancement of intracellular sphingosine-1-phosphate production by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium mobilisation in HEK-293 cells: Endogenous sphingosine-1-phosphate as a modulator of the calcium response. *Cell. Signal.* 2005;17:827–836.
- Itagaki K, Hauser CJ. Sphingosine 1-phosphate, a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.* 2003;278:27540–47.
- Mathes C, Fleig A, Penner R. Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J. Biol. Chem.* 1998;273:25020–30.
- Xu S-Z, Muraki K, Zeng F, Li J, Sukumar P, Shah S, et al. A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circ. Res.* 2006;98:1381–89.
- Gratschev D, Löf C, Heikkilä J, Björkbom A, Sukumaran P, Hinkkanen A, et al. Sphingosine kinase as a regulator of calcium entry through autocrine sphingosine 1-phosphate signalling in thyroid FRTL-5 cell. *Endocrinology* 2009; i tryck.
- McDonough PM, Yasui K, Betto R, Salvati G, Glembotski CC, Palade PT, et al. Control of cardiac Ca²⁺ levels. Inhibitory actions of sphingosine on Ca²⁺ transients and L-type Ca²⁺ channel conductance. *Circ. Res.* 1994;75:981–989.
- Titievsky A, Titievskaya I, Pasternack M, Kaila K, Törnquist K. Sphingosine inhibits voltage-operated calcium channels in GH4C1 pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:242–247.
- Blom T, Bergelin N, Slotte JP, Törnquist K. Sphingosine kinase regulates voltage operated calcium channels in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Cell. Signal.* 2006;18:1366–73.
- Sabbadini RA, Betto R, Teresi A, Fachechi-Cassano G, Salvati G. The effect of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J. Biol. Chem.* 1992;267:15475–84.
- Chapman H, Ramström C, Korhonen L, Laine M, Wann KT, Lindholm D, et al. Down-regulation of the HERG (KCNH2) K⁺ channel by ceramide: Evidence for ubiquitin-mediated lysosomal degradation. *J. Cell Sci.* 2005;118: 5325–34.
- Karliner JS. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009;53:189–197.
- Lee M-J, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae S-S et al. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Molecular Cell* 2001;8:693–704.
- Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Scuppert F, Burch H et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2001;61:6105–11.
- Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ et al. Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(α₁₂)-linked Rho kinase activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001;24:711–719.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H et al. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:9247–61.

22. Bayless KJ, Davis GE. Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;312:903–913.
23. Balthasar S, Samulin J, Ahlgren H, Bergelin N, Lundqvist M et al. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem. J.* 2006;398:547–556.
24. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 2000;10:1527–30.
25. Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S et al. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112:41–52.
26. Bergelin N, Blom T, Heikkilä J, Löf C, Alam C, Balthasar S et al. Sphingosine kinase as an oncogene: autocrine sphingosine 1-phosphate modulates ML-1 thyroid carcinoma cell migration by a mechanism dependent on protein kinase C- α and ERK1/2. *Endocrinology.* 2009;150:2055–63.
27. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 2000;106:951–961.
28. Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest.* 2004;114:1082–89.
29. Igarashi J, Erwin PA, Dantas APV, Chen H, Michel T. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003;100:10664–69.
30. Hobson JP, Rosenfeldt HM, Poulton S, Caron MC, Milstein S, Spiegel S. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 2001;291:1800–03.
31. Endo A, Nagashima K-I, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J. Biol. Chem.* 2002;277:23747–54.
32. Balthasar S, Bergelin N, Löf C, Vainio M, Andersson S, Törnquist K. Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells. *Endocr. Relat. Cancer.* 2008;15:521–534.
33. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidic acid and growth factor signaling and termination. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1781:467–476.
34. Westermann AM, Havik E, Postma FR, Beijnen JH, Daleo O, Moolenaar WH et al. Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann Oncol.* 1998;9:437–442.
35. French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;318:596–603.
36. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* 2006;3:225–238.
37. O'Brien N, Jones ST, Williams DG, Cunningham HB, Moreno K, Visentin B et al. Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies. *J Lipid Res.* i tryck.

Fettlever vid metabola syndromet och typ 2-diabetes

ANNA KOTRONEN, ROBERT BERGHOLM OCH HANNELE YKI-JÄRVINEN

Överviktsepidemin har lett till ökad förekomst av metabola syndromet och typ 2-diabetes. Det är dock mindre känt att den icke ej alkoholutlösta fettlevern (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), som hör ihop med metabola syndromet (insulinresistensen) är den vanligaste formen av fettlever. Metabola syndromet utvecklas kanske inte utan en fettlever. Elva prospektiva studier har visat att fettlever predisponerar för typ 2-diabetes oberoende av övervikt. En fettlever kan inflammas och utveckla en ej alkoholrelaterad leversteatos (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), som i sin tur kan leda till cirros. I USA uppskattar man att cirros som orsakats av NAFLD blir den vanligaste orsaken till levertransplantation år 2020. Leverns fettmängd kan effektivt minskas genom viktnedgång, behandling med glitazon samt eventuellt med fettfattig diet och till någon grad med insulinbehandling. Pioglitazon ser ut att förhindra progressionen av NASH.

Kärnbudskap

- Den ej alkoholrelaterade fettlevern (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) som hör ihop med metabola syndromet (insulinresistensen) är den vanligaste orsaken till fettlever.
- Leverns fettprocent är avsevärt högre hos personer med metabola syndromet och typ 2-diabetes, oberoende av ålder, kön och kroppsvikt.
- NAFLD kan utvecklas till steatohepatit och vidare till cirros.
- En person med metabola syndromet eller typ 2-diabetes löper 3–4 gånger högre risk att utveckla en steatohepatit.
- Om en NAFLD-patient visar tecken på fibrosförändringar i levern bör patienten remitteras till en gastroenterolog.

Inledning

Flera epidemiologiska studier har visat att risken för hjärt- och kärlsjukdomar är förhöjd speciellt hos överviktiga personer som har anlag för att lagra extra intraabdominellt fett och som visar tecken på insulinresistens, som hyperinsulinemi, hypertriglyceridemi, lågt HDL-kolesterol, hypertension eller hyperglykemi (1). Detta är orsaken till att det i den nuvarande definitionen av metabola

syndromet ingår bukfetma (midjeomfång) i stället för viktindex som ett kriterium (2). Feta lider oftare av metabola syndromet eller typ 2-diabetes, men det betyder inte att alla feta är insulinresistenta. Även normalviktiga kan vara insulinresistenta (3).

Insulin förhindrar normalt produktionen av glukos och VLDL i levern. I en lever med förhöjd fettmängd (steatos) fungerar insulinet sämre, (4–6), vilket leder till ovannämnda

FÖRFATTARNA

MK **Anna Kotronen** (disp.) forskar i Hannele Yki-Järvinsens forskningsgrupp vid Minerva.

MD **Robert Bergholm** är klinisk forskare i prof. Hannele Yki-Järvinsens grupp och specialiserar sig i invärtesmedicin. Han är för tillfället också chef för läkarföretaget Doctagons trygghetsläkartjänst.

MD, FRCP **Hannele Yki-Järvinen** är professor i invärtesmedicin och överläkare för diabeteskliniken vid HUCS. Yki-Järvinen forskar vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva och vid Helsingfors universitet om cellulära och molekylära mekanismer vid typ 2 diabetes.

manifestationer av insulinresistens. Levern producerar även många andra kardiovaskulära riskfaktorer, som CRP, plasminogenaktivatorhämmare 1 (PAI-1), fibrinogen, och koagulationsfaktorer (7). En fettlever producerar för mycket även av dessa faktorer och är möjligen därför en gemensam nämnare för metabola syndromet, typ 2-diabetes och hjärt- och kärlsjukdomar.

Diagnostisering av insulinresistensrelaterad fettlever

Definitionen av ej alkoholrelaterade fettlever innefattar hela skalan från ren ej alkoholrelaterad fettlever till ej alkoholrelaterad steatoshepatit och levercirros. Diagnosen förutsätter att andra vanliga orsaker som kan leda till steatos har uteslutits på basis av anamnesen (alkoholkonsumtionen över 20 g dagligen, läkemedel, andra toxiska ämnen) och laboratorieprover (8). Man talar om fettlever då andelen fett i levern histologiskt överstiger 5–10 procent av leverns vikt eller då triglyceridkoncentrationen mätt med protonspektroskopi överstiger 5,6 procent (9). Fettmängden i levern kan också uppskattas med MRI, datortomografi och ultraljud, men protonspektroskopi är den tillförlitligaste och känsligaste noninvasiva metoden, även om den inte lämpar sig för rutinbruk. Leverbiopsi är den enda tillförlitliga metoden för att konstatera inflammations- och fibrosförändringar.

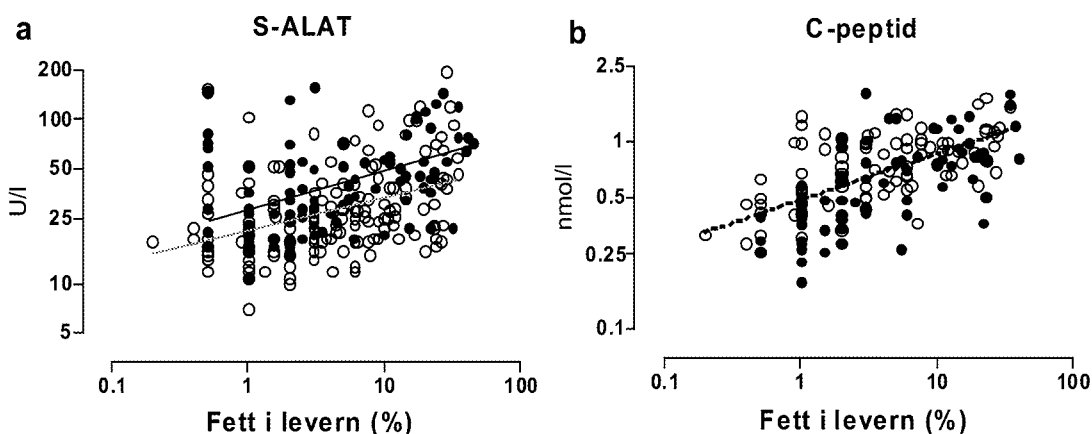
För tillfället finns det inget lätt och bra sätt att uppskatta leverns fetthalt på en

mottagning. Koncentrationerna av alaninaminotransferas i serum (S-ALAT) korrelerar positivt med leverns fettprocent mätt med protonspektroskopi (Figur 1), men variationen i ALAT-nivåerna förklarar endast ca 20 procent av variationerna i leverns fettprocent. Aspartataminotransferas (ASAT) och gammaglutamyltransferas (γ -GT), korrelerar positivt med leverns fettmängd oberoende av fetma (7). I en omfattande och relativt färsk amerikansk studie hade 79 procent av personer med fettlever normala ALAT-koncentrationer (10). Fettlever går med andra ord inte att utesluta med normala levervärden. ASAT/ALAT-förhållandet är högre vid alkoholutlöst fettlever.

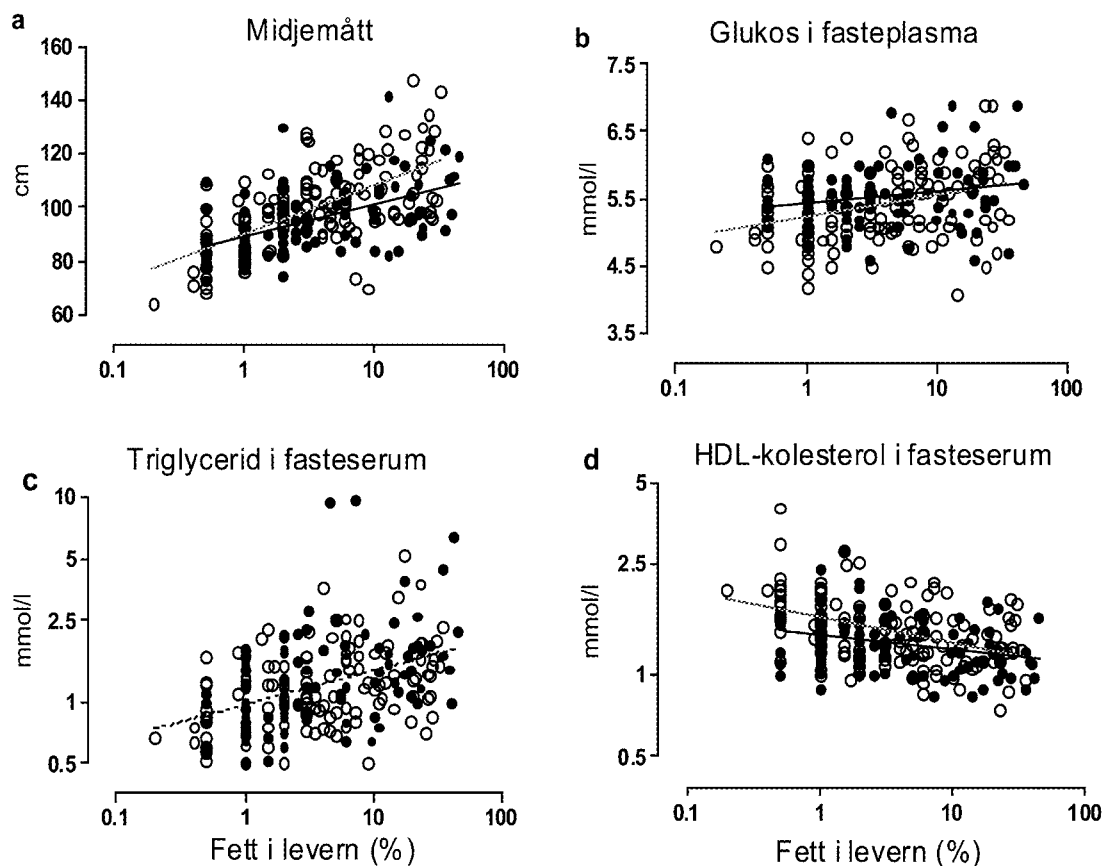
Förekomsten av NAFLD och sjukdomens förlopp

Studien Dallas Heart Study visade att 34 procent av totalt 2 349 undersökta personer hade fettlever mätt med protonspektroskopi (9). NHANES III-studien, som gjordes för 15 år sedan, kom fram till att förekomsten av NAFLD var 5,4 procent på basis av ALAT och ASAT (11). Då man beaktar levervärdernas inexacthet (10), kan man uppskatta att förekomsten av NAFLD är åtminstone fem gånger så hög (27 %) – det är alltså lika vanligt som metabola syndromet. Motsvarande siffror finns inte att tillgå för de nordiska länderna.

Ren NAFLD har en bättre prognos än alkoholutlöst fettlever, men även den kan utvecklas till steatohepatit (NASH) och vidare till cirros. Det finns endast få, kvalitativa



Figur 1. Leverns fettprocent i förhållande till **a)** S-ALAT-koncentrationer hos kvinnor ($n = 162$, $r = 0,39$, $p < 0,0001$; grått streck och vita cirklar) män ($n = 109$, $r = 0,44$, $p < 0,0001$; svart streck och svarta cirklar) och **b)** C-peptid ($r = 0,62$, $p < 0,0001$ både kvinnor och män, streckad linje) (18).



Figur 2.

Förhållandet mellan leverns fettprocent och de olika komponenterna i metabola syndromet i ett studiematerial bestående av 271 personer (19). Leverns fettprocent korrelerar a) mycket signifikant med midjemåttet hos kvinnor ($r = 0,59$) och män ($r = 0,56$), b) mycket signifikant med fasteblodsockret hos kvinnor ($r = 0,32$) och signifikant med fasteblodsockret hos män ($r = 0,22$), c) mycket signifikant med triglycerider ($r = 0,40$ kvinnor och $r = 0,44$ män) och d) HDL-kolesterol ($r = -0,44$ kvinnor och $r = -0,31$ män). Symbolerna: se Figur 1. Streckade linjen: både män och kvinnor.

prospektiva studier i ämnet. I en nyligen publicerad svensk studie hade 55 procent av patienterna med konstant förhöjda levervärden NASH då de undersöktes med leverbiopsi. (12). Av dessa utvecklade 10 procent levercirros inom 14 år. I en motsvarande norsk studie var förekomsten av NASH 50 procent (13). Enligt levertransplantationsstatistiken från Mayo-kliniken kommer NASH att vara den allmänaste orsaken till levertransplantationer år 2020 (14).

Patogenes

Kateteriseringsstudier har visat att största delen av de fria fettsyrorerna i fastetillstånd kommer till levern från det subkutana fettet, medan det visceral fett endast står för ca 5–10 procent hos personer med normalvikt

och för ca 30 procent hos personer med abdominell fetma (15). Efter en måltid får levern fettsyror från lipolysen av kylomikroner i de perifera vävnaderna och kylomikronrester (16). Produktionen av triglycerider (de novo lipogenes) och lipolysen i fettvävnaden är förhöjd vid NAFLD jämfört med friska kontrollpersoner (16). Man har hittat förändringar i gen- och proteinuttrycket i samband med fettlever, men resultaten är för varierande för att man ska kunna dra konklusioner av dem (7). Fettleverns genetik är mycket dåligt undersökt.

Personer med fettlever har en inflammation i den subkutana fettvävnaden (17). Makrofagernas antal och genuttrycket av inflammationsmarkörer och makrofagmarkörer är förhöjda hos personer med fettlever jämfört med personer som i samma ålder,

med samma könsfördelning och viktindex men normal fettmängd i levern (17). En person med fettlever frisätter mera fettsyror men mindre adiponektin från sin fettvävnad (6). Båda förändringarna kan öka ansamlingen av fett i levern.

Fettlever och metabola syndromet

Leverns fettprocent är fyra gånger så hög (~ 8,0 mot 2,0 %) hos personer med metabola syndromet enligt IDF-kriterierna (bukfetma och minst två av följande: förhöjda fasteglukos- och triglyceridvärden, lågt HDL-kolesterol och förhöjt blodtryck (2) jämfört med personer utan syndromet (18). Den förhöjda mängden fett i levern är oberoende av ålder, kön, och viktindex. Alla komponenter vid metabola syndromet korrelerar signifikant med graden av fetthalten i levern (Figur 2). I vår egen studie bestående av 271 personer korrelerade fasteinsulin och C-peptid i serum bättre med leverns fetthalt än med komponenterna i metabola syndromet (Figur 1) (18). Sambandet verkade vara oberoende av ålder, kön och viktindex. Det starka sambandet mellan fasteinsulin och fettlever kan delvis förklaras med att fettlever försämrar insulinclearance (19). Av våra organ är det främst levern som avlägsnar insulin från blodomloppet. Eftersom C-peptid inte bryts ner i levern, återspeglar C-

peptid och fettmängden i levern bäst leverns insulinresistens hos icke-diabetiker (7).

Leverns insulinresistens leder som sagt till ökad glukos- och VLDL produktion (4–6). Den förhöjda glukosproduktionen stimulerar insulinutsöndringen, som delvis korregerar hyperglykemin. Slutresultatet är hyperinsulinemi i kombination med hyperglykemi eller normalt fastebloodsocker. Den ökade VLDL-produktionen leder till hypertriglyceridemi och härav följer sänkt HDL-kolesterol. Midjemåttet är ett grovt mått på mängden visceralt fett, som med magnetundersökning mätt korrelerar en aning bättre med fetthalten i levern än midjemåttet. Underhudsfettet (det subkutana fettet) korrelerar däremot rätt dåligt med leverns fettprocent (18). Dessa faktorer kunde förklara varför ej alkoholrelaterad fettlever ökar risken för metabola syndromet 4–11-faldigt oberoende av ålder, viktindex och alkoholkonsumtion (20).

Fettlever och typ 2-diabetes

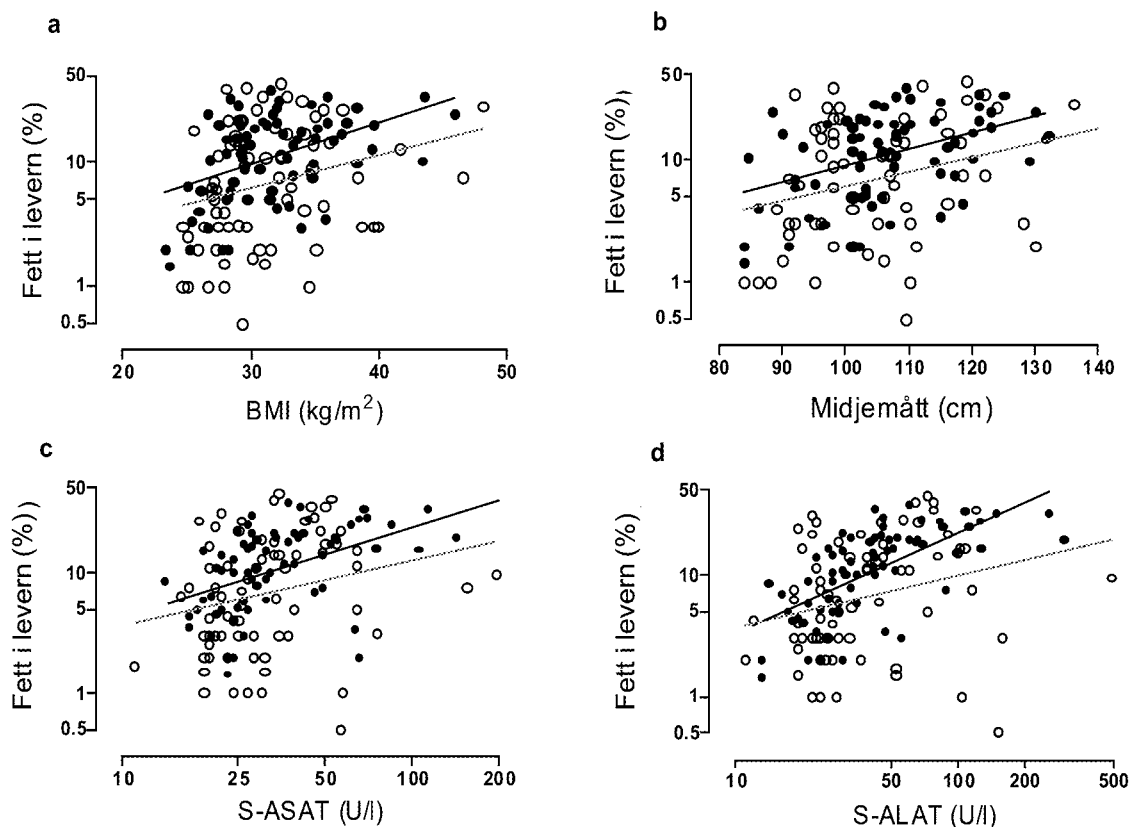
Omkring 70–80 procent av typ 2-diabetiker har fettlever (21, 22). Flera epidemiologiska studier har visat att förhöjda levervärden förutsäger typ 2-diabetes oberoende av fetma. Dessa studier har samlats i Tabell I. Typ 2-diabetiker har 80 procent högre fettmängd i levern jämfört med icke-diabetiker i samma

Tabell I.

Prospektiva studier som visar att leverenzymerna predisponerar för typ 2-diabetes oberoende av viktindex eller kroppsvikt.

Sampel	Sampelstorlek	Uppföljningstid (år)	Predisponerande levervärde*
Svenska män	766	13,5	ALAT
Pima indianer	451	6,9	ALAT
WOSCOPS	5 974	4,9	ALAT
Mexico City-diabetesstudien	1 441	7	ASAT
British Regional Heart Study	7 458	12,8	GGT
D.E.S.I.R.	4 201	3	GGT
Finländska män och kvinnor	20 158	12,7	GGT
CARDIA-studien	4 844	5,5 och 15	GGT
IRAS	906	5,2	ALAT och ASAT
British Regional Heart Study	3 500	5	ALAT och GGT
Japanska män	6 217	7	ALAT, ASAT och GGT

* korrigerat för viktindex



Figur 3.

Fettprocenten i levern i förhållande till **a)** viktindex ($r = 0,45$, $p < 0,0001$ typ 2-diabetiker [svarta cirklar, svart streck]; $r = 0,26$, $p = 0,029$ icke-diabetiker [vita cirklar, grått streck]), **b)** midjemått ($r = 0,45$, $p = 0,0001$ typ 2-diabetiker; $r = 0,29$, $p = 0,017$ icke-diabetiker), **c)** S-ASAT ($r = 0,49$, $p < 0,0001$ typ 2-diabetiker; $r = 0,24$, $p = 0,043$ icke-diabetiker) och **d)** S-ALAT? ($r = 0,66$, $p < 0,0001$ typ 2-diabetiker; $r = 0,26$, $p = 0,027$ icke-diabetiker) (18).

ålder, av samma kön och med samma viktindex (23). Skillnaden i leverns fettansamling växer med ökande viktindex och midjemått (Figur 3). Levervärdena ser ut att underskatta leverns fettansamling hos typ 2-diabetiker. För varje ALAT- eller ASAT-värde har en typ 2-diabetiker betydligt mera fett i levern än en icke-diabetiker (Figur 3). Denna skillnad växer med stigande levervärden.

Fettlever och hjärt-kärlsjukdomar

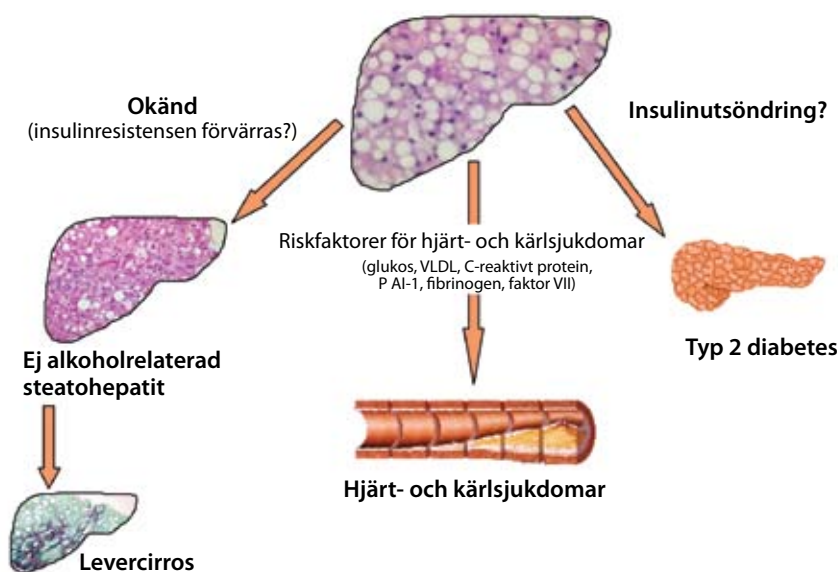
Förhöjda levervärden har konstaterats predisponera för hjärt-kärlsjukdomar oberoende av traditionella riskfaktorer, som LDL-kolesterol och förhöjt blodtryck (22-24). I den nederländska Hoorn-studien där 1 439 personer i åldern 50–75 år deltog, ökade förhöjd ALAT-koncentration i serum risken att insjukna i koronarsjukdom inom 10 år, även då övriga riskfaktorer beaktades (glukostolerans, HbA_{1c}, systoliskt blodtryck, LDL-kolesterol och viktindex) (24). En person med NAFLD löper en

dubbelt så stor risk att dö i hjärt-kärlsjukdomar som normalbefolkningen (12).

Hur blir man av med fettlever?

Bantning är utan tvekan ett effektivt sätt att minska mängden fett i levern. Minskningen av fett i levern sker snabbare och proportionellt sett i mycket högre grad än förändringen i kroppsvikt (25). Exempelvis leder en viktminskning på 8 procent till att 50 procent av fett i levern försvinner (25). Bantning har sannolikt gynnsamma effekter på inflammations- och fibrosförändringar i levern, men här saknas än så länge slutgiltigt bekräftelse.

Diet och motion. Leverns fetthalt stiger redan efter en stor måltid. Tvärsnittsstudier har visat att leverns fetthalt är högre ju mera mättade fetter det finns i födan (25). Det finns inga interventionsstudier där man skulle ha undersökt hur föda med varierande sammansättning men med samma energiinnehåll påverkar leverns fettmängd. I vår



Figur 4. Ej alkoholrelaterad leversjukdom (NAFLD) hör intimt ihop med metabola syndromet och predisponerar för typ 2-diabetes, hjärt-kärlsjukdomar och ej alkoholrelaterad steatohepatit (NASH), som kan leda till levercirros.

egen småskaliga studie kom vi fram till att en isokalorisk högfettdiet (56 % av energin från fett) ökade leverns fettprocent med 35 procent medan en lågfettdiet (16 % av energin från fett) minskade fettet i levern med 20 procent inom 2 veckor (26). Stort intag av snabbmat, så som i filmen *SuperSize Me* (viktökning med 10 % på 3 veckor), tredubblade fettmängden i levern i en svensk studie (27). Motion ökar musklernas insulinkänslighet, men hur motion påverkar leverns insulinkänslighet och fettmängd oberoende av vikten är oklart.

Läkemedelsbehandling. Fettlever är inte en sjukdom och behöver inte skötas i och för sig. I vården av en typ 2-diabetiker har leverns fetthalt en klar betydelse för behandlingen. Vid fettlever verkar insulinet dåligt, och studier har visat att leverns fetthalt förutsäger behovet av insulin, oberoende av vikt och blodsockerbalansen i initialskedet (5, 28). Av de läkemedel som används för behandling av hyperglykemi sänker speciellt glitazonerna leverns fetthalt med 40 procent inom 4–6 månader (19). Patienter, som har ett stort insulinbehov på grund av fettlever, ser ut att dra nytta av glitazoner, när man mäter nyttan av förbättrad sockerbalans och minskat insulinbehov (29). Insulinbehandling i sig minskar leverns fettmängd en aning hos typ 2-diabetiker (30). Med tanke på kardiovaskulära händelser kan pioglitazon vara ett tryggare alternativ än rosiglitazon (31). Hjärtinsufficiens och koronarsjukdom bör uteslutas innan behandlingen inleds. Hur behandlingen med glitazon

påverkar patienternas prognos är dock okänt. Metformin ökar leverns insulinkänslighet men påverkar inte fetthalten (32).

Viktnedgång sänker fetthalten i levern hos NASH-patienter (Tabell II), men om bantningen påverkar graden av inflammation eller fibros är okänt. Hos NASH-patienter har pioglitazon nyligen påvisats minska fetthalten i levern samtidigt som tecknen på inflammation minskade vid leverbiopsi (33). Minskningen av fibros uppnådde inte riktigt statistisk signifikans.

När ska man misstänka NASH?

Om patienten lider av metabola syndromet eller typ 2-diabetes är risken för NASH 3–4-faldig (34). Fettlever som verifierats med ultraljud eller andra radiologiska metoder innebär stöd för en misstanke om NASH, även om fetthalten i levern sjunker när cirros utvecklas. Vi saknar fortfarande en bra noninvasiv metod för att känna igen inflammatorisk fettlever. I en rätt färsk internationell studie kunde man utifrån biopsiutlåtanden om 733 NAFLD-patienter, patientuppgifter och blodprovresultat utveckla en räkneformel för uppskattning av fibrosrisken vid NAFLD (35). Om patientens ålder, viktindex, ASAT/ALAT-förhållandet, albumin- och trombocytvärdena samt glukos i serum är kända, kan fibros förutspås med upptill 90 procents säkerhet. Genom att tillämpa denna formel kunde man

Tabell II.
Effekten av bantning och läkemedelsbehandling på leverns fettmängd.

Intervention	Diagnos	N	Behandlingstid	Förändring i leverns fettmängd
BANTNING				
-8 % av kroppsvikten	Kvinnor med övervikt	23	3–6 månader	-49 % (¹ H-MRS)
-10 % av kroppsvikten	Typ 2-diabetes	8	3–12 veckor	-81 % (¹ H-MRS)
-10–14 % av kroppsvikten	kvinnor och män med övervikt	48	6 månader	-44–58 % (¹ H-MRS)
GLITAZONER				
Rosiglitazon jämfört med placebo	Typ 2-diabetes	33	4 månader	-45 % (¹ H-MRS)
Rosiglitazon jämfört med metformin	Typ 2-diabetes	20	4 månader	-51 % (¹ H-MRS)
Pioglitazon jämfört med placebo	NASH + IGT eller typ 2-diabetes	55	6 månader	-54 % (¹ H-MRS), graden av steatos ↓ (leverbiopsi)
ÖVRIGA				
UCDA jämfört med placebo	NASH	166	2 år	Ingen förändring i graden av steatos (leverbiopsi)
KOMBINATIONS-BEHANDLING				
Vitamin E jämfört med vitamin E + pioglitazon	NASH	20	6 månader	Graden av steatos ↓ (leverbiopsi) i båda grupperna
UCDA jämfört med UCDA + vitamin E jämfört med placebo	NASH	48	2 år	Graden av steatos ↓ (leverbiopsi) med UCDA + behandling med vitamin E

¹H-MRS, protonspektroskopi
IGT, försämrad glukostolerans
UDCA, ursodeoxycholsyra

i studien undvika leverbiopsier i 75 procent av fallen. Om fibrosförändringar misstänks i levern, ska patienten skickas till en gastroenterolog för bedömning. NASH kunde vara en tilläggsindikation för att remittera patienter till viktminskande operationer.

Slutord

En fettlever är resistent mot insulin, vilket leder till ökad fett- och sockerproduktion i levern. Även om övervikt ökar sannolikheten för att levern ansamlar fett, verkar det som om kännetecknen för insulinresistens och metabola syndromet utvecklas endast hos patienter med extra fett i levern. Hos dessa personer är fettvävnaden inflammerad. Midjeomfånget är ofta förstorat hos personer med fettlever, men

huvuddelen av fettstämman härstammar ändå från underhudsfettet och från nybildning av fettsyror i levern. Orsaken till att vissa personer utvecklar fettlever medan andra med samma vikt inte gör det, är oklar. Den grundläggande orsaken till insulinresistensen i levern kan ligga i vilket organ som helst, men levern är ett organ som i slutändan producerar de flesta riskfaktorerna för hjärt-kärlsjukdomar. En fettlever kan inflammeras och då ökar risken för allvarlig leverskada.

MD Robert Bergholm
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2 U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
robert.bergholm@hus.fi

Referenser

1. Lakka HM, Lakka TA, Tuomilehto J, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *European heart journal* 2002;23:706–713.
2. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group 2005. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059–1062.
3. Reaven GM. Banting lecture Role of insulin resistance in humandisease. *Diabetes*1988;37:1595–1607.
4. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Hakkinen A, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Boren J. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755–765.
5. Ryysy L, Häkkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:749–758.
6. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002;87: 3023–28.
7. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2008;28:27–38.
8. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2003; 37: 1202–1219.
9. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2005; 288: E462–8.
10. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nurenberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2004;40:1387–95.
11. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American Journal of Gastroenterology* 2003;98:960–967.
12. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2006;44: 865–873.
13. Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P, Azim S, Marit Loberg E, Haaland T, Birkeland K, Bjoro K. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2005;40:1469–77.
14. Charlton M. "Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact", *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2004; 2: 1048–58.
15. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *The Journal of clinical investigation* 2004;113:1582–88.
16. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 2005;115: 1343–51.
17. Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi VR, Wagsater D, Yetukuri L, Makkonen J, Rissanen A, Häkkinen AM, Lindell M, Bergholm R, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM, Oresic M, Yki-Järvinen H. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes* 2007; 56: 1960–68.
18. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007;92:3490–97.
19. Kotronen A, Vehkavaara S, Seppälä-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. Effect of liver fat on insulin clearance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2007; 293: E1709–15.
20. Hamaguchi M, Kojima T, Taked N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Internal Medicine* 2005;143: 722–728.
21. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine* 2002;346:1221–31.
22. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes care* 2007;30:1212–8.
23. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes care* 2008;31:165–169.
24. Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, Diamant M. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: A 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007;191:391–396.
25. Tiikkainen M, Bergholm R, Vehkavaara S, Rissanen A, Häkkinen AM, Tamminen M, Teramo K, Yki-Järvinen H. Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content. *Diabetes* 2003;52:701–707.
26. Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005;90:2804–09.
27. Kechagias S, Ernerson A, Dahlqvist O, Lundberg P, Lindstrom T, Nystrom FH. Fast food based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects. *Gut* 2008; pp. 649–654.
28. Yki-Järvinen H, Kauppinen-Makelin R, Tiikkainen M, Vahatalo M, Virtamo H, Nikkilä K, Tulokas T, Hulme S, Hardy K, McNulty S, Hänninen J, Levanen H, Lahdenperä S, Lehtonen R, Ryysy L. Insulin glargine or NPH combined with metformin in type 2 diabetes: the LANMET study. *Diabetologia* 2006;49:442–451.
29. Juurinen L, Kotronen A, Graner M, Yki-Järvinen H. Rosiglitazone reduces liver fat and insulin requirements and improves hepatic insulin sensitivity and glycemic control in patients with type 2 diabetes requiring high insulin doses. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008;93:118–124.
30. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ. Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes - An Interim Analysis. *The New England journal of medicine* 2007;357:28–38.
31. Juurinen L, Tiikkainen M, Häkkinen AM, Hakkarainen A, Yki-Järvinen H. Effects of insulin therapy on liver fat content and hepatic insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2007; 292:E829–35.
32. Tiikkainen M, Häkkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Mäkimattila S, Yki-Järvinen H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:2169–76.
33. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R., Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine* 2006;355:2297–2307.
34. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2003; 37: 917–923.
35. Angulo P, Hu JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Thorneau TM, Day CP. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2007;45: 846–854.

Inducerade pluripotenta stamceller – nya löften och möjligheter för forskning och terapi

RAS TROKOVIC OCH DAN LINDHOLM

Stamceller är omogna celler med förmåga till självförnyelse och till att bilda kroppens olika celltyper. Det finns olika typer av stamceller där de nyligen beskrivna inducerade pluripotenta stamcellerna (iPSC) har en stor potential när det gäller medicinsk forskning och cellterapi. I denna artikel ges en kort beskrivning av bakgrunden till iPSC, deras biologi och potentiella användningsmöjligheter inom medicinen och för behandling av mänskliga sjukdomar.

Vad är en stamcell?

För att kunna besvara frågan vad iPSC egentligen är för något, måste vi först se på definitionen av en stamcell. Kännetecknade för en stamcell är dess inneboende förmåga till självförnyelse, en oändlig förmåga att dela på sig och ge upphov till två identiska kopior eller dotterceller. Stamceller kan betecknas som kroppens cellulära byggstenar som förekommer under fosterutvecklingen men även i den fullvuxna organismen. Embryonala stamceller bildar alla vävnader i kroppen medan vuxna, adulta stamceller utgör en vävnadsreservoar för att ersätta andra celler efter skada eller vid sjukdom. Denna förmåga till självläkning har gjort terapi med stamceller medicinskt attraktiva vid ett flertal mänskliga sjukdomar som påvisar förlust av specifika celltyper. Trots lovande utsikter att med stamcellsterapi kunna lindra sjukdom och höja livskvaliteten hos patienter, är forskningen med stamceller i flera länder kontroversiell speciellt i fråga om de embryonala stamcellerna. Detta beror på att mänskliga embryonala stamceller främst isolerats från aborterade foster, vilket har aktualiserat flera etiska frågeställningar. Den senaste utvecklingen på området med odling av iPSC från vuxna mänskliga celler innebär ett stort genombrott (1), och utökar våra möjligheter för medicinsk användning av stamceller både inom forskningen och

vid flera patientinriktade tillämpningar och terapi.

Stamceller med olika potens

Stamcellerna delar sig i princip oändligt men kan under inverkan av yttre faktorer och ett inre genetiskt program mogna ut eller differentiera till en eller flera olika celltyper. Beroende på sin potential att bilda andra

FÖRFATTARNA

PhD Ras Trokovic har doktorerat i utvecklingsbiologi 2003 vid Helsingfors universitet. Han har tidigare forskat vid Minerva men är nu forskare på Biomedicums Stamcellscentrum. Hans forskning gäller humana embryonala stamceller och betaceller i bukspottkörteln och understöds av ESTOOLS-konsortiet inom EU:s forskningsprogram.

MKD Dan Lindholm doktorerade år 1984 vid Helsingfors universitet. Han har varit professor i neurobiologi vid Uppsala universitet 1994–2007, och professor i cell- och molekylärbiologi vid Helsingfors universitet 2007. Han forskar nu på Minerva i hjärnans stamceller och i neurodegenerativa sjukdomar.

celltyper indelas stamcellerna i totipotenta, pluripotenta och adulta stamceller.

En *totipotent stamcell* uppstår vid befruktning genom fusion av en spermie och en äggcell som sedan delar sig vidare. Totipotenta stamceller utgör de allra tidigaste cellerna i embryot och kan ge upphov till alla embryonala och extraembryonala organ hos fostret.

De *pluripotenta stamcellerna* kan isoleras från det inre cellagret hos blastocyten och kan bilda de tre groddbladen under den tidiga utvecklingen.

Adulta stamceller har en begränsad differentieringsförmåga och förekommer i små mängder i vävnader hos den vuxna organismen, såsom i benmärgen och i hjärnan. Dessa stamceller lokaliseras till särskilda vävnadsnischer och kan normalt differentiera ut till celler som är typiska för just den vävnaden. Dock finns i litteraturen beskrivet att de olika vävnadsstamcellerna kan genomgå en så kallad transdifferentiering, dvs. omvandling av en form av celler till en annan, även om detta normalt sker i en ganska ringa utsträckning.

Vuxna stamceller har av många betraktats som det enda beaktansvärda alternativet för cellulära terapier med stamceller nu och i framtiden. De vuxna stamcellerna leder sällan eller aldrig till tumörbildning. Terapin med vuxna stamceller är därför inte kontroversiell och de används redan nu vid transplantation av blodstamceller vid behandling av leukemier och av andra blodsjukdomar. Vuxna mesenkymala stamceller kan användas i flertal kliniska tillämpningar för att ersätta vävnad eller främja läkningsprocessen. Transplantation av autologa stamceller har även den fördelen att man undviker immunologiska reaktioner i form av avstötning av transplanterade organ, vävnader eller celler. I Finland gjordes nyligen en banbrytande insats när det gäller tillämpningen av stamcellsterapi för vävnadsrekonstruktion av käkbenet efter avlägsnandet av en tumör (2). Behandlingen gick ut på att från bukfettet hos den opererade patienten först odla celler till att bilda benceller inne i en titanmodell som motsvarade käkbenet. Den rekonstruerade benbiten opererades sedan några månader senare in i patientens överkäke som ersättning för den förlorade benvävnaden (2).

Stamceller från navelsträngen räknas även till adulta stamceller och används för terapi vid bl.a. blodsjukdomar. Med tanke på preventiv medicin har det även framförts att man generellt kunde ta till vara stamceller från navelsträngen i samband med ett barns födsel,

och frysa ner dessa celler för framtida behov senare i livet som ersättning för vävnader efter skada eller vid sjukdom. Denna typ av verksamhet finns delvis redan i USA men har inte slagit igenom i större utsträckning. I Finland är det Röda Korsets Blodtjänst som har hand om verksamheten med navelsträngsstamceller, vilket regleras av Läkemedelsverket och i framtiden även av biobanklagen som är under beredning (3).

Trots sina uppenbara terapeutiska fördelar har vuxna vävnadsstamceller även sina begränsningar. Det har att göra med deras ringa antal, svårigheten att isolera och kultivera dem samt deras förmåga att ge upphov till endast ett fåtal vävnadsspecifika celltyper.

Embryonala stamceller (ES)-celler är pluripotenta celler som kan odlas i cellkultur och instrueras till att under rätta betingelser mogna ut till olika celltyper i kroppen. De första fynden när det gäller mänskliga stamceller gjordes redan på 1960-talet av de kanadensiska forskarna, Ernest McCulloch och James Till (4). ES-celler isolerades sedan från möss 1981 (5, 6) och från primater så sent som 1995 (7). I slutet på 1990-talet gjordes sedan de första försöken med humana ES-celler (8).

ES-celler kan användas till att besvara grundläggande biologiska frågor om livets ursprung, den tidiga celldifferentieringen, och samspelet mellan gener och yttre faktorer vid embryo- och organogenesen. Förutom detta är ES-cellerna viktiga i terapisyfte samt för diagnostiska och andra ändamål. Som ovan nämnts är bruket av humana ES-celler förknippat med en hel räkka både etiska och praktiska problem, vilket gjort det svårare att forska om dem i vissa länder. I Finland och i Sverige samt i vissa andra länder har man tillåtit forskning på humana ES-celler från befruktade ägg i syfte att lindra och bota svåra sjukdomar. Det är viktigt att inse att all forskning med mänskliga ES-celler genomgår rigorös kontroll och kräver godkända etiska tillstånd. Forskningen har även gått framåt med stormsteg och gett nya insikter så gott som varje månad. Med avseende på terapiförsök har myndigheten Food and Drug Administration (FDA) i USA nyligen godkänt bruket av oligodendrocytprekursorer från humana ES-celler. Oligodendrocyterna bildar det skyddande myelinet kring nervcellssaxonen, och prekursorererna används för utvärdering av behandling av subakuta ryggmärgsskador hos människa. Det finns självfallet även risker med ES-cellsterapi, där risken för tumörbildning är en allvarlig möjlighet att beakta.

Tabell I.
Framställning av iPS-celler hos olika arter med en kombination av transkriptionsfaktorerna, KMOS.

Faktorer för induktion av iPS-celler (referens)	Kommentarer: IPS-celler
Celler från MUS och MÄNNISKA	
KMOS (1, 10, 11)	Den första rapporten om iPS-celler med könsöverföring
KOS (12)	utan c-Myc
KMOS (13)	med plasmiduttryck utan DNA-integration
OS (14)	tillsats av kemikalier och utan c-Myc
O (15)	från vuxna neuronala stamceller
MOS (16)	utan K-faktorn
KMOS (17, 24)	med tillsats av rekombinanta protein
KMOS (18, 21, 22)	med transposonuttryck
KMOS (23)	utan virala vektorer och genom tillämpning av gensystemet Cre/Lox
RÅTTA	
KOS (19)	med KOS och kemiska inhibitorer
APA	
KMOS (20)	från Rhesusapan
GRIS	
KMOS (39)	från gris

Nukleär reprogrammering

Humana ES-celler kan isoleras från överblivna provrörsembryon eller skapas genom somatisk cellkärnsöverföring. I det sistnämnda fallet avlägsnas cellkärnan hos det befruktade ägget och ersätts med en kärna tagen från en vuxen kroppscell.

Historiskt sett gjordes de första försöken med nukleär programmering av John Gurdon redan på 1960-talet i försök med grodyngel (8). Han kunde visa att man genom att ersätta cellkärnan hos ett groddagg med en cellkärna från en mogen grodcell kunde skapa en högst normal groda. Denna styrningsmekanism kan liknas vid ett byte av programkortet i en dator mot ett nytt med annan information. Praktiskt innebär den nukleära omprogrammeringen att den vuxna cellens information dvs. dess uppsättning av aktiva läsbara gener förändras till att motsvara den som är karakteristisk för kärnan hos en omogen cell.

Efter de första lyckade experimenten fortsatta man med nukleär reprogrammering i flera laboratorier, och man klonade bl.a. fåret Dolly, vilket skapade stora rubriker över hela världen (9). Sedermera har flera andra djurarter klonats och delar av denna verksamhet har även blivit kommersiell – på både gott och ont. Lärdomen av alla dessa försök är att nukleär reprogrammering visserligen är möjlig men att metoden är bemängd med tekniska svårigheter, såsom en låg frekvens av lyckade försök

och med en otäck möjlighet att skapa ibland mindre livsduglig avkomma. Utvecklingsbiologiskt sett visade experimenten med nukleär programmering att celldifferentiering inte är en irreversibel process och att den kan styras av gener som ligger latenta i vuxna celler men som reaktiveras under vissa omständigheter liknande dem i en embryonal äggcell. Hur många och vilka dessa gener eventuellt var, förblev länge höljt i dunkel. När man sedan fick svaren på dessa frågor var de lika oväntade som eleganta.

Inducerade pluripotenta stamceller

I experiment med cellstyrning kunde den japanska forskaren Shinya Yamanaka nyligen visa att endast fyra transkriptionsfaktorer (protein som i ett nätverk reglerar uttrycket av andra gener) behövs för att reprogramera en vuxen bindvävscell (fibroblast) till en pluripotent stamcell med förmåga att bilda andra celltyper (1, 10). De fyra gener det rörde sig om har fått namnen Klf4, c-myc, Oct4 och Sox2 (KMOS) och de är alla högt uttryckta i tidiga stamceller. Med hjälp av retrovirus kunde dessa KMOS-gener uttryckas i vuxna fibroblaster för att bilda pluripotenta stamceller som därför kallades inducerade pluripotenta stamceller (iPS-stamceller). De nya rönen publicerades hösten 2006 och formligen revolutionerade stamcellsforskningen (10). För sina bedrifter tilldelades Shinya Yamaka,

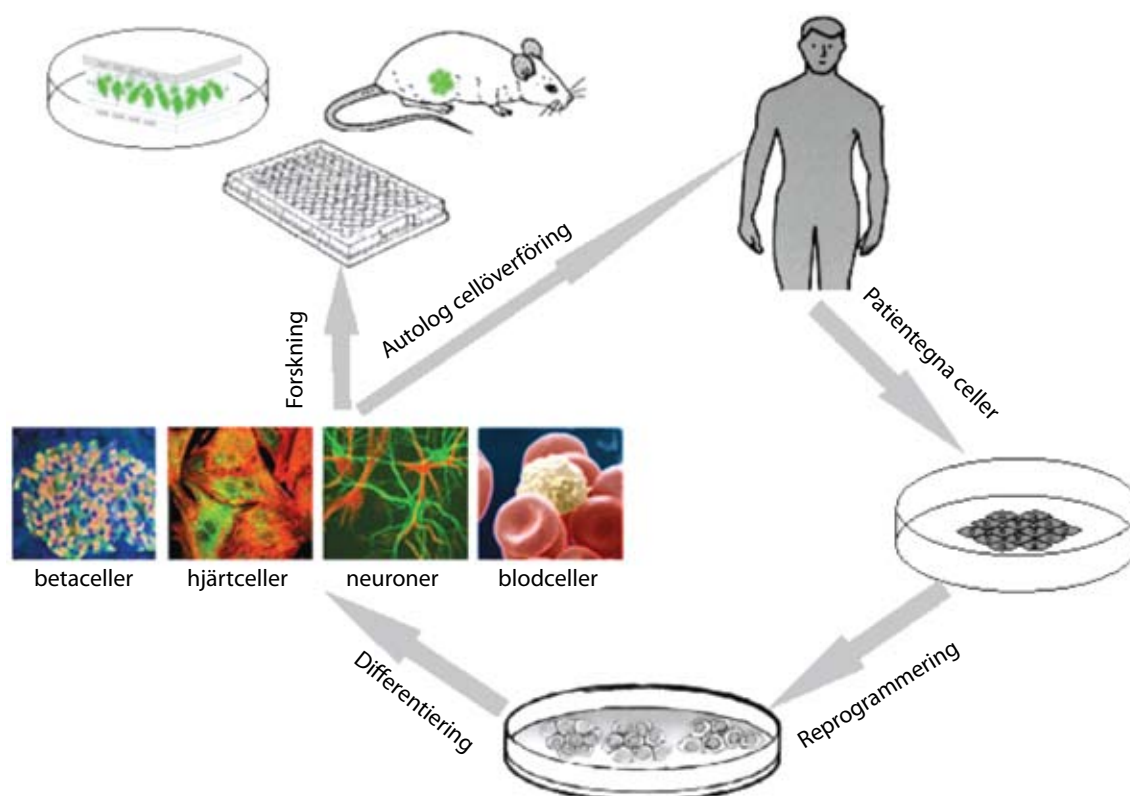
nu 47 år, i oktober 2009 det renommerade Laskerpriset i USA tillsammans med John Gurdon, pionjären inom studier av nukleär reprogrammering. The Lasker Awards anses vara en av medicinens förnämsta utmärkelser, och till saken hör att flera Laskerpristagare senare även förlänats Nobelpriset.

De första försöken med iPS-celler gjordes med fibroblaster från mus och sedan med mänskliga fibroblaster från hudbiopsier. Det visade sig att det tämligen enkelt och förutsägbart går att framställa iPSC hos de flesta arter inklusive människa, apa, gris, gnagare efter uttryck av de fyra KMOS-faktorerna (Tabell I). Det har även visat sig att iPSC går att få fram utgående från nästan alla vuxna celltyper. Förutom fibroblaster har man sålunda använt sig av celler från blodet, levern, magen,

bukspottskörteln, nerv- och fettvävnad, och från keratinocyter m.fl., (Tabell I). Nyligen har dessutom maligna eller immortaliserade celler använts för att bilda iPS-celler, och i med detta kan man närmare studera grundläggande frågor som gäller humana cancerformer och tumörbildning (32, 33).

iPS-cellerna och medicinen

När det gäller förhållandet till övriga stamceller är iPS-cellerna i allt väsentligt lika ES-cellerna, och liksom dessa kan iPS-cellerna ge upphov till i princip alla de över 200 olika celltyperna i kroppen. Den uppenbara fördelen med iPS-celler är att man framställer dem från vuxna celler och slipper använda fostervävnad. Med tanke på olika mänskliga



Figur 1.

Möjliga tillämpningar av iPS-celler inom medicinen. Patientegna celler tas exempelvis från hudbiopsier och odlas i cellkulturer att bilda iPS-celler genom nukleär reprogrammering. Dessa differentieras sedan till specifika celltyper som kan användas i forskningssyften eller vid transplantation av vävnader eller cellaggregat till patienten. De patientegna iPS-cellerna kan fungera som en modell av sjukdomen i cellkulturer samt användas för farmakologisk prövning av olika läkemedel och för analys av mekanismer och signalvägar som orsakar sjukdomsförloppet hos patienten. Detta förfarande kan på sikt leda till mer rationella och skräddarsydda terapier för olika sjukdomar i framtiden.

sjukdomar är en annan fördel att iPSC kan framställas från patientegna celler. Dessa kan differentieras enligt behov till den celltyp som man önskar studera och senare användas för cellbehandling eller vid transplantation. En attraktiv idé härvidlag är att iPSC-cellerna och deras cellderivat används för farmakologisk testning av olika läkemedel för behandling av specifika sjukdomar (Figur 1). Det är även möjligt att medels iPSC skapa sjukdomsmodeller i provrör och forska vidare på dessa med gängse cell- och molekylärbiologiska tekniker. Exempel på sådana tillämpningar finns redan i fråga om ett antal viktiga mänskliga sjukdomar (Tabell II). Nuvarande patientnära möjligheter och terapigebit när det gäller iPSC-cellerna visas schematiskt i Figur 1. Det är klart att andra möjligheter för medicinsk användning och manipulation av iPSC-cellerna tillkommer framöver när väl kunskapen om dessa celler ökar.

I detta nu är flera viktiga frågor obesvarade om iPSC-cellernas biologi och vilken potentiell roll dessa celler kan spela inom medicinen. De första försöken med iPSC förutsatte retroviralt uttryck av de fyra KMOSgenerna (1, 10). Detta kan i princip leda till ogynnsamma effekter på genuttrycket och t.o.m. orsaka tumörbildning. Denna nackdel har man därför på olika sätt försökt kringgå bl.a. genom att använda sig av andra vektorkonstruktioner eller genom att framställa iPSC-stamceller med ett mindre antal faktorer. Bland fyrväpplingen KMOS är speciellt c-myc-transkriptionsfaktorn en viktig onkogen i cellen och behövs för celldelningen. Men c-Myc kan även bidra till tumörbildning under vissa omständigheter och ett transient uttryck av faktorn vore därför att föredra. Därutöver har färsk forskning visat att proteinet p53 vilket är en känd tumorsuppressör (motverkar tumörer) även påverkar iPSC-celldelningen (33–35) som därför även bör beaktas noggrant (36). Det är uppenbart att frågor om säkerhet och kontroll av celldifferentieringen och en eventuell tumörbildning är lika viktiga och aktuella aspekter med hänsyn till terapier med iPSC-stamceller som de är för ES-cellerna (37). Vi vet tyvärr ännu för litet om detta, men forskningen på det här området är stadd i snabb utveckling och nya rön kommer att öka våra kunskaper även i dessa frågor. Det är troligt att det i framtiden blir möjligt att framställa iPSC-celler med ett antal kemikalier eller efter tillsats av bestämda småmolekylära substanser eller läkemedel och på ett sätt som är både snabbare och enklare än det nuvarande förfarandet (38).

Tabell II. Exempel på iPSC-celler från patienter med olika sjukdomar.

Sjukdom	Referens
Gauchers sjukdom typ II	25
Duchennes muskeldystrofi	25
Downs syndrom	25
Parkinsons sjukdom	25, 26
Juvenil diabetes mellitus	25, 27
Huntingtons sjukdom	25
Lesch–Nyhans syndrom	25
Amyotrofisk lateralskleros	28
Spinal muskulär atrofi	29
Fanconianemi	30
Familjär dysautonomi	31

PhD Ras Trokovic
Biomedicums stamcellscentrum
Haartmansgatan 8
00290 Helsingfors
ras.trokovic@helsinki.fi

Prof. Dan Lindholm
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
dan.lindholm@helsinki.fi

Referenser

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–872.
2. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, Miettinen S, Suuronen R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 38: 201–209.
3. Kääriäinen H: Biobanker-vad är det frågan om? *Finska Läkaresällskapets Handlingar* 2009; 168:13–15.
4. Wu AM, Siminovich L, Till JE, McCulloch EA. Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59:1209–15.
5. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154–156.
6. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634–38.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–47.
8. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962;10:622–640.

9. Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810–813.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 25;126:663–676.
11. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313–317.
12. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008; 26: 101–106.
13. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322: 949–953.
14. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1269–75.
15. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 2009;461:649–653.
16. Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, Hanna J, Lairson LL, Charette BD, Bouchez LC, Bollong M, Kunick C, Brinker A, Cho CY, Schultz PG, Jaenisch R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8912–17.
17. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 381–384.
18. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009;6:363–369.
19. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4:16–19.
20. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 587–590.
21. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458: 771–775.
22. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämmäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458: 766–770.
23. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136: 964–977.
24. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 472–476.
25. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877–886.
26. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5856–61.
27. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:15768–773.
28. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218–21.
29. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Liorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457: 277–280.
30. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460: 53–59.
31. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; 461:402–406.
32. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 2009; 460:1145–48.
33. Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 2009; 460: 1149–53.
34. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009; 460:1132–35.
35. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009;460:1140–44.
36. Krizhanovsky V, Lowe SW. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature* 2009; 460:1085–86.
37. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 2009;27:743–745.
38. Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* 2009 Oct 18.
39. Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:10993–98.

Reglering av glukosmetabolism i skelettmuskel hos människan

PAULINA SKROBUK, STEPHANIE VON KRAEMER, JOHANNES KÄRKKÄINEN OCH HEIKKI KOISTINEN

Insulin reglerar flera metabola reaktioner i skelettmuskel, som upptag och metabolism av glukos och fettsyror. Insulinresistens definieras som nedsatt biologiskt gensvar på insulin, och kännetecknar typ 2-diabetes och det metabola syndromet. Eftersom skelettmuskel är kroppens största metabola organ kommer en mera djupgående förståelse för de molekylära reaktionsvägarna i muskel som påverkar metabolismen att underlätta utvecklandet av nya behandlingsprinciper för att förbättra glukos- och lipidmetabolismen hos diabetiker; i synnerhet då de terapeutiska alternativen vid denna vanliga metabola sjukdom är begränsade.

Inledning

Typ 2-diabetes mellitus (T2DM) är den vanligaste metabola sjukdomen; den utvecklas genom interaktion mellan både miljöfaktorer och genetiska faktorer (1). Fetma, stillasittande livsstil och en diet som innehåller för mycket fettsyror anses vara de viktigaste icke-genetiska orsakerna till den pågående pandemin av typ 2-diabetes. Insulinresistens är kännetecknet för T2DM, och *in vivo*-studier som använder insulinklamptechnik har visat att upptag av glukos i skelettmuskel under hyperinsulinemiska förhållanden är påtagligt nedsatt hos T2DM-patienter. Dessa rön är kliniskt relevanta, eftersom skelettmuskel är den plats där den största delen av glukosupptaget sker under insulinstimulerade förhållanden; den står för cirka 85 procent av det glukos som avlägsnas efter glukosinfusion (2). Vid fullt utvecklad T2DM kan hyperglykemi och andra metabola avvikelser sekundärt hämma insulinets verkan. *In vivo* samt *in vitro*-studier på normoglykemiska första gradens släktingar till T2DM-patienter tyder på att insulinresistens i skelettmuskel är en tidig defekt vid patogenesen till T2DM (3, 4). Studier som använder kärnmagnetisk resonansteknik (NMR) har lokaliserat den hastighetsbegränsande defekten vid insulinstimulerad glykogensyntes i T2DM-patienters skelettmuskel till glukostransporten (5).

Reglering av glukostransport: insulinsignaltransduktion

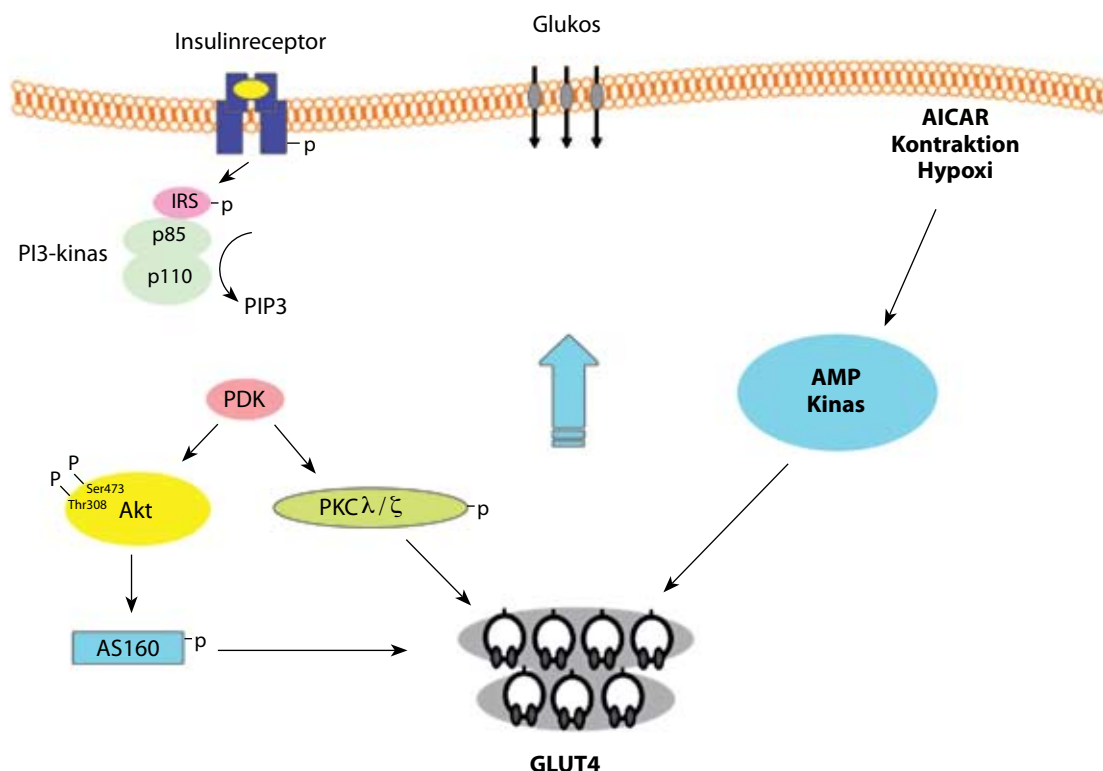
Insulinets inverkan på glukostransport och metabolism regleras av aktiveringen av signaltransduktionsvägar som förmedlas av insulinreceptorn (Figur 1). Insulinreceptorn är ett heterotetramert membranglykoprotein som består av två α - och två β -subenheter (6). Insulinet binds till de extracellulära α -subenheter, vilket leder till att tyrosinkinaset i insulinreceptorns β -subenhet aktiveras. Detta medför att flera viktiga intracellulära proteiner fosforyleras, bl.a. olika insulinreceptorsubstrat (IRS) som förmedlar insulinsignalen till effektorer längre fram i reaktionskedjan.

IRS-proteiner verkar som dockningsproteiner för signalmolekyler längre fram i kedjan, bl.a. den regulatoriska subenheten

FÖRFATTARNA

Docent **Heikki Koistinen** är specialist i inre medicin vid HUCS. Han har tidigare forskat i diabetes vid bl.a. Karolinska Institutet i Stockholm, för närvarande forskar han vid Minerva.

Till Heikki Koistinen's forskningsgrupp hör **Paulina Skrobuk**, MSc i bioteknik, FK **Stephanie von Krämer**, genetikstud. vid HU och MK **Johannes Kärkkäinen** med.stud. vid HU.



Figur 1.

En förenklad framställning av signalvägar som reglerar glukotransport in i skelettmuskel. Bindning av insulin till dess receptor leder till tyrosinfosorylering av insulinreceptorsubstratproteiner (IRS), vilket leder till aktivering av lipidkinas-fosfatidylinositol-3-kinas och bildning av sekundärbudbärar-PIP3. Detta aktiverar atypiskt proteinkinas C (PKC λ/ζ) och proteinkinas B/Akt via PDK (fosfoinositid-beroende proteinkinas) och resulterar i att det främjande glukotransportproteinet GLUT4 förflyttas till plasmamembranet. Överföring, dockning och fusion av GLUT4-vesiklerna till plasmamembranet möjliggör insulinstimulerad glukotransport in i muskelcellen. Vid insulinberoende stimulering av glukotransport och överföring av GLUT4 deltar AMP-aktiverad proteinkinas (AMPK), som aktiveras av förändringar i cellens energibalans t.ex. efter hypoxi eller muskelsammandragning. AICAR är en allmänt använd nukleosidanalog för aktivering av AMPK vid metabola studier. p85 = reglerande subenhet till PI3-kinas, p110 = katalytisk subenhet till PI3-kinas, AS160 = Akt-substrat 160.

fosfatidylinositol (PI) 3-kinas 85-kDa. Detta lipidkinas är nyckelenzymet i den klassiska signaltransduktionsvägen för insulin, och det reglerar ett antal biologiska processer som omfattar glukotransport, celltillväxt och differentiering, omorganisering av cellskelettet samt förflyttning av vesikler (7). Efter insulinstimulering associeras PI 3-kinas med tyrosinfosorylerad IRS-1 och katalyserar bildandet av fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfat. Detta leder till aktivering av de längre fram i kedjan belägna effektorerna proteinkinas B (PKB/Akt) och de atypiska kinas-C-isoformerna PKCζ och PKCλ, och till sist till överföring av glukotransportör 4 (GLUT4) till plasmamembranet samt till ökning av glukotransportaktiviteten (8).

Det faktum att det finns flera isoformer av effektorproteinerna gör att insulinsignaleringen blir mera invecklad och att regleringen i human skelettmuskel blir mera specifik. *siRNA*-medierad genspjälkning användes för att specifikt hämma uttrycket av IRS-1, IRS-2, Akt1 eller Akt2 i primära humana muskelceller, för att bestämma deras roll i glukos- och lipidmetabolismen. Dessa experiment avslöjade att IRS-1 och Akt2 behövs för myoblastdifferentiering och glukosmetabolism, medan IRS-2 och Akt1 har en stor roll vid lipidmetabolismen (9). Sålunda har insulinets signalvägar till metabola slutskeden olika isoformspecifika roller, vilket visas av hur IRS-1/Akt2 kontrollerar glukosmetabolism och hur IRS-2/Akt1 kontrollerar lipidmetabolismen.

Tekniker för att studera intakt human skelettcell *in vitro*

Det har varit en stor metodologisk utmaning att studera de molekylära händelser som leder till insulinresistens i intakta humana vävnader. Trots att metabola helkroppsundersökningar är viktiga, så kan flera cirkulerande faktorer som graden av glykemi, lipidemi och flera hormonella och inflammatoriska faktorer inverka sekundärt på de metabola reaktionerna. För att komma över denna brist har det varit nödvändigt att utveckla *in vitro*-metoder för att få objektiva data om regleringen av insulinets verkan. Användande av isolerade strimlor av skelettmuskel gör det möjligt att göra metabola undersökningar under strikt kontrollerade förhållanden. Det går också att exponera isolerade strimlor från samma försöksperson för flera olika slags störningar. Oskadade skelettmuskelstrimlor kan fås från *musculus rectus abdominis* vid operationer eller från *vastus lateralis*-muskeln med lokalbedövning (10). Studier som har använt preparat med hela muskelstrimlor har visat att insulinresistenta patienter, t.ex. sjukligt feta, T2DM-patienter och kvinnor med gestationsdiabetes, har nedsatt insulinstimulerad glukostransportaktivitet (11). Dessa data visar att insulinresistens i skelettmuskel beror på defekter i glukostransporten, vilket stämmer väl överens med NMR-studierna. (5).

Defekter i insulinets signaltransduktion i human skelettmuskel

Defekter i insulinets signalhändelser kan förklara insulinresistens på glukostransportnivå i skelettmuskel. Data om defekter i själva insulinreceptorn är tvetydiga, eftersom fosforyleringen av insulinreceptorn har rapporterats vara nedsatt eller oförändrad i T2DM (10, 11). Insulinstimulerad IRS-1-tyrosinfosforylering och PI-3-kinasaktivitet är dock nedsatta i skelettmuskel från personer med T2DM, utan några förändringar i IRS-1-proteininnehållet (12, 13). Defekter i aktivering av de atypiska PKC isoformerna har också rapporterats vid insulinresistens i skelettmuskel vid nedsatt glukostolerans (IGT) och T2DM (14, 15). Insulinets inverkan på PKB *in vivo* är normal hos personer med T2DM (16). Insulinstimulerad fosforylering av PKB/Akt vid Thr³⁰⁸ och Akt-substrat 160 (AS160) är dock nedsatt vid T2DM (17). Dessa data verkar antyda att defekter i proximala insulinsignaleringshändelser leder till insulinresistens i T2DM. I

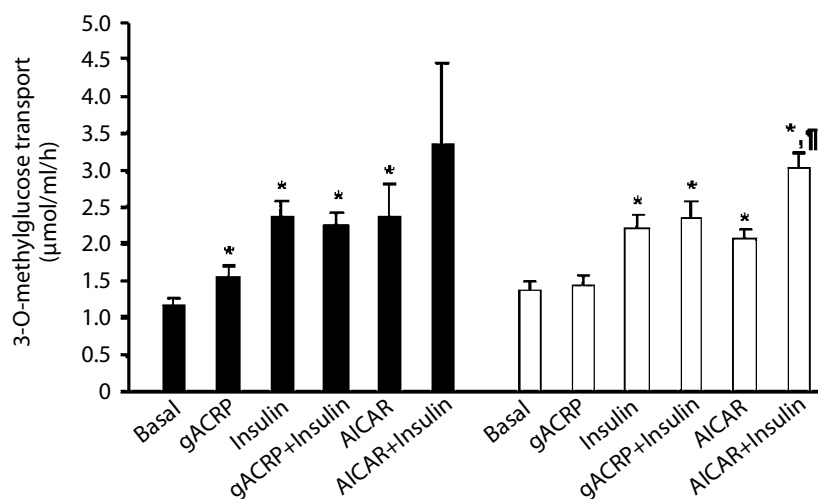
en kohort av normalt glukostoleranta första gradens släktingar till T2DM-patienter ser man dock en frikoppling mellan glukostransport och proximala insulinsignaleringshändelser: insulinets inverkan på glukostransport är nedsatt med 38 procent trots att signaleringen på Akt- och AS160-nivån är normal (18). Dessa data indikerar en möjlighet att minskad GLUT4-trafikering är ett tidigt steg i utvecklingen av T2DM.

Överföring av GLUT4

Insulin stimulerar glukostransport i skelettmuskel genom att inducera överföring av GLUT4 från ett intracellulärt vesikulärt utrymme till plasmamembranet (19) (Figur 1). Den subcellulära lokaliseringen av GLUT4 och dess överföring till plasmamembranet sker på ett avvikande sätt i T2DM-patienters skelettmuskel (20), vanligen utan förändringar i den sammanlagda mängden GLUT4-protein (10, 11). Dessa data tyder på att defekter i trafikeringen och överföringen av GLUT4 är en orsak till insulinresistens i skelettmuskel. Ett sätt att undersöka om en allmän försämring i GLUT4-trafikering bidrar till insulinresistensen är att studera transportöröverföring som följd av andra stimuli än insulin. Hypoxi leder till en av insulin oberoende ökning av glukostransport och GLUT4-överföring (Figur 1). Den hypoxi-inducerade ökningen av cellytans GLUT4-innehåll och glukostransport är dämpad i skelettmuskel från T2DM-patienter (21). Dessutom har undersökningar med användning av nukleosidanalogen 5-aminoimidazol-karboxamin-ribosid (AICAR) för att aktivera AMPK-signalvägar (som ökar glukostransporten oberoende av insulin) (Figur 1) visat minskat insulin- och AICAR-stimulerat gensvar på glukostransport och GLUT4-innehåll på cellytan hos män med T2DM (22). Dessa data tyder alltså på att en global defekt i GLUT4-trafikering förekommer i skelettmuskel från patienter med T2DM.

Effekten av cytokiner på glukosmetabolismen i skelettmuskel

Adiponektin är en adipokin som ökar insulinkänsligheten i flera cell- och djurmodeller (23). Plasmakoncentrationen av adiponektin är nedsatt vid tillstånd med insulinresistens, som fetma och typ 2-diabetes. Exponering med adiponektinets globformade domän ökar insulinkänsligheten hos gnagare och stimule-



Figur 2.

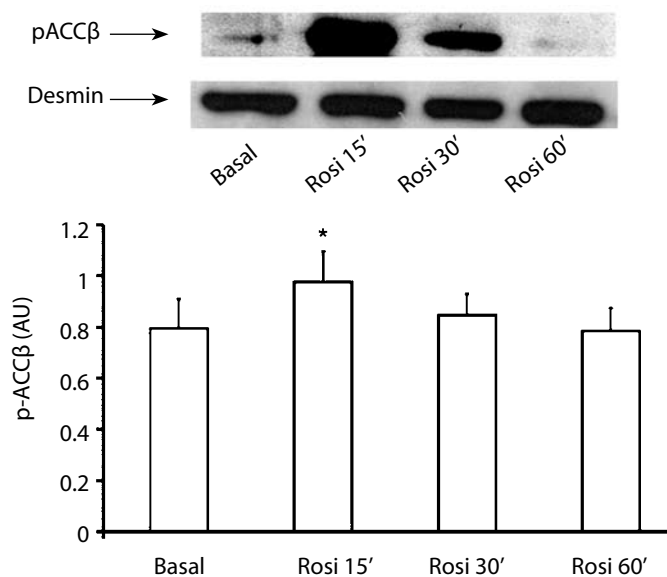
Öppna muskelbiopsier erhöjts kirurgiskt från muskeln *vastus lateralis* från 12 män med typ 2-diabetes (svartakolumner) och 15 icke-diabetiska män (öppnakolumner). Muskelstrimlor isolerades och exponerades för globformat adiponektin (2,5 µg/ml), insulin (120 nM) eller AICAR (1 nM) i 60 minuter. Glukostransporten analyserades med avseende på ansamlingen av intracellulärt 3-O-metyl-[3H]-glukos. gACRP = globformat adiponektin, * $p < 0,05$ jämfört med basal, ¶ $p < 0,05$ jämfört med respektive insulinstimulerade tillstånd. Data presenteras som medeltal ± standardfel. Reproducerat från originalpublikationen med vänligt tillstånd (26). Copyright Wiley.

rar glukostransporten i isolerad skelettmuskel från råttor (24, 25). Eftersom adiponektin och dess signalväg verkar vara väsentliga vid behandling av det metabola syndromet, är det kliniskt relevant att utvärdera adiponektinets metabola effekter direkt i human skelettmuskel. Vi fastställde effekten av globformat adiponektin på glukostransport i isolerade skelettmuskelstrimlor från *vastus lateralis*-muskelbiopsier från en kohort av 12 män med typ 2-diabetes och 15 män utan diabetes (26). Då isolerad skelettmuskel från män med typ 2-diabetes exponerades med globformat adiponektin ökade glukostransporten 1,3-faldigt (Figur 2). Det var överraskande att globformat adiponektin inte påverkade glukostransporten i isolerad skelettmuskel från icke-diabetiska män. Detta berodde inte på skillnader i uttrycket av adiponektinreceptorn, eftersom proteininnehållet i båda isoformerna av adiponektinreceptorn (AR1 and AR2) var likadant hos icke-diabetiska män och män med T2DM. Adiponektin modifierade varken basal eller insulinstimulerad fosforylering av Akt vid Ser⁴⁷³ eller Thr³⁰⁸ i någondera gruppen. Dessa data ger evidens som tyder på att adiponektin reglerar glukosmetabolismen via Akt-oberoende reaktionsvägar i skelettmuskel vid typ 2-diabetes.

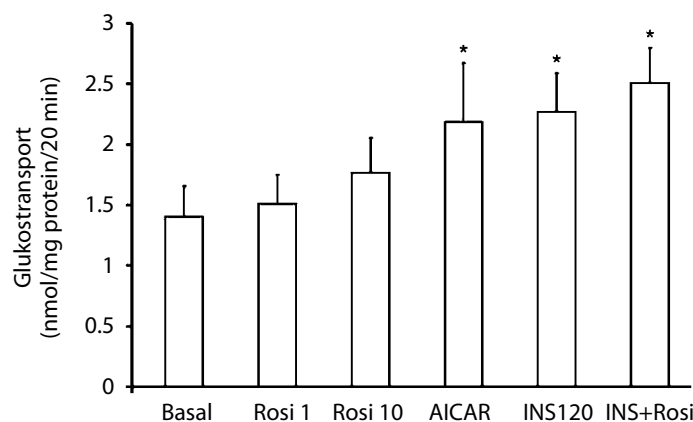
Interleukin 6 (IL-6) är ett proinflammatoriskt cytokin som har en central roll i hematopoiesen och vid världens försvarsmekanismer, och det utgör en kraftig stimulus för produktionen av många akutfasproteiner i levern. På basis av undersökningar på adipocyter och hepatocyter har det antagits att IL-6 reglerar insulinkänsligheten negativt. Plasmanivån av IL-6 är dessutom förhöjd vid insulinresistenta tillstånd. För att undersöka de direkta effekterna av IL-6 på glukosmetabolism i human skelettmuskel preparerades skelettmuskelstrimlor från *vastus lateralis*-biopsier från en kohort friska män (27). IL-6 ökade signifikant glukostransporten och glykogensyntesen i human skelettmuskel, men IL-6 inverkar inte på insulinstimulerad glukostransport. Således ökar IL-6 glukosmetabolismen direkt i human skelettmuskel i vila. Eftersom skelettmuskel kan bli en primär källa för IL-6 under ansträngning, tyder dessa data på en viktig autokrin roll för IL-6 vid regleringen av substratmetabolism vid muskelsammandragning.

AMPK och glukostransport

AMP-aktiverat proteinkinase (AMPK) är en central reglerare av cellens energitillstånd och



Figur 3.
Fosforylering av ACC β . Exponering av icke-diabetisk muskel för 10 μ M rosiglitazon resulterade i övergående ökning av fosforyleringen av ACC β . Likartad proteinmängd i gelet bekräftades av oförändrad expression av desmin AU = godtyckliga enheter. * $p = 0,051$ jämfört med basal ($n = 5$). Reproducerat från originalpublikationen (32) med vänligt tillstånd. Copyright Elsevier.



Figur 4.
Öppna muskelbiopsier erhöles kirurgiskt från muskeln *vastus lateralis* från 15 icke-diabetiska män. Muskelstrimlor isolerades och exponerades för 1 eller 10 μ M rosiglitazon (Rosi 1 och Rosi 10), AICAR (1 mM), insulin (120 nM) eller en kombination av 10 μ M rosiglitazon och 120 nM insulin i 60 minuter. * $p < 0,05$ jämfört med basal. Reproducerat från originalpublikationen (32) med vänligt tillstånd. Copyright Elsevier.

av olika metabola reaktionsvägar. En ökning av det intracellulära förhållandet mellan AMP och ATP aktiverar AMPK, vilket leder till stimulering av metabola processer, exempelvis glukostransport och oxidation av fettsyror, som försöker återställa cellens energibalans (28). I tidigare experiment använde vi nukleosidanalogen AICAR för att aktivera AMPK (22). Muskelstrimlor isolerades från öppna muskelbiopsier från friska män samt från män

med T2DM. T2DM-muskel var insulinresistent, vilket visades av nedsatt glukostransport och GLUT4-överföring som svar på insulin. När T2DM-muskel exponerades för en kombination av AICAR och insulin normaliserades dessa defekter dock helt. Sammantaget visar dessa data att AMPK är ett attraktivt mål för behandling av insulinresistens.

Tiazolidinedioner (TZD), som rosiglitazon eller pioglitazon, används allmänt som lä-

kemedel mot diabetes (29). TZD förbättrar insulinkänsligheten i hela kroppen genom att inrikta sig på peroxisomproliferatoraktiverad receptor- γ (PPAR γ), en transkriptionsfaktor med högt uttryck i adipocyter (30). Aktivering av PPAR γ leder till förändringar i transkriptionen av ett antal gener som reglerar adipogenesen samt upptaget och lagringen av fettsyror. Detta leder till omfördelning av lipider från cirkulationen, musklerna och levern till fettvävnad, vilket resulterar i förbättrad insulinkänslighet. Även om adipocyten anses vara TZD:s primära mål, är det också möjligt att TZD har direkta metabola effekter på andra vävnader, som skelettmuskel och lever. Akut exponering för TZD aktiverar direkt AMPK och ökar glukosupptaget och palmitatoxideringen i intakt skelettmuskel från gnagare (31). Direkta metabola effekter av TZD i intakt human skelettmuskel har dock inte påvisats. Vi rekryterade 15 icke-diabetiska män för att studera om rosiglitazon påverkar glukostransport i isolerade skelettmuskelstrimlor (32). Isolerade muskelstrimlor exponerades för rosiglitazon, AICAR eller insulin *in vitro*. Fosforylering av acetyl-CoA-karboxylas β (ACC β) ökade tillfälligt som svar på rosiglitazon (Figur 3). Detta visar att AMPK aktiverades i muskelstrimlor som svar på rosiglitazon, eftersom ACC β är en välkänd målmolekyl av AMPK (28). Som väntat ökade AICAR och insulin glukostransporthastigheten i isolerade muskelstrimlor. Rosiglitazon påverkade dock inte glukostransporthastigheten i intakt human skelettmuskel (Figur 4). Eftersom signalvägen AMPK-ACC är av central betydelse för regleringen av fettsyreoxidationen (33), är det möjligt att rosiglitazon kan modifiera lipidmetabolismen akut i intakt human skelettmuskel. Denna hypotes bör prövas i framtida experiment.

Avslutande kommentarer

Diabetes är ett livslångt tillstånd som kan leda till allvarliga medicinska komplikationer, bland annat hjärtsjukdom, stroke och njursjukdom. Den pågående pandemin av typ 2-diabetes innebär en enorm ekonomisk börda för hälso- och sjukvården, och den ökar också mängden mänskligt lidande. Det finns ett trängande behov av ett integrerat forskningsgrepp som kombinerar både kliniska och basvetenskapliga undersökningar för att identifiera nya angreppspunkter för att förebygga diabetes och förbättra behandlingen av sjukdomen.

Tack

Forskningen i vår grupp har möjliggjorts av finansiering från Finlands Akademi, Minervastiftelsen, Novo Nordisk Fonden, Sigrid Jusélius Stiftelse och Stiftelsen för diabetesforskning.

Docent Heikki Koistinen

Medicinska Forskningsinstitutet Minerva

Biomedicum 2U

Stockholmsgatan 8

00290 Helsingfors

heikki.koistinen@helsinki.fi

Referenser

1. Kahn CR: Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994;43:1066–84.
2. DeFronzo RA: Lilly lecture 1987. The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988;37:667–687.
3. Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L: Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1989;321:337–343.
4. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C: Insulin Resistance and Insulin Secretory Dysfunction as Precursors of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Prospective Studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 1993;329:978–92.
5. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI: Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. 1999; *N Engl J Med* 341:240–246.
6. Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR: The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem* 1982;257:10392–99.
7. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333:47–490.
8. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:85–96.
9. Bouzakri K, Zachrisson A, Al-Khalili L, Zhang BB, Koistinen HA, Krook A, Zierath JR: siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metabolism* 2006;4:89–96.
10. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H: Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000;43:821–835.
11. Koistinen HA, Zierath JR: Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. *Ann Med* 2002;4:410–418.
12. Krook A, Bjornholm M, Galuska D, Jiang X, Fahlman R, Myers M, Wallberg-Henriksson H, Zierath J: Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:284–292.
13. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ: Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* 2000;105:311–320.
14. Kim Y-B, Kotani K, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB: Insulin-Stimulated Protein Kinase C α/ζ Activity Is Reduced in Skeletal Muscle of Humans With Obesity and Type 2 Diabetes: Reversal With Weight Reduction. *Diabetes* 2003;52:1935–42.

15. Beeson M, Sajan MP, Dizon M, Grebenev D, Gomez-Daspet J, Miura A, Kanoh Y, Powe J, Bandyopadhyay G, Standaert ML, Farese RV: Activation of Protein Kinase C- ζ by Insulin and Phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 Is Defective in Muscle in Type 2 Diabetes and Impaired Glucose Tolerance: Amelioration by Rosiglitazone and Exercise. *Diabetes* 2003;52:1926–34.
16. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB: Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1999;104:733–741.
17. Karlsson HKR, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H: Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes* 2005;54:1692–97.
18. Karlsson HKR, Ahlsten M, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Koistinen HA: Insulin Signaling and Glucose Transport in Skeletal Muscle From First-Degree Relatives of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 2006;55:1283–88.
19. Douen A, Ramlal T, Rastogi S, Bilan P, Cartee G, Vranic M, Holloszy J, Klip A: Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise- recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1990;265:13427–30.
20. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD: Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* 1998;101:2377–86.
21. Ryder J, Yang J, Galuska D, Rincon J, Bjornholm M, Krook A, Lund S, Pedersen O, Wallberg-Henriksson H, Zierath J, Holman G: Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:647–654.
22. Koistinen HA, Galuska D, Chibalin AV, Yang J, Zierath JR, Holman GD, Wallberg-Henriksson H: 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1066–72.
23. Kadowaki T, Yamauchi T: Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–451.
24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–946.
25. Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:16309–313.
26. Kuoppamaa H, Skrobuk P, Sihvo M, Hiukka A, Chibalin AV, Zierath JR, Koistinen HA: Globular adiponectin stimulates glucose transport in type 2 diabetic muscle. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2008;24:554–562.
27. Glund S, Deshmukh A, Long YC, Moller T, Koistinen HA, Caidahl K, Zierath JR, Krook A: Interleukin-6 Directly Increases Glucose Metabolism in Resting Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 2007;56:1630–37.
28. Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774–785.
29. Quinn CE, Hamilton PK, Lockhart CJ, McVeigh GE: Thiazolidinediones: effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology* 2008;153:636–645.
30. Tontonoz P, Spiegelman BM: Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry* 2008;77:289–312.
31. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao T-S, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E: Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E175–181.
32. Skrobuk P, Kuoppamaa H, Hiukka A, Koistinen HA: Acute exposure to rosiglitazone does not regulate glucose transport in intact human skeletal muscle. *Metabolism*, 2009 In Press
33. Long YC, Zierath JR: AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1776–83.

Riktad analys av genuttryck med genomkontrollerad RT-PCR

JAKOB STENMAN

I dag används en klassifikation baserad på vävnadspatologin tillsammans med kliniska kriterier och radiologiska undersökningar för att dela in cancerpatienter i prognostiskt åtskiljbara grupper. Inom dessa grupper sker dock stora variationer, och det är svårt att ge en prognos på individnivå med nuvarande diagnostiska metoder. Under de senaste åren har en ny typ av prognostiska tester s.k. "multigene predictors" (multigenetisk prediktoranalys) utvecklats för detta syfte (2–5). De här metoderna baserar sig på uttrycksanalys av flera olika gener i tumörvävnad som avlägsnats under operation eller med hjälp av en diagnostisk nål- eller borstbiopsi. Syftet är att karaktärisera tumörens egenskaper för att kunna skraddarsy behandling och uppföljning på det sätt som mest gynnar patienten (1).

Bakgrund

Med hjälp av DNA-arrayteknik har en stor mängd gener identifierats som potentiellt kunde användas för karaktärisering av tumörer på basen av mRNA-uttrycksmönster. Genom att kombinera flera gener i samma test och utnyttja statistiska verktyg för att analysera resultaten har man lyckats utveckla prognostiska tester för bl.a. bröstcancer. Denna nya typ av tester förväntas spela en avgörande roll för valet av behandlingsform samt uppföljningen av flera olika former av cancer. Redan under år 2008 gjordes över 40 000 multigenetiska prediktoranalyser på bröstcancerpatienter i USA. Flera kommersiella laboratorier som erbjuder centraliserad provanalys har dessutom etablerat sig.

För att främja utvecklingen och valideringen av den här typen av tester är det ytterst viktigt att man kan analysera arkiverade vävnadsprover från patienter för vilka det redan finns uppföljningsdata. Trots att tester med fördel kunde utföras på färsk vävnad,

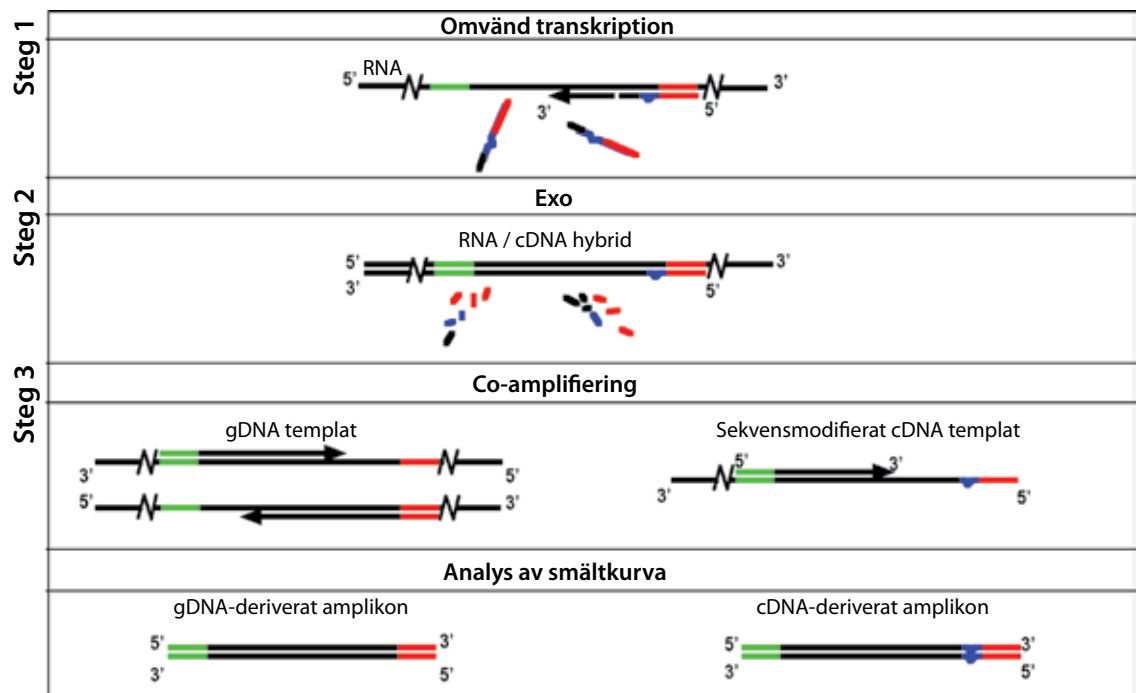
är så gott som allt arkivmaterial formalinfixerat och ingjutet i paraffin. Med nuvarande metoder är det svårt att mäta genuttrycket i formalinfixerade vävnadsprover på grund av att mRNA i proverna har spjälkts under fixeringen och lagringen (6, 7). För detta ändamål har vi utvecklat en ny metod: Genome Controlled RT-PCR som möjliggör exakt och reproducerbar genuttrycksanalys utgående från små cell- eller vävnadsprover samt från formalinfixerade vävnadsprover ingjutna i paraffin (8, 9). Med hjälp av denna metod kan prognostiska kandidatgener testas på stora arkivmaterial i syfte att utveckla en ny typ av cancerdiagnostiska analyser för riskbedömning samt olika vårdformers potentiella effektivitet på individnivå. Vi strävar efter att karaktärisera tumörer ur flera olika perspektiv genom att utveckla genpaneler för analys av regleringen av cellcykeln, tillväxt och lokal invasion, metastaseringspotential samt neo-vaskularisering. För att så effektivt som möjligt kunna tolka och utnyttja resultaten utvecklar vi statistiska multivariatmodeller för varje enskild genpanel.

FÖRFATTAREN

MD **Jakob Stenman** är barnkirurg på enheten för transplantation och leverkirurgi vid Kirurgiska sjukhuset, HNS och forskar både vid Haartman-institutet och Minerva.

Metoden genomkontrollerad RT-PCR i ett nötskal

Den kvantitativa analysen av RNA-uttrycket i cell- eller vävnadsprover består av en tudelad process: cDNA-syntes och behandling med exonukleas samt PCR-amplifiering med kvan-



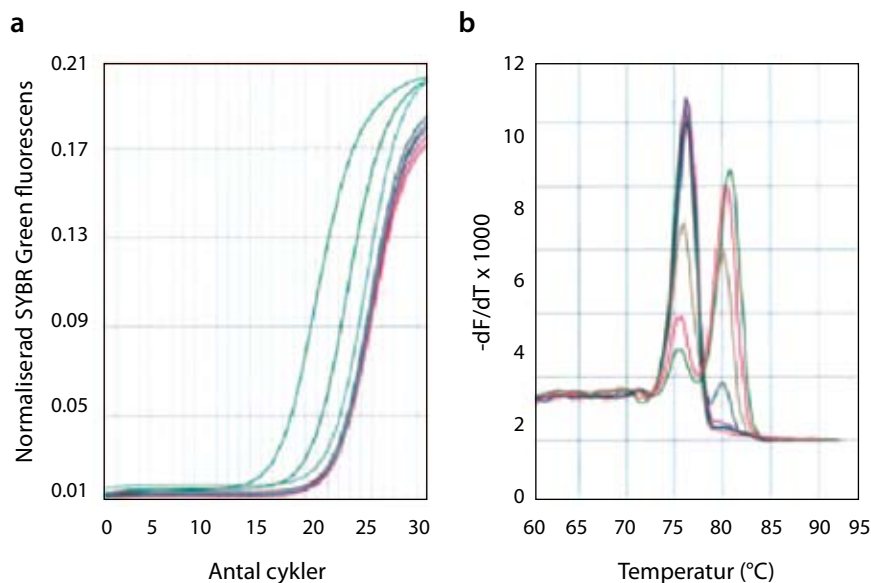
Figur 1. Schematisk överblick över metoden genomkontrollerat RT-PCR. Sekvensmodifierade primrar används i steg 1 för att åstadkomma en märkning av det syntetiserade cDNA:t. Dessa primrar avlägsnas genom behandling med exonukleas före amplifieringsfasen. Genomiskt DNA tillsätts varje prov som sedan uppdelas i separata genspecifika amplifieringsreaktioner. Kvantitativ mätning av PCR-produkter som härstammar från cDNA- och genomiskt DNA görs efter amplifieringen med analys av smältkurvan.

titativ analys av smältkurvan (melting curve). Metoden baserar sig på relativ kvantifiering av modifierat cDNA jämfört med genomiskt DNA. Normalt genomiskt DNA tillsätts i varje prov och används som en universell intern standard för människans alla gener. Under cDNA-syntesen modifieras sekvensen i cDNA jämfört med RNA-templatet med hjälp av primrar där några nukleotider bytts ut. På det här sättet kommer den modifierade cDNA-sekvensen att inkorporeras i motsvarande PCR-produkter i amplifieringsfasen där cDNA och genomiskt DNA amplifieras kompetitivt i samma rör och med samma primersekvenser. Eftersom varje gen är lika representerad i genomet i normalt DNA, återspeglar den relativa nivån av modifierat cDNA jämfört med genomiskt DNA den ursprungliga mängden cDNA. Dessa relativa cDNA-/DNA-värden kan sedan användas för att jämföra uttrycket av mRNA från olika gener i det ursprungliga provet. Efter cDNA-syntesen avlägsnas resterande modifierade primersekvenser med exonukleasbehandling för att hin-

dra en fortsatt modifiering av PCR-produkter under amplifieringsfasen (Figur 1). Efter att amplifieringsreaktionen har avslutats, värms proverna långsamt upp under fyra minuter i en analys av smältkurvan. I det här skedet mäter man minskningen i fluorescens då de dubbelsträngade PCR-produkterna smälter. Modifierat cDNA och genomiskt DNA smälter vid olika temperaturer med en skillnad på ca 2–3 °C (Figur 2). Mängden smältande DNA kan noggrant mätas genom integrering av de toppar som uppstår efter negativ derivering av spektret för smältkurvan.

Provhantering och analys

RNA har isolerats från över 2 000 formalinfixerade vävnadsprover ingjutna i paraffin som arkiverats och förvarats i upp till 30 år. Från de här blocken stansas en till två cylindriska provbitar men en diameter på 1 mm. Provbitarna kokas i 30 minuter i en kaotrop lösning av guanidin-tiocyanat som effektivt inaktiverar RNA:s enzymer. Från detta ho-



Figur 2.

Panel a: PCR-amplifiering och analys av smältkurvan av en 10:1 utspädningsserie av cDNA syntetiserat från 10^{10} kopior trypsinogen-1 cRNA. cDNA motsvarande $10 \cdot 10^8$ kopior cRNA amplifierades kompetitivt mot 20 ng genomiskt DNA. Panel b: Analysen av smältkurvan särskiljer de två komponenterna i PCR-produkten på basis av en skillnad i smälttemperatur.

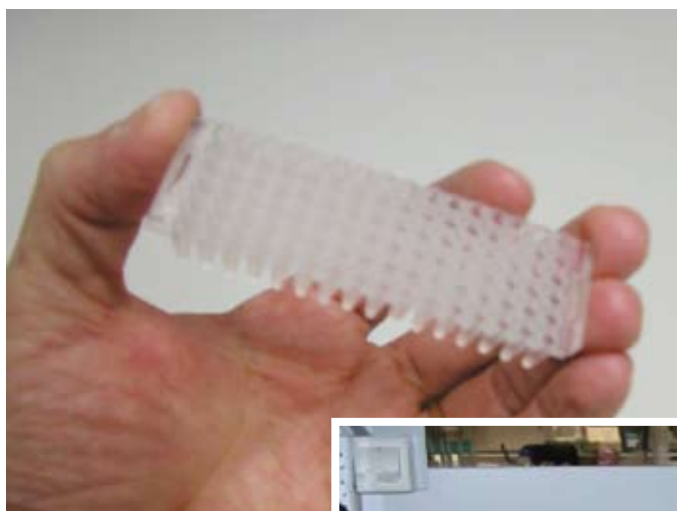
mogenat isoleras RNA med en modifierad version av Chomczynskis och Sacchis klassiska fenolextraktionsmetod. Det kristalliserade RNA löses i renat vatten och förvaras i -80°C fram till analysen. För varje prov görs cDNA-syntesen särskilt i 20 μl reaktioner. Dessa behandlas med exonukleas, genomiskt DNA tillsätts och provet fördelas i separata 10 μl PCR-reaktioner. Vid en typisk analys av 16 gener fördelas varje prov i 48 separata PCR reaktioner. Pipetteringen görs med hjälp av en liten pipetteringsrobot i 384-format som på ca 40 min. fyller fyra 96-gropars PCR-plattor. PCR-amplifieringen görs i 35 cykler under ca 40 min med en avslutande analys av smältkurvan på 4 min. Med fyra stycken 96-gropars PCR-apparater klarar vi av att analysera ca 40 prover om dagen (Figur 3).

Kliniska studier

Prognosbedömning vid tjocktarmscancer

Tjocktarmscancer är en av de vanligaste cancerformerna hos både män och kvinnor i utvecklade länder. Diagnosen kommer ofta sent i och med att sjukdomen sällan ger upphov till symptom förrän primärtumören redan är relativt stor. I detta skede genomgår patienterna i de flesta fall en operation där

man avlägsnar den del av tarmen där tumören finns, samt även lokala lymfkörtlar för att bedöma graden av eventuell spridning. Enligt Dukes klassifikation indelas tjocktarmscancer i stadier från A till D. I det vanligaste stadiet, Dukes B, har tumören vuxit genom tarmväggen men inte invaderat lokala lymfkörtlar. I denna patientgrupp är risken för att sjukdomen ska recidivera efter operationen ca 20 procent om ingen annan behandling ges. Cellgiftsbehandling minskar denna risk men medför samtidigt både morbiditet i form av biverkningar samt kostnader för även de ca 80 procent av patienterna som redan botats med operation och därmed inte har någon nytta av ytterligare behandling. Syftet med forskningsprojektet är att vid behandling av Dukes B koloncancer identifiera förändringar i genuttrycket som korrelerar med tumörens aggressivitet och med en förhöjd risk för återfall. Vi strävar efter att utveckla laborietester som kunde underlätta valet av behandlingsstrategi efter primäroperation av dessa patienter. Genom att jämföra RNA-uttrycksmönster i arkiverade vävnadsprover med motsvarande kliniska data hoppas vi kunna identifiera kliniskt relevanta gener samt kombinationer av gener för individuell riskbedömning.



Figur 3.
PCR-amplifiering och analys
av smältkurvan görs i 10 μ l-
reaktioner. Då 16 gener
analyseras, fördelas varje
prov i 48 gropar. Reaktions-
volymen är 10 μ l, och pipet-
teringen sker med robot för
att eliminera fel och påskynda
analysen.



Bröstcancer, bedömning av behandlingsstrategi och prognosbedömning

Bröstcancer är den vanligaste formen av cancer hos kvinnor i Finland i dag och drabbar en av åtta kvinnor i något skede av livet. Under de senaste decennierna har stora framsteg gjorts i behandlingen av bröstcancer i och med att flera nya specifika läkemedel har utvecklats. Dessutom har tidig diagnos på grund av sällning förbättrat behandlingsresultaten avsevärt. Trots detta utgör sjukdomen fortfarande ett stort problem i och med den höga inciden- sen. Projektet är indelat i två separata grenar. Målsättningen är dels att identifiera prognos- tiska modeller som baserar sig på individuell genuttrycksprofilering för patienter med tidigt diagnostiserad bröstcancer (pT1N0M0). I den andra grenen av forskningsprojektet är vi ute efter att utveckla ett diagnostiskt test som innefattar mål-molekylerna för alla specifika cytostatika som för närvarande används. Genom att jämföra RNA-uttrycksmönster i

arkiverade vävnadsprover med kliniska data som insamlats i samband med olika kliniska studier och senare kompletterats, hoppas vi att kunna utveckla tester för att göra riskbe- dömmingar men framför allt för att kunna skraddarsy den medicinska behandlingen av bröstcancer individuellt för varje patient.

Diagnostik av premaligna tillstånd i matstrupen

Barrets esofagus är en förändring av slemhin- nan i nedre delen av matstrupen, s.k. intestinal metaplasi, som uppkommer vid långvarig gastroesofageal reflux. Denna förändring kan upptäckas kliniskt vid gastroskopi, och diagnosen fastställs histologiskt från biopsier tagna från det drabbade området. Barrets esofagus innebär en klart förhöjd cancerrisk, och dödligheten i matstrupscancer är mycket hög om sådan cancer utvecklas. Tidigare var partiell esofagektomi den enda möjligheten till definitiv behandling. Sedan några år till-

baka är det möjligt att genom ett relativt litet gastroskopiskt ingrepp skala bort den sjuka slemhinnan om den anses innebära en betydligt förhöjd cancerrisk. Målet med projektet är att analysera frysta biopsier från patienter med Barrets esofagus samt från kontrollpatienter för att utveckla ett test som bättre kunde förutspå en förhöjd cancerrisk än nuvarande histologiska metoder.

Diagnostik av förändringar i gallvägarna

Primär skleroserande kolangit (PSC) är en sjukdom som orsakar inflammation och förträngningar i gallvägarna. Sjukdomen förekommer ofta i samband men ulcerativ kolit. PSC innebär en förhöjd risk för gallvägscancer. Denna form av cancer är i de flesta fall en obotlig sjukdom, och den enda kurerande åtgärden är förebyggande levertransplantation. För tillfället finns inga pålitliga markörer för en förhöjd cancerrisk hos PSC-patienter. Vi strävar efter att utveckla undersökningar av genuttrycket i celler tagna som ett borstprov i samband med en ERCP-undersökning. Syftet är att utveckla en metod för bedömning av den optimala tidpunkten för levertransplantation.

Prognosbedömning vid prostatacancer

Prostatacancer är i dag den vanligaste formen av cancer hos män. I och med omfattande användning av PSA-tester har antalet fall av upptäckt prostatacancer ökat dramatiskt under de senaste tio åren. Det finns flera olika vårdformer för prostatacancer, och därtill används aktiv uppföljning som ett alternativ till behandling i många fall. Till de alternativa vårdformerna hör operation, strålbehandling och hormonbehandling. De kan användas var för sig eller i olika kombinationer beroende på patientens ålder och allmäntillstånd samt sjukdomens stadium. Vi undersöker genuttrycksmönster i operationspreparat från arkiverade vävnadsprover och jämför dessa med motsvarande kliniska data. Målet är att hitta genkombinationer vars uttryck korrelerar med tumörens beteende på lång sikt samt med responsen på olika vårdformer.

Konklusion

I och med utvecklingen av ett stort antal nya specifika läkemedel har betydelsen av att kunna rikta olika vårdformer ökat med hänsyn till både behandlingsresultat och kostnader. Genom att bestämma mRNA-uttrycksprofiler på grupper av prognostiskt signifikanta gener i vävnads- eller cellprover strävar vi efter att förbättra den prognostiska precisionen och underlätta valet av behandlingsstrategi på individnivå. Vi försöker bygga upp en omfattande repertoar av genpaneler för undersökning av centrala cellfunktioner med tanke på diagnos och monitorering av olika cancerformer samt premaligna sjukdomstillstånd. Etiska lov har beviljats för alla delprojekt och studierna genomförs i nära samarbete med de kliniker som har ansvaret för insamlingen av uppföljningsdata. Forskningsprojektet har stötts finansiellt av Tekes, Finska Läkaresällskapet och Minervastiftelsen. Metoden Genome controlled RT-PCR utvecklas i samarbete med Finnzymes Oy.

MD Jakob Stenman
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
jakob.stenman@helsinki.fi

Referenser

1. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. *J Pathol.* 2001 Sep;195(1):41–52.
2. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. *N Engl J Med.* 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
3. O'Shaughnessy JA. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):615–617.
4. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, Kratzke R, Watson MA, Kelley M, Ginsburg GS, West M, Harpole DH Jr, Nevins JR. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):570–580.
5. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):560–569.
6. Stenman J, Finne P, Ståhl A, Grénman R, Stenman UH, Palotie A, Orpana A. *Nat Biotechnol.* 1999 Jul;17(7):720–722.
7. Stenman J. and Orpana, A. *Nat Biotechnol.* 2001 Nov;19(11):1011–2.
8. Stenman J, Paju A, Rissanen O and Orpana A. *European Patent Register*; WO2005116248A1, pending
9. Stenman J, Paju A, Rissanen O, Tenkanen T, Haglund C, Räsänen J, Salo J, Stenman UH, Orpana A. *Clin Chem.* 2006 Nov;52(11):1988–96.

Minerva 50 år

RALPH GRÄSBECK

Medicinska Forskningsinstitutet Minerva har en beaktansvärd historia eftersom 50 år är en så lång period. En historik publicerades faktiskt redan 1989, då institutet fyllde 30 år (1), och till 50-årsfesten utgavs en broschyr på engelska (2). Orsaken till att institutet grundades och dess historia finns beskrivna i detalj i dessa publikationer, varför jag i det följande först kort rekapitulerar hur det hela började.

På Helsingfors universitets klinik för undervisning på svenska, IV Medicinska kliniken som leddes av professor Bertel von Bonsdorff, forskades det intensivt och seriöst, men forskningslokaler saknades. Chefen kom fram med idén att vi skulle hyra utrymmen, vilket vi sedan gjorde med stipendiemedel. På inrådan av en jurist grundades en stiftelse, som var den formella ägaren till institutet. De första lokalerna hyrdes av det lilla privata sjukhuset Konkordia och stiftelsen döptes till Minervastiftelsen. Dit flyttades bl.a. den isotopapparatur som den klinik som fanns på Maria sjukhus hade skaffat med stipendiemedel. De trånga utrymmena på Maria var f.ö. Finlands första nuklearmedicinska laboratorium.

Det dröjde emellertid inte länge innan de hyrda utrymmena blev för trånga och Minerva måste flytta till allt större lokaler. I dag befinner sig institutet i Minervastiftelsens egna lokaliteter på Mejlans sjukhusområde i Helsingfors i den nya delen av institutionskonglomeratet Biomedicum.

Institutets första doktorsavhandling var cytogenetisk och skrevs av Albert de la Chapelle.

En kort tid senare anslöt sig populationsgenetikern Aldur Eriksson till forskarkretsen. Genetikernas forskning understöddes av Ossian och Betsy Schaumans fond, som administreras av Samfundet Folkhälsan. Den var avsedd för upprätthållandet av ett genetiskt institut, men den krigstida inflationen hade tårt på kapitalet så att idén om ett institut måste skrinläggas. I diskussioner som Folkhälsans dåvarande ordförande "Bebe" von Bonsdorff och jag förde, uppkom idén att man med fondens medel skulle hyra en liten del av Minerva och kalla det Folkhälsans genetiska institut. Så skedde även år 1962. Ända till år 1997 arbetade instituten i symbios. Då hade Folkhälsans fond vuxit till sig så att det

genetiska institutet faktiskt kunde grundas, varefter det separerades från Minerva och har därefter levt ett självständigt liv – dock i nära geografisk och personlig kontakt med Minervakretsen.

Den forskning som bedrevs på Minerva var till en början en fortsättning på den som skett vid IV Medicinska kliniken. Där hade bl.a. Bror-Axel Lamberg med medarbetare sysslat med mångsidig thyreoideaforskning, ställt upp diagnostiska metoder – många av dem baserade på radioaktiv teknik – och undersökt orsaken till den endemiska struman. Lamberg, som utnämndes till chef för institutet, samlade kring sig en aktiv endokrinologisk grupp.

Bertel von Bonsdorffs egen forskning gällde patogenesen vid pernicios maskanemi, och hans elever Wolmar Nyberg och Ralph Gräsbeck sändes först till USA för att lära sig de nödvändiga parasitologiska och biokemiska metoderna. I och med Nybergs död 1973 avtog de parasitologiska projekten, men därförinnan hade maskanemins "gåta" lösts: masken upptar stora kvantiteter B_{12} -vitamin från människans föda så att ca hälften av de som hade mask visade tydliga tecken på B_{12} -brist, d.v.s. patologiskt låga serum- B_{12} -värden. Maskforskningen har haft många intressanta "avläggare", bl.a. följande: – De talrika serumproverna från en stor maskinfekterad population uppvisade en statistiskt lognormal

FÖRFATTAREN

Prof. **Ralph Gräsbeck** var Minervas institutschef åren 1971–1993, de tre sista åren heltidsanställd. Han är den sista av Minervas grundare som ännu forskar där. Ett flertal utländska forskare har arbetat i hans biokemiska forskargrupp.

fördelning av serum- B_{12} -värdena hos de kontrollpersoner som inte hade mask. Dryftandet av detta fenomen ledde till introduceringen av begreppet referensvärde, som har blivit allmänt accepterat världen över (3).

Gräsbeck utvidgade B_{12} -forskningen att omfatta vitaminets fysiologi, speciellt dess tarmupptag i vilket den mystiska principen "intrinsic factor" deltar. Gruppen var den första som isolerade människans intrinsic factor år 1965. Samtidigt påvisades existensen av ett annat B_{12} -bindande s.k. "R-protein", numera kallat haptokorrin och som uppträder i många kroppsvätskor och leukocyter. Vid samma tidpunkt som institutet grundades beskrevs en ny B_{12} -relaterad sjukdom, selektiv B_{12} -malabsorption, Imerslund-Gräsbecks syndrom. Bland gruppens andra upptäckter kan nämnas beskrivningen av en receptor eller transporter av hem (järn-porfyrin) i tarmepitel och erytroblaster. Tillsammans med den cytogenetiska gruppen intresserade man sig för mitogener (som behövdes för karyotypering), visade att antileukocytserum var starkt mitogent och isolerade i samarbete med Vesa Räsänen på Medix ett mitogent leukoagglutinin från bönor, – det första proteinet som kristalliserades i Finland.

Efter denna inkörningstid har nya forskargrupper grundats, andra har upphört eller flyttat. Många av våra f.d. forskare har klättrat högt i den medicinska hierarkin. En av de äldsta ännu aktiva grupperna leds av professor emeritus Frej Fyhrquist, och dess huvudtema har varit blodtrycket, speciellt komponenter i renin-angiotensinsystemet. En annan av de äldre grupperna leds av Kid Törnquist, numera professor vid Åbo Akademi, och den har länge studerat membrantransporten av kalcium, för tillfället sfingosinets roll i detta fenomen och sköldkörtelkancer.

Bland de nedlagda grupperna kan nämnas de som sysslade med cellbiologi och mitogener (chef Teddy Weber), nutrition (tidigare D-vitamin, senare kalcium, Christel Lamberg-Allardt), reproduktiv endokrinologi (Fredrika Pekonen, numera Forsskåhl), experimentell och klinisk nefrologi (Carola Grönhagen-Riska) samt nuklearmedicin (chef Kristian Liewendahl). Sköldkörteln var huvudtemat för den endokrinologiska gruppen tills Bror-Axel Lamberg drog sig tillbaka 1993. Han var f.ö. institutets chef åren 1959–1971. En ny enhet med samma namn ledd av professor Hannele Yki-Järvinen arbetar nu med diabetes och en annan "metabolisk grupp" ledd av Heikki Koistinen sysslar också med

denna sjukdom. Dessa och andra nyttillkomna grupperns forskning presenteras i olika artiklar i detta nummer. Det bör påpekas, att många forskare – speciellt kliniker och universitetslärare – arbetar på institutet bara på deltid eller under forskarledigheter.

Under den första tiden på institutet tog man fram talrika nya diagnostiska prov för vetenskapliga syften men de blev så småningom värdefulla i praktisk medicin. Eftersom ingen annan gjorde dem, började vi bli nedringda av kolleger som bad oss göra proverna på patienter. Detta medförde arbete och kostnader, men lagen tillät inte att vår stiftelse tog betalt för denna service. Problemet löstes genom att forskarna 1963 med lånade medel köpte landets näst äldsta privatlaboratorium Medix, som befann sig i våningen under den första Minervalokalen. Ett aktiebolag grundades, men dåför tiden krävde ett sådant minst tre ägare. Forskarna donerade därför sina aktier till tre ideella institutioner: Minervastiftelsen, Medicinska understödsföreningen Liv och Hälsa samt Folkhälsans forskningsstiftelse med villkoret att vinsten skulle användas till forskning på instituten.

Medix växte till en början kraftigt och vinsten användes för Minervas och Folkhälsans forskning, men omkring 1970 började det blåsa snåla politiska vindar som ville förbjuda eller kraftigt begränsa de privata laboratoriernas verksamhet. Forskarna beslöt då att satsa på tillverkning av reagenser och startade en "preparativ avdelning", som av myndigheterna knappast kunde betraktas som lika "kriminell". Efter en tid av måttlig utveckling, stötte man på en guldåder, monoklonala antikroppar. Åran av detta tillkommer Jim Schröder som på Folkhälsan-Minerva hade använt cellhybridisering och själv körde in monoklonal metodiken som hade publicerats av nobelpristagarna Köhler och Milstein. Avdelningen utvecklades till ett självständigt bolag Medix Biochemica, som ägs av Minervastiftelsen. Bolaget säljer sina produkter över hela världen, och de ingår ofta som huvudkomponenter i ledande firmors diagnostiska "kits".

Laboratoriet å sin sida har fusionerat med andra bolag, vars aktier nu ägs av den ursprungliga Minervakretsen, Diacor terveyspalvelut och Förenade kliniska laboratorier. Politikerna har skrinlagt idén att begränsa privat analys av patientprover. Bolagen med anknytning till Minerva har skötts synnerligen väl. Här förtjänar den nyss avgångne verkställande direktören Kaj Lybeck en eloge.

Vinsten från de bägge bolagen har stått för hyran av Minervas utrymmen och gemensamma personal, dvs. de personer som betjänar alla forskare, beställer rutinkemikalier, sköter apparaturen, bokföringen o.s.v. Senast inköptes de nuvarande forskningslokalerna i den nya delen av Biomedicum.

Speciellt i början av sin existens hade stiftelsen en formell verksamhetsledare som bedrev PR-verksamhet. Man lyckades också uppbåda donationer och testamenten. Speciellt omnämmande förtjänar två stora gåvor av fru Lempi Savolainen i Virkby förmedlade av dr Herman Skurnik samt en testamentarisk donation av docent Ruth Wegelius. Ytterligare instiftade Minervakretsen ett medicinskt pris, "Medix-priset", som utdelas av Helsingfors universitet och som är mycket uppskattat.

Under åren har Minerva genomgått omfattande förändringar, bl.a. har ett klart generationsskifte skett. Ursprungligen var ju institutet IV Medicinska klinikens forskningsavdelning. Kliniken, som var en samlingsplats för den finlandssvenska läkarkåren, undergick omfattande förändringar, den flyttade till en början till Unionsgatan 38 men avskaffades slutligen helt. Härigenom minskade kontakten med undervisningen och unga svenskspråkiga forskare in spe. Under senare år har intresset för medicinsk forskning avtagit bland unga medicinare, och doktorsgraden har inte längre lika stort meritvärde. Rekryteringen av forskare – både äldre och yngre – är därför ett problem. I stället söker sig pro gradu-studerande från andra fakulteter till Minervainstitutet.

Ursprungligen leddes institutet mer eller mindre självständigt av forskarna själva, numera är avståndet mellan forskarna och stiftelsens styrelse och dess organ större, vilket delvis förklaras av generationsskiftet. Den medicinska vetenskapen har genomgående byråkratiserats, vilket minskar forskarglädjen. När Minerva startade var det t.ex. fritt fram för djurförsök, numera krävs omfattande pappersexercis. Numera är avsaknaden av forskningslokaler inte något stort problem, ett betydande antal, kanske rentav alltför många högskolor med forskningslaborato-

rier har tillkommit, varför Minervas existens motiveras av annat än utrymmesbrist. Hit hör den svenskspråkiga undervisningen i medicin, som förlorat sina svenska undervisningskliniker, vilket i någon mån kompenseras av Minerva. Ett annat är valet av forskningsteman, där forskarna fortfarande har större valfrihet, mindre byråkrati och flexiblere tid för forskning än på universitetssidan. Vidare har forskare tillåtits forska efter uppnådd pensionsålder, vilket förvånansvärt ofta inte är fallet på högskoleinstitutioner.

Det är inte lätt att spå om Minervas framtid. Dock torde det alltid finnas plats för privat forskning – ett stort antal nobelpristagare kommer ju från privata universitet. Olika studentgenerationer är väldigt olika, och det är inte osannolikt att de unga läkarnas intresse för forskning åter tilltar. Potentiella forskare bör emellertid aktivt uppsökas. Dessutom finns det ett stort utbud på utländska forskare som gärna skulle forska i vårt land men som utgör en intelligensreserv man i Finland knappast tillräckligt förstår att uppskatta.

Prof. Ralph Gräsbeck
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
ralph.grasbeck@helsinki.fi

Referenser

1. Minerva 30 år. Finska Läkaresällsk Handl 1989; (1) 133:5–87.
2. Anonym. Minerva Foundation and Minerva Foundation Institute for Medical Research. 50th Anniversary 1959-2009. Broschyr, Helsingfors 2009, 35 pp.
3. Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med 2004;42:692–697.

Mannen bakom Minervas monoklonaler

I slutet av femtiotalet var det en grupp förhållandevis unga finlandssvenska medicinare som skaffade sig egna forskningsfaciliteter genom att satsa sina stipendiepengar.

Så framställer jag Minervastiftelsens födelse när jag en dag i slutet av oktober jubileumsåret 2009 slår mig ner i soffan hemma hos Jim Schröder, stiftelsens nuvarande ordförande. Jim är lätt förkyld, han har varit på fasanjakt dagen innan, men intervjun blir ändå av.

–Jo, det var faktiskt så det gick till. Under de första åren av Minervas historia hände det faktiskt att årets stipendiemedel var slut innan man hade fått klarsignal för finansieringen från stiftelserna för följande år. De unga forskarna lånade då sina egna pengar till institutet, som de sedan fick tillbaka då stipendierna betalades ut.

På den tiden var Jim Schröder för ung för att vara med.

Han föddes 1945 i Helsingfors och började sin skolgång i Topeliusgatans folkskola för att sedan fortsätta i Lärkan. Då familjen flyttade till Grankulla bytte han skola än en gång.

Efter studentexamen studerade Jim kemi, zoologi och genetik.

Jim Schröder kom till Folkhälsans genetiska institut 1970 för att skriva sin doktorsavhandling under handledning av Albert de la Chapelle och disputerade fem år senare.

Minervainstitutet och Folkhälsans genetiska institut hade då ett nära samarbete med varandra utan att vara sammanslagna. Forskarna verkade inom samma utrymmen och anhöll delvis gemensamt om understöd. Institutet var administrativt separata institut men fanns under samma tak.

–Det fanns inga klara gränser och man använde varandras apparatur efter behov. Jag har alltid uppfattat mig som en del av Minerva men också som en del av Folkhälsans genetiska institut.

Hur kom det sig att du kom in på institutet fast du inte var läkare? Var det svårt?

–Nej, jag var intresserad av medicinska frågor och skrev en pro gradu-avhandling om effekten av virusinfektioner på arvsmassan. Kunde man förklara en del mutationer som uppkommer hos människor med att de utsätts för vissa virus?

–I dag vet vi att virus inkorporeras i vårt dna, vi har fullt av virussekvenser i vårt dna. Massor!

Det här ledde till att Jims handledare på universitetet tipsade Albert de la Chapelle om honom, och han fick börja forska på Folkhälsans genetiska institut. Där lärde sig Jim hantverket med forskning, såväl det tekniska som det vetenskapliga.

–I början av 1970-talet skedde en revolutionerande upptäckt inom humangenetiken. Då visade Torbjörn Caspersson att det var möjligt att identifiera alla människors enskilda kromosomer. Före det hade man vetat att människan har 46 kromosomer och att mannen en X- och en Y-kromosom medan kvinnan har två X-kromosomer.

–Då blev jag skickad till Caspersson vid Karolinska Institutet i Stockholm och fick lära mig hans metoder att färga kromosomerna. När jag kom tillbaka var jag den enda som behärskade den tekniken i Finland. Det berodde inte på mina förtjänster utan på den möjlighet jag hade fått att lära mig det.

Tiden som följde var aktiv. Jim började urskilja sina egna intresseområden och



Jim Schröder.

skapa en egen profil för sin forskning; den nya tekniska utrustning som införskaffades till institutet gav snabbt resultat. Efter ett år fick Jim också anslag från Finlands Akademi.

–Jag var ju inte obunden, men jag fick min lön på annat håll och inte från institutet. Då tyckte jag att jag själv kunde avgöra vad jag ville göra.

Med sin doktorsavhandling var Jim Schröder och Albert de la Chapelle de första forskarna som visade att celler från ett foster under graviditeten kommer in i moderns blodcirkulation. Är barnet en pojke hittar man ett litet antal celler med en Y-kromosom i moderns blod.

Tack vare av den teknik Jim hade lärt sig under sin tid vid Karolinska Institutet var det möjligt att också under interfase (dvs. i celler som inte har genomgått celledelning) särskilja celler av manligt och kvinnligt ursprung.

–Jag tog blodprov på ungefär tjugo gravida kvinnor och studerade massvis av celler från deras blod. Då och då hittade jag celler som jag tyckte var av manligt ursprung. Metoden var inte helt tillförlitlig, men när kvinnorna sedan födde sina barn visade det sig ändå att mina fynd ofta korrelerade med barnens kön.

Något som visade sig vara besvärligt var att manliga celler hos kvinnor som tidigare väntat pojkar i årtal kunde bli kvar i moderns vävnader som något slags stamceller.

Cellerna jag hittade var ytterst lågfrekventa, och jag försökte anrika dem med hjälp av olika metoder. Drömmen var ju att bara genom ett blodprov från modern få material från fostret och kunna diagnostisera genetiska sjukdomar.

På 1960- och 1970-talen utvecklades fostervattensprovet och blev säkert och tillförlitligt så att man genom prov från fostervattnet kunde diagnostisera vissa genetiska sjukdomar, t.ex. Downs syndrom.

–Fostervattensprovet är fortfarande standardmetoden, säger Jim Schröder.

År 1975 reste Jim för första gången till USA, dit han blev inbjuden på grund av sina teser i doktorsavhandlingen.

Två år senare, 1977, återvände Jim till Finland och blev chef för den cytogenetiska avdelningen på Folkhälsans genetiska institut, och 1978 blev han chef för hela institutet.

–Det jag själv uppfattar som min huvudsakliga kontribution till Minervakretsen är att ha kunnat bygga broar mellan grundforskningen och dess kommersiella tillämpningar.

Samma år var det igen dags för USA. Kort innan hade César Milstein och Georg Köhler beskrivit en metod att skapa monoklonala antikroppar *in vitro*.

Milstein och hans medarbetare lyckades isolera antikroppsbildande celler hos möss, och immortalisera dessa, så att de sedan kunde odlas i provrör. Immortaliseringen åstadkoms så, att man skapade antikroppsproducerande cellhybrider med förmåga till oändlig delning. Jim etablerade denna teknik på Minerva, före någon annan i Finland.

I dag är de i medicinskt bruk, och t.ex. 50 procent av all ledgångsreumatism svarar på behandling med monoklonala antikroppar.

–Omkring femtio procent av patienter med bröstcancer har en viss mutation. Patienterna med mutationen svarar mycket bra på terapi med monoklonala antikroppar som har utvecklats för ändamålet. Bröstcancercellerna hos dessa patienter uttrycker ett visst protein mot vilket läkemedelsindustrin har lyckats ta fram specifika antikroppar.

De här biologiska läkemedlen används mer och mer, men de är ännu mycket dyra.

–Det har tagit lång tid från Milsteins ursprungliga publikation år 1975 till rutinmässig terapeutisk användning av antikroppar.

Å andra sidan har antikroppar sedan början av 1980-talet fått sina tillämpningar inom den medicinska diagnostiken. Här har Medix Biochemica Ab, som till över 90 procent ägs av Minervastiftelsen, varit en föregångare.

Under en period i USA på 1980-talet var Jim också med om att utveckla ett ovulationstest som ligger som grund för de ovulationstest som i dag finns på marknaden.

År 1984 återvände han till Finland och veterinärmedicinska högskolan. Tre år senare blev han utnämnd till professor i genetik vid Helsingfors universitet. I det skedet hade han inte längre kontakter till Minervainstitutet eller Folkhälsans genetiska institut.

–Min forskning och min undervisning som professor vid universitetet i Helsingfors har kretsat kring både immunologi och medicinsk genetik.

Under 1980- och 1990-talen verkade Jim Schröder således som professor i genetik vid Helsingfors universitet och fick 1993 i uppdrag att vara VD för universitetets forskarpark i Vik. Han stannade på den posten under byggnadsfasen men återgick sedan till sin professur 1996. Då hade han också återvänt till Minervakretsen och är alltså nu ordförande för stiftelsen och styrelseordförande för Medix Biochemica Ab (som främst sysslar med monoklonala antikroppar!). Dessutom har han en plats i styrelsen för bolaget Yhtyneet Medix laboratorier, som bildades i somras då landets två största privata laboratorier gick samman.

Han är egentligen inte inledningsvis så villig att prata om sig själv och sin forskning, utan tar i stället upp flugfiske, jakt och sin fågelhund – som också visade sig vara en utmärkt vakthund då jag klev in på gården i mörkret någon timme tidigare.

En bok som Jim har skrivit om flugfiske väntar för tillfället på utgivning.

–Jag har aldrig förstått mig på sportfiskets ”catch and release”, alltså att fånga en fisk och därefter släppa den fri igen. Den kan ha fått allvarliga skador på huden och ha mycket mjölksyra i kroppen, vilket skadar den. Min filosofi är i stället ”catch and eat”. Jag äter den fisk jag fångar, jag äter den där jag fiskar den och jag tar aldrig fisk med mig hem.

Tom Ahlfors



Lennart von Wendt

10.5.1947–2.6.2009

Professor Lennart von Wendt avled i juni vid 62 års ålder. "Lennu", eller hellre "Kimmen", som han kallades av familjen, var på god väg att bli historiker då han i slutet av gymnasieåren kom på andra tankar och började intressera sig även för medicin. I skolan, dvs. Åbo Classicum, var det i alla fall inledningsvis latin och språk som gällde. Kimmen lyste vanligen som klassens primus men utmärkte sig även i friidrott. Efter studenten flyttade han till Uleåborg för att studera medicin och blev färdig läkare 1974.

Intresset för historia och humaniora behöll Lennart livet ut. När han kunde kombinera kunskaper i olika ämnen och vetenskaper njöt han alldeles särskilt. Då kom hans stora allmänbildning också till sin rätt. Hade man tur kunde man någon gång på ort och ställe få sig till livs en djuplodande historisk analys med årtal och persongalleri.

Lennart började sin läkar- och forskarbana i sin studiestad Uleåborg och specialiserade sig på barnsjukdomar. Han disputerade 1980 på non-ketotisk hyperglycinemi, en ärftlig ämnesomsättningssjukdom som drabbar barnets hjärna. I sin forskning fokuserade Lennart tidigt på barnneurologi och barnhabilitering, vilket i mitten av 1980-talet förde honom till Göteborg och professor Bengt Hagbergs forskargrupp. Familjen flyttade till Sverige och Lennart blev överläkare vid Bräcke Östergård och adjungerad professor vid Göteborgs universitet. Även om han år 1989 återvände till Finland för att bli överläkare vid Barnets Borgs sjukhus, förblev banden till Sverige starka och Lennart fortsatte att arbeta i bägge länderna under hela sin karriär.

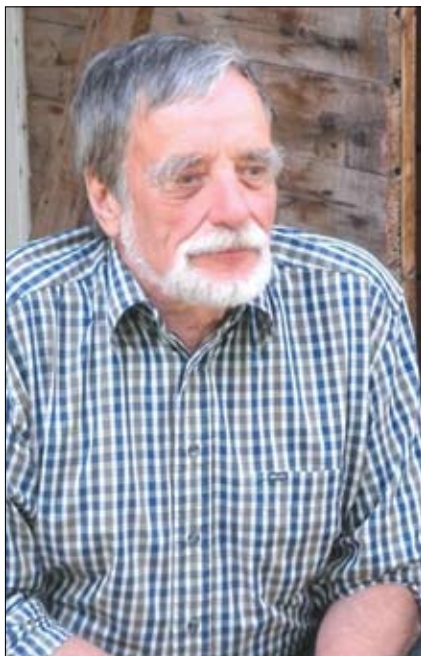
Lennart von Wendt byggde också tidigt upp ett stort nätverk av kolleger och

kliniker runtom i Europa där han blev en viktig samarbetspartner för många kollega, doktorand eller forskargrupp. De senaste åren fokuserade Lennart allt mer på autismspektrets sjukdomar och han grundade bland annat ett autismcenter i Finland. Det tvärvetenskapliga samarbete som han inledde har gett upphov till flera nya teorier och metoder om just autismspektrets sjukdomar. Som så många gånger tidigare föddes forskningens frågeställningar ur praktiska problem och resultaten ledde ofta till konkreta förbättringar i vården.

Lennarts förmåga att inspirera och stimulera sina kolleger till forskning och samarbete har starkt bidragit till barnneurologins utveckling i Europa. Särskilt viktiga var i alla fall alltid patienterna och deras familjer. De fick alltid Lennarts odelade uppmärksamhet och många minns honom med stor värme.

Vi, hans vänner, kolleger och familj, minns Lennart som en ytterst snabbtänkt person, vars underfundiga och ofta lite brittiskt torra humor inte sällan lockade till skratt men också till eftertanke. Det är ett stort tomrum som Lennart von Wendt lämnar efter sig såväl inom familjen som bland kolleger och vänner.

**Fredrik Almqvist
Mikael Knip
Rikhard von Wendt
Hanna von Wendt**



Johan Ahlqvist

24.3.1930–20.8.2009

Professor Johan Eric Walter Ahlqvist eller Johnny avled den 20 augusti i sitt hem Sibbvik i Västernorrland. Obduktionen visade en inte tidigare diagnostiserad pankreascancer med levermetastaser. Johnny sörjs närmast av hustrun Mona, tre vuxna barn och sex barnbarn.

Johnny föddes i Stockholm den 24 mars 1930 som son till generalkonsul Eric Ahlqvist och hans hustru Dora, född Törnroth. Johnny var ättling i rakt nedstigande led till Olof Rudbäck d.ä., och hans farmor var född Nobel. Under 1930-talet bodde familjen i Stockholm där Johnny gick i skola, först i fröken Karlssons förberedande skola för gossar och sedan i Östra Real. Efter föräldrarnas skilsmässa, då Johnny var 12 år, flyttade han med pappa Eric till Helsingfors där han började i Nya Svenska Läroverket, Lärkan. Finskan var till en början besvärlig för en pojke från Stockholm. Lärkans legendariska lärare Tonttu lär ha gett vitsordet -14 för Johnnys första prov i finska. Eftersom fadern hade gift om sig 1946 och flyttat

till Egypten bodde Johnny inackorderad i olika familjer, men han tillbringade också mycket tid på Rastböle gård som hans far ägde tillsammans med fyra andra syskon. Där skaffade Johnny sig omfattande kunskaper om jordbruk och andra praktiska sysslor på en gård.

Johnny blev student 1948 och inledde sina medicinska studier vid Helsingfors universitet 1949, blev medicine licentiat 1956 och disputerade 1961 med en avhandling om mastceller. Han arbetade ett år som stipendiat i London i Pears legendariska laboratorium som var den dåtida histokemins Mekka. Johnny blev specialist i patologi 1962 och docent i patologi 1964. Han verkade som tf. professor i anatomi 1963–64 och i patologi 1979 vid Helsingfors universitet. År 1965 blev han överläkare i patologi på Aurora sjukhus, en befattning som han innehade till sin pensionering 1990. Samma år förlänades han professorstitel.

Det var Johnnys förtjänst eller fel, beroende på från vems synpunkt man ser det, att jag blev patolog. Våra vägar möttes i början av juni 1966. I slutet av maj såg jag på Asis anslagstavla en liten handskriven lapp där Johnny sökte en sommarvikarie till patologiavdelningen vid Aurora sjukhus. Det gällde en månad som obduktionsvaktmästare och en månad som laboratoriesköterska. Jag anmälde mig och blev anställd till något som visade sig bli ett fascinerande sommarjobb.

Johnny var en entusiasmerande lärare. Han var en mycket skicklig och observant obducent. Han såg också till att Auroras hela läkarkår, anförda av chefsläkare Erkki Klemola, alltid kom till obduktionsdemonstrationen där det vanligen uppstod en ingående kliniskpatologisk diskussion. Johnny var också något av en uppfinnarjocke. Han designade obduktionsinstrument och hjälpmedel som den händige vaktmästaren Arvi Honkanen sedan snitsade till.

Johnny behärskade den histologiska teknologin långt utöver det vanliga bland dagens patologer. Därför blev han ofta anlitad att föreläsa om färgningsmetoder och deras kemiska bakgrund. Som morfologisk diagnostiker var Johnny också exceptionell. Han nöjde sig sällan med att enkelt beskriva histologin utan

inbegrep i den även en utredning av kausalitet och patogenetiska mekanismer. Hans analytiska PAD-utlåtanden, som till omfattning kunde motsvara ett kortare kapitel i en bok inklusive referenser, irriterade ibland stressade kirurger som snabbt ville veta om det handlade om något som gick att operera eller inte.

Johnny poängterade i alla lägen vikten av att tänka *in casu*. Han ifrågasatte rekommendationerna om medicinsk praxis-käypä hoito som han ansåg leder till kokboksmentalitet och stereotypt agerande enligt inlärdas mönster. Johnny tvingade också sin omvärld att tänka. Intellectuell lättja och enkla, flummiga förklaringar hade han ingen förståelse för. Han ställde sig även kritisk till WHO:s sjukdomsklassifikation och accepterade inte heller sådana vedertagna dogmer om sjukdomsmekanismer som klart stod i strid med de morfologiska fynden. Detta ledde ibland till friktion mellan honom och s.k. rättrogna.

Som privatperson var Johnny spirituell och empatisk. Medan vi ännu hade snörika vintrar med gott skidföre på 1980-talet brukade han och jag flera gånger per säsong åka buss till Salmi och ta spåret över till Noux och därifrån vidare till Solvalla och Pirttibacka. Det var uppfriskande söndagsutflykter. Johnny tyckte också om att segla och var under många somrar fördäcksgäst på Trolle Donners åtta.

Johnny gick i förtidspension 1990. Ett incitament var den ständigt tilltagande byråkratin som han upplevde som betungande. Han berättade att stadens hälsovårdsverk då han tillträdde sin tjänst 1965 hade elva anställda som han alla kände personligen. Då han gick i pension hade antalet ökat till 300 och han kände ingen.

Efter pensioneringen byggde Johnny gården Sibbvik i Västernorrland. Där sysslade han bl.a. med skogsbruk och planterade 1 300 ekplantor som han själv hade drivit upp från ollon. Men arbetet på gården minskade inte Johnnys vetenskapliga intresse som blev allt mer inriktat på medicinsk filosofi med William Harvey, Karl Popper, Isaac Newton och Eino Kaila som favoritförfattare. Johnny var också ledamot av Suomen lääketieteen filosofian seura. Dessutom

ägnade han mycken tid åt blodcirkulationens fysiologi och framför allt åt dess reologi. Att en del av hans inlagor möttes av oförståelse kan åtminstone delvis tillskrivas den yngre läkarkårens allt svagare kunskaper i fysiologi, något som Johnny var bekymrad över. Jag delar hans bekymmer.

Med Johan Ahlqvist har en mångkunnig och engagerad patolog med stor integritet gått ur tiden. Han vågade gå sin egen väg och intill envishet driva de saker han trodde på. Han var inspirerande som lärare, han var beläst och samhällsengagerad och han var en god vän.

Leif C. Andersson



Ulpu Saarialho-Kere

8.2.1960–13.9.2009

Professor Ulpu Saarialho-Kere, född 1960, avled den 13 september på Mejlans sjukhus i Helsingfors efter en kort tids sjukdom. Hennes närmaste är maken Juha Kere och barnen Kristian, Markus och Maura.

Ulpu Saarialho-Kere som var professor i dermatologi vid Karolinska Institutet och vid Helsingfors universitet delade sin tid mellan dessa arbetsplatser. Efter uppväxten i Helsingfors studerade Ulpu medicin och tog sin läkarexamen vid Helsingfors universitet 1985 och blev medicine doktor 1988. Ett stort forskningsintresse ledde till en treårig postdoktorsperiod vid avdelningen för dermatologi vid Washington University Medical School i St. Louis, USA under åren 1990–93. Efter hemkomsten fortsatte karriären snabbt uppåt; Ulpu blev docent i experimentell dermatologi 1996, specialist i dermatologi och venerologi 1998 och var äldre forskare vid Finlands Akademi åren 1998–2003.

I samband med att även maken Juha Kere fick tjänst vid Karolinska Institutet

utnämndes Ulpu till professor i dermatologi och venerologi vid Karolinska Institutet, Institutionen för klinisk forskning och utbildning vid Södersjukhuset år 2003. Hon blev även professor i tillämpad dermatologi och venerologi vid Helsingfors universitet 2009. – År 2007 blev Ulpu invald i styrelsen för European Society for Dermatological Research.

I fokus för hennes forskning fanns en särskild grupp enzymer, matrix metalloproteinaser (MMP) samt deras roll vid sårsläkning och uppkomsten av hudcancer. Särskilt var det möjligheterna att med hjälp av kunskap om dessa proteiner kunna förbättra diagnostiken och utveckla nya behandlingsmetoder för hudcancer som intresserade Ulpu. En annan forskningslinje gällde de underliggande mekanismerna för psoriasis. Ulpu delade sitt stora forskningsintresse med Juha, och de samarbetade mycket nära i flera olika projekt. Forskningen befann sig vid Ulpus förtidiga bortgång i en mycket aktiv fas med ett stort antal vetenskapliga artiklar publicerade just i år.

Som privatperson hade Ulpu Saarialho-Kere en bred allmänbildning med ett stort intresse för konst och klassisk musik som hon gärna förde vidare till familjen och sina kollegor. Ett annat intresse var resor, gärna till Frankrike eller Italien. Viktigast för henne var ändå att kunna tillbringa den lediga tid som fanns tillsammans med Juha och den övriga familjen.

På sin arbetsplats var Ulpu en mycket fokuserad person som var lätt att umgås och samarbeta med tack vare hennes raka och ärliga sätt. Hon krävde mycket av sina medarbetare men ännu mer av sig själv.

En framgångsrik forskare, vän och kollega har ryckts bort allt för tidigt. Vi minns Ulpu med stor saknad och tänker särskilt på hennes närmaste.

För vänner och kollegor,

Rune Toftgård

Tiina Skoog

Göran Elinder

Barbro Lundh Rozell

Björn Rozell

En fältskärs berättelse

av Helge Roos

Julkvällen 24.12 mottogo vi den obehagliga underrättelsen att vårt regemente skulle sändas till fronten. Alla officerare samlades på staben till en stämningsfull måltid, som jag aldrig skall glömma. Bataljonen erhöll benämningen III/JR 61. Det gällde att rusta sig för ändamålet och ryggsäcken blev förfärligt tung och komlig. När vi äntligen blev färdiga skedde avresan 23.1. Lastningen vid järnvägsstationen tog tre timmar, enär vi stördes av flygalarm. Resan varade över ett dygn och vi hamnade (25.1) till Pyhäjärvi station vid Kexholmsbanan. Här fick jag min trogna vän och ledslagarinna för hela fronttiden, hästen Clara. Under natten färdades vi sedan i motvind och fruktansvärd köld, marscherande eller åkande, den långa vägen till spetsen av udden vid Pyhäjärvis norra strand där kompanierna förlades i byggnader, vilka övergivits av civilbefolkningen, på några kilometers avstånd från varandra. Man vande sig vid att ligga på träbänkar eller på golvet, fullt påklädda med rummet fullt av snarkande.

Vårt JSP inrättade vi i tvenne man-skapstält vid Rajaniitty i närheten av en större väg, längs vilken kolonnerna passerade medförande sjuka. Vi lågo ungefär 2 mil från stridslinjen, norr om Vuoksen. Det var meningen, att vi först skulle vänja oss vid livet vid fronten, innan man sände oss fram till eldlinjen. Manskäpet tränades under övningar i

terrängen och byggde försvarsverk. Det oavbrutna kanondundret från sydost, mest Taipale, och ideliga påhälsningar av ryska spanarmaskiner förkunnade oss, att vi befunno oss inom farozonen.

15.2 kl. 9 på morgonen kommo vi till Tammisuo, den närmaste stationen från Viborg på Sordavala banan. Vi kände oss duktigt frusna och trötta och voro inte vidare nytra efter den besvärliga resan, som varat i över ett och ett halvt dygn med längre och kortare uppehåll på grund av tågförseningar och flygstörningar. Vi, officerare hade suttit hela den sista natten i en odrägligt kall vagn. Trots den molnfria himlen stördes vi under den följande färden endast föga av flygare. Kolonnens början – vi höllo med avsikt mycket långt avstånd mellan fordonen – lär dock ha fått taga emot skurar från deras maskingevär, varvid tvenne personer sårades. Efter någon timmes färd, merendels genom skog, kommo vi in på stora landsvägen, som går från Viborg österut mot Kämärä by. Det blev besvärligt till följd av långa rader av mötande slädar och bilar och den snedkörda hala vägen, som hotade att stjälpa lassen. Stagnationer och små kollisioner kunde ej undvikas. Vi hade mycket svårt att hålla kontakten med våra egna fordon och voro oroliga att råka på villovägar, ty endast kolonnens ledare kände vårt mål. Omsider hamnade även vi på den rätta vägen. Det

började skymma. Kanondundret hördes allt starkare, och framför oss upplystes kvällshimlen oupphörligt av artilleriets eldflammar. Praktfullt men kusligt. Vi passerade ett tankhinder. De jättelika stenarna stodo som rader av vålnader på vardera sidan av oss.

Följande dag ansågs det rådligast, att vi foro längre bakåt. Vi beslöt därför att lämna Vornanen, ehuru vi ej fått någon order, ty man kunde ju ej veta, när man hade stridsvagnarna in på sig, då försvaret brustit. Doktor Lindholm och san.underserganten togo hand om en del sårade, medan jag orienterade mig beträffande läget. Dem, som hade lättare blessyrer och de förbundna fick JR 62:ans sanitärer ombesörja till förbandsstationen vid Honkaniemivägen. Vi drog oss tillbaka samma väg vi kommit. På stora vägen vid Honkaniemi, passerade vi söderifrån kommande truppmassor.

Då vi kommo ut på fälten med de stora bombgroparna på andra sidan järnvägen, sågo vi kvällshimlen upplyst av ett starkt eldsken. Stationshuset vid Kämärä och omgivande byggnader brunno i full låga. Jag trodde att brasorna voro ryssarnas verk. Då jag sett våra retirande, torftigt utrustade trupper och bevittnade den hemska synen i sydost, erinrade jag mig huru många gånger förut i historien vårt arma folk måst draga sig tillbaka för från detta håll kommande övermäktiga fienden, som satt våra byar

Vid det finska FN-kompaniet i Suez tjänstgjorde Gunnar Brandt år 1957. Vid en 50-års minnesfest för FN-trupperna i Helsingfors kom en av hans dåtida vapenbröder (Lars Hallmèn) fram till honom och berättade att han vid en bouppteckning kommit över en kollegas (Helge Roos) minnesanteckningar från sina upplevelser som läkare under vinterkriget 1939-1940. Efter genomläsning fann Gunnar Brandt "Berättelsen" intressant och absolut minnesvärd och förtjänade att komma även möjligast stora, yngre läkares genera-

tioner till kännedom. I sin "Berättelse" har Helge Roos skildrat hur han i vinterkriget hamnade i ett JSP (truppförbandsstation) vid yttersta linjen. Helge Roos var född år 1892 och hörde därför till de årgångar för vilka värnplikten avskaffats. Hösten 1939 blev han ändå som 48-åring inkallad till militärtjänst och sedermera sänd till fronten. Hans skildring av det tunga arbetet vid fronten omfattar 60 sidor. Gunnar Brandt och Barbro Scheinin har förkortat "Berättelsen" till en minnesskrift till 70-års dagen av fredsslutet 13.3.1940.



Helge Roos tilldelades 1940 frihetskorset IV klass och blev under fortsättningskriget befördrad till sanitetskapten. Han fick frihetskorset III klass år 1944 och arbetade till sin pensionering som distriktsläkare i Helsingfors. Helge Roos avled 1989.

i brand. Men snart fick jag lära mig, att det var våra egna pionjärer, som stucko eld på byggnaderna, vilket var en oundgänglig taktisk åtgärd.

Snart var vi alla vid Reponotko och fick logera i en välbyggd korsu hos mycket vänliga och gästfria unga finskspråkiga artilleriofficerare. Manskaptet måste sprida sig i det stora korsusamhället, där det t.o.m. fanns skyddsrum för artillerihästarna. Åt våra dragare förfärdigade våra män stall av fällda stammar och granris, vilket arbete jag åsåg med intresse. Det gick snabbt och skickligt undan och jag tror att våra Pällar även voro nöjda med resultatet. Plötsliga ändringar i bataljonens instruktioner åstadkom stor förvirring. Jag hade naturligtvis inte reda på alla strategiska synpunkter, då vår bataljon besatte Mustalampiåsen. Visserligen hade ryssarnas inbrytning vid Summa varit en chock och det vi på nära håll fått erfara om deras senaste framryckning var betänkligt.

17.2 på morgonen kom det ett bud från bataljonschefen till mig, som befann mig med sanitetsgruppen vid Rytylampi, att vi skulle anlägga vårt JSP ca 500 meter söderom stora landsvägen. Till Rytylampi hade vi anlänt föregående kväll efter vår reträtt från trakten av Kämärä station. Ordern satte fart på oss. Det gällde att leta reda på manskaptet i det relativt stora korsusamhället. Vi stördes oavbrutet av nyfikna ryska

spanarmaskiner, som ofta gävo eld med sina maskingevär. Snart fingo vi ett nytt mera kategoriskt bud från vår stab. Mannen berättade, att det redan var strid. Jag sände doktor Lindholm och en sanitär till Metsävirtija för att söka oss en lämplig korsu för vårt JSP. Vid 12 tiden for jag med fordonen i spridd kolonn. Himlen var fullkomligt klar och vi var rädda för de ryska spanarna, då vi färdades i den glesa skogen och på den stora landsvägen, men lyckligtvis besvärades vi ej då av flyg. Endast stora formationer av bombmaskiner foro på mycket hög höjd över våra huvuden på väg mot avlägsna mål.

Doktor Lindholm hade fortsatt ned mot linjen för att ordna skötseln och transporten av sårade, Bortom Metsävirtija hördes häftig kanonad och en man med en svår skallskada låg redan och väntade på vår hjälp i en korsu. Denna var belägen ungefär 1 ½ km. bakom linjen och var den enda lediga, acceptabla i närheten. Men skyddsrummet var bristfälligt. Det saknade dörr och inredning och taket bestod av en enkel stockrad, troligen med ingen annan påfyllning än den snö som fallit under vintern. En bår lades över två JSP-lådor och blev vårt operationsbord. De lättare skadade fick sitta på lådor. Medan ett par av oss skötte de sårade, vilka började komma i en jämn ström, iståndsatte de andra skyddsrummet och monterade upp petromaxlampan. Det var bra, att vi hade skolat och händigt manskapt med oss, ty jag som aldrig tidigare varit i militärtjänst, visste ännu ej särdeles mycket om fältutrustningen och sanitetsarbetet ute vid linjerna. I den starka kölden och de ytterst primitiva förhållandena möttes jag här av svåra problem. Vår sanitetsgrupp bestod, enligt reglementet, förutom av tvenne läkare av två sanitetsunderofficerare, vilka deltog i sjukvården och skötte journalen, fyra bårbärare av lägre grad, och lika många körkarlar, en för vart fordon (två för sjuktransport och två för transport av materielen).

Samma morgon (17.2) så fort det börjat ljusna, fick vår bataljon sitt första verkliga eldprov. Åttonde kompaniet angreps av ryska stridsvagnar. Med tvenne maskingevär och andra infanterivapen kunde man ej bjuda tanksen motstånd. Man saknade pansarvärnskanoner, och sprängladdningar skulle anlända först följande dag. Somliga stridsvagnar

angrepp den IV plutonen, som låg ute i terrängen bakom tankshindret. Andra avancerade mot kullen bakom sjön och riktade en mördande eld mot de våra. Där de kommo åt sköto de in genom korsuöppningarna. I ett skyddsrum uppstod eldsvåda, och om detta ej haft tvenne ingångar, hade alla därinne varit sålda.

Tanksangreppen mot våra förläggningar gävo oss vid JSP oavbruten selsättning långt in på kvällen. Vi fingo ej tid eller ens möjligheter att utföra några operativa ingrepp i de primitiva förhållandena. Vårt arbete inskränkte sig till att blottlägga såren, anlägga sterilt förband och skena vid benbrott och större lesioner i extremiteterna. Det var ogörligt att taga av de sårade deras kläder. Det var för kallt och man hade därmed kunnat skada och vålla patienten smärta. Vårt bästa verktyg var en kraftig gipssax, då det gällde att få de blodiga och nedsölade paltorna avlägsnade från sårets omgivning, så att förbandet kunde anläggas. Om man frånser inre blödningar yppade sig lyckligtvis sällan förblödningsfara trots svåra extremitetsskador. De ombindningar, som anlagts av sanitärerna ute vid linjen, kunde i allmänhet utan vidare avlägsnas vid JSP. Utom skötseln av såren, vilken var att betrakta såsom en första hjälp, hörde till våra viktigaste åtgärder att bereda våra svårt skadade och förfrusna patienter vila och värme, ge dem något att dricka och lindring för smärtor samt snarast möjligt sända dem vidare för sakkunnig vård. Varmt vatten eller saft med socker kunde vi åstadkomma och med morfinet behövde vi ej vara njugga. Filtarna räckte emellertid ej på långt när till, och transporten av de sårade fungerade bristfälligt. Sanitetsbussar sågo vi sällan. Våra långsamma hästfordon måste släpa de sårade såväl från linjen till JSP som därifrån uppåt till närmaste sanitära etapp. Följden var att korsun fylldes av stönande och yrande sårade, som i timalt måste vänta på evakuering, vilket säkerligen i många fall var skadligt och av ödesdiger betydelse.

Vad krigsskadorna vidkommer, dominerade de trasiga såren åstadkomna av granater. Ofta var det svåra skall- och ansiktslesioner, perforerande sår genom bröstet och buken och komplicerade skador i extremiteterna med benbrott och förlamningar. De svåraste fallen nådde ej oss; de blev på valplatsen.

Senare på kvällen avhämtades de sårade med bussar. Striderna mattades av och det blev lugnt till natten. Vi drucko kaffe och åt sura skorpor och redde åt oss granrisbäddar på den hårt frusna marken, radiärt utstrålade från den mittställda kaminen, som vi brassade på så den blev glödhet för att få någorlunda dräglig värme. Någon sömn blev det ej av, ty när krigandet var slut, kom det under hela natten ideligen patienter med allehanda krämpor – frostsador och skavanker.

Följande morgon (den 18.2) fingo vi ett synnerligen välkommet besök. Man kom med varm mat – någonslags köttmakaroniröra. Aptiten var god, ty vi hade levat på torrskaftning sedan den 15:de. Villervallen under nedfärden till fronten hade satt hela provieanteringsmaskineriet i ordning. Efter middagen brakade striden åter lös. Det ryska artilleriet öppnade spelet. Vid vårt JSP hade vi lyckligtvis ingen direkt känning av den. Hela trakten var i timtal fylld av ett helvetiskt larm av de metallklingande serierna från tanksens maskingevär och kanoner, jagande i vildaste hets om varandra, och däremellan hördes dovare dunsar i glesare takt. Senare på eftermiddagen trängde 3-4 vagnar genom spärren. Bristen på pansarvärn gjorde sig naturligtvis gällande. Tanksen åstadkom stort manfall bland de våra genom att skjuta längs skyttegravarna. Sedan artilleriverksamheten och tankanfallen satt in, hade vi det åter hett på JSP. De sårade kommo i en jämn ström vandrande eller lassvis med fordonen. Korsun var full av sårade, unga män, bleka och uttröttade. Somliga bådo, flämtande att få vatten, andra voro medvetlösa av sina skador eller i morfinrus, yrande och klagande. I det grälla ljuset under petromaxlampan stod doktor Lindholm och arbetade med ett svärmodigt uttryck i ansiktet. På båren var en man med ett öppet sår i övre delen av vänstra lungan, genom vilket vid varje inandning luften droga in med ett väsande och vid utandningen eller hoststötter en blodström kvällde fram. Dessutom hade han i vänstra armen ett stort trasigt granatsår och ett splittrat överarmsben. Jag tog itu med en man närmast ingången. Hans ansikte var oformligt, svullet och fullproppat med sand och krutstänk. En granat hade slagit ned tätt invid honom mot skyddsvärnet.

Den dagen fingo vi åter vänta på ambulanserna i timtal och det värsta var, att

vi med korsun full av sårade, fingo bud att en tank var på väg mot oss. Vår korsu låg nära vägen med ingången vänd snett emot denna. Nu voro goda råd i sanning dyra. Vi kunde icke göra annat än att ta Gud i hågen och fortsätta med arbetet. Mina tankar sysslade hela tiden med vad som kunde hända oss alla. Jag hade ju ansvaret för hela hopen. Lindholm tog saken som vanligt med ett suveränt lugn och intresserade sig endast för det han hade för händerna. Då vi icke hade våra fordon till hands, uppmanade jag alla sårade, som kunde gå, att lämna korsun och söka sig till närmaste förbandsplats. Minuterna förgingo, men tanken kom inte. Spänningen gav sig småningom, det blev lugnare vid linjen, ehuru arbetet fortsatte hela natten. På kvällen kom tvenne ambulansbussar för att avhämta våra sårade, vilka i sanning voro glada att äntligen bli förda till ett varmare och tryggare ställe.

Nästa dag berättade man att ryska tanks kommit upp på Viborgsvägen vid Kuusisto, där vi nyss varit och att vi med det snaraste måste flytta. Lyckligtvis hade våra pionjärer hunnit spränga bron vid Kalkatsaarenoja, så faran föreföll ej vara alldeles överhängande. - I Säiniö fick jag första gången sedan vi lämnat Pyhäjärvi sova ut en natt i fred. De utmärkta lottorna lagade åt oss granrisbäddar på golvet och man kände sig välbetjänt och omskött. Jag minns lottorna med tacksamhet från de några dagar vi huserade tillsammans. Matlagning och städning gav oss inga bekymmer och de hjälpte med de sårade. Ordningen var helt annan, när de voro med, än då karlfolk skötte om motsvarande sysslor. Någon rädsla visade de icke.

Tisdagen den 20:nde återupptog ryssarna angreppen mot spärren, som försvarades av sjunde kompaniet. Artillerielden var mycket intensiv. Det var ett rent inferno berättade serg. G.Troupp, som var med i en av de främsta skyttegravarna. Många stupade. Eldledaren och telefonmanskapet blevo sårade och bortförda, vilket hade till följd att de få skott, som avskjöts från våra batterier förfelade sitt mål. Tanksen trängde genom hindret och lyckades t.o.m. släpa slädar med infanteri efter sig längs vägarna på vardera sidan av åsen. Antalet stridsvagnar på Viborgsvägen i ryggen på de våra växte och sannolikt fördes dit även något fotfolk. Minorna torde icke fungerat. Enligt uppgift skall de saknat knallhattar. Buntladdningar

användes av försvaret, stundom med god effekt, men tack vare den öppna terrängen, avsaknaden av pansarvärn och det ursinniga skjutandet från tanksen, voro utsikterna att rå på dem ganska små. En stridsvagn placerade sig invid vår stabskorsu vid den högra vägförgreningen, som den bevakade i många timmar. Vår situation var mycket prekär. Manskaptet hade med mod och offervilja kämpat mot den väldiga övermakten. Nu syntes allt hopplöst. Motståndet tog slut mot kvällen.

Då ingen undsättning kom till vårt JSP på Mustalampiåsen blev vistelsen där alltmåra riskfylld på grund av de förbi-passerande tanksen. Man hade ingen annan utväg än att överge området. Natten mot den 21:a sökte man sig ut ur avsnittet i små grupper åt olika håll. Doktor Lindholm, sanitetsunderserg. Lingonblad och några män från lätta plutonen släpade de svårt sårade på bår till JR 13:s JSP, och hade turen att icke möta någon fiende. Tvenne av våra sanitärer måste gömma sig under en bro, då den passerades av en rysk patrull och en av bårbärarna ådrog sig en svår förfrysning av ena knät, då han gömd för ryssarna låg under en gran. Vid Lintula och Konttula hade vi periodvis stor anhopning av sårade, troligen beroende på motanfallet. Fiendens artilleriverksamhet ökade dag för dag. Vi voro många läkare, vilka delade arbetet, så man hade möjlighet att vila sig. De förbundna sändes med hästfordon till sjukhuset i Kyttilä, en många kilometer lång och besvärlig väg, men bättre arrangemang stod ej till buds. Vägen slingrade sig merendels genom skog, vilket var en stor fördel. Lyckligtvis var det mulet, varför vi ej behövde vara rädda för flyget, fast husen lågo öppet på gårdsplaner. I stället underhölls vi av granatnedslag i vår närhet.

Efter ansträngningarna vid fronten, sannolikt även på grund av bristande, ensidig näring började manskaptets kondition försämrast, vilket tryckte sin prägel på våra mottagningar. Våra trötta och frusna patienter föllo i de varma rummen i djup sömn på golv och bänkar. Köldskador förekommo, snart även sårade. Ryssarnas eld koncentrerades åter mot våra förläggningar.

29.2 hade den sydliga delen av Suur-Pero under natten satts i brand av våra retirerande trupper och senare på dagen stodo alla byggnader på slätten i lågor. Vi hade en dyster och hemsk syn för våra ögon. Det som fredliga människor byggt

och kanske bebott i flere generationer, brann nu till aska under några timmar. Men civilbefolkningen var lyckligtvis evakuerad och långt borta från förstörelsen.

Sanitetsgruppen (som jag senare arbetade med) var heterogen, av slumpen sammansatt. Den ena underofficeren var i det civila mejerikonsulent, den andra restaurangportier. Av bårbärarna hade den äldsta officersgrad inom Frälsningsarmén i Björneborg, en var snickare och de två återstående hade mig veterligen intet yrke ännu. Tre av bårbärarna hörde till de samvetsömma, vilka vägrade bära vapen. Körkarlarna var jordbrukssöner.

När vi efter ständiga flyttningar kom till Tervajoki måste vi taga in i ett hus, som hade sönderslagna fönsterrutor och

allt inuti huller om buller efter ett bombardemang. Sedan vi stoppat fönstren med allsköns paltor, inrättade vi oss för vår blivande mottagning. 8.3 sökte vi en bättre boning, men förgäves. Härvid såg vi vid kanten av stora landsvägen en död soldat i sittande ställning i snödrivan. Han hade uttröttat satt sig ned, domnat av och gått in i den eviga vilan.

Bataljonen led stora förluster i döda och sårade. Vid krigets slut fanns endast någon enda officer och ett fåtal underofficerare vid den yttersta linjen om man frånser dem vid kommendörsstaben, men även för dem höll det på att gå illa. En särskilt tung dag var den 11.3. Vi togo hand om 32 sårade från vår bataljon, men säkerligen besökte många även en annan förbandsstation i trakten.

Mellan den 11:e och 13:nde mars fungerade jag som regementsläkare för en kollega som blivit sjuk. I denna egen-skap måste jag göra färder till högre instanser för att ombesörja anskaffningar och ordna om de sårades och dödas evakuering. Det var ingen lätt sak att få kontakt med divisionens sanitetsstab, ty den höll vid det laget på att flytta nordligare och telefonförbindelserna vore därför avbrutna.

Den 13:nde mars hade jag slumrat en stund. Då jag vaknade hade beskjutningen upphört. En nästan kuslig stillhet rådde. Radion upplyste oss om att freden var sluten. Vi fingo veta de hårda villkoren och vilka omedelbara krav fienden ställt på oss. Ingen kunde glädja sig över en sådan fred.