

Identificering af nye ovariecancerbiomarkører med massespektrometriske proteomanalyser – fremtidens diagnostiske redskab?

Læge Anette Lykke Petri, seniorforsker Estrid Høgdall, klinikchef Svend Aage Engelholm, forskningsleder Ib Jarle Christensen, professor Susanne Krüger Kjær & overlæge Claus K. Høgdall

Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Gynækologisk Klinik 4232

Resume

Nye noninvasive test til diagnosticering af ovariecancer (OC) i tidlige stadier vil kunne bidrage til forbedret overlevelse af patienterne med OC. Proteomundersøgelse af serum eller urin kan være den eftersøgte metode. I præliminære udenlandske undersøgelser af proteomprofiler fra serum og urin har man påvist, at de har større prædiktiv værdi end kombinationen af serum CA125 og ultralyd, som benyttes præoperativt til OC-diagnostik. Identifikation af nye OC-proteombiomarkører med høj sensitivitet og specificitet vil optimalt kunne anvendes til både differentialdiagnostik og screening for OC.

Danmark har den højeste incidens af ovariecancer (OC) i verden og den højeste dødelighed blandt de nordiske lande [1, 2]. Hvert år diagnosticeres der ca. 600 tilfælde af OC hos danske kvinder. Ca. 80% af alle OC-tilfælde diagnosticeres i International Federation of Gynecology & Obstetrics (FIGO)-stadiet III-IV [3], hvor femårsoverlevelsen kun er 5-20% [1, 2]. Sen symptomdebut og mangel på en valid screeningsundersøgelse er nogle af de væsentligste årsager til, at størstedelen af ovariecancertilfældene diagnosticeres i et sent stadium.

For at øge andelen af epitelliale OC-tilfælde, der bliver diagnosticeret i de tidlige stadier, kræves der en ny diagnostisk platform. Serum-cancerantigen 125 (CA125), som er den mest benyttede OC-biomarkør, har både en lav specificitet og sensitivitet [4, 5]. Bruges CA125 som eneste markør i screeningsundersøgelser, har den en positiv prædiktiv værdi på under 10% [4, 5].

Serum CA125, ultralydfund og menopausestatus anvendes til udregning af Risk of Malignancy Index (RMI), hvorved ondartede tumorer i det lille bækken forsøges skelnet fra godartede tumorer. I et dansk studium opgør man sensitiviteten til at være 70% og specificiteten til at være 87% ved brug af RMI på operationspatienter med udfyldning i det lille bækken [6]. I øjeblikket er det fortsat nødvendigt med en eksplorativ laparotomi til eksakt diagnosticering af OC.

En optimal præoperativ markør vil medføre tidlig selektion af patienter til gynækologisk-onkologisk ekspertise, hvil-

ket i sig selv vil forbedre overlevelsen [7]. Samlet vil man både opnå forbedret overlevelse og resursefordeling til opfyldelse af målene i Kræftplan II [8].

Den igangværende biomarkørforskning har som hovedformål at finde markører med høj sensitivitet og høj specificitet. Biomarkøren behøver ikke nødvendigvis at stamme fra en tumor. Den kan være et resultat af sygdomsspecifik og posttranslational modifikation af bundne proteiner i vævsvæsker, hvilket gør proteomic til en nærliggende metode til identifikation af nye biomarkører ved såvel maligne som benigne sygdomme.

Formålet med nærværende artikel er at give en oversigt over principperne ved massespektrometriske proteomanalyser (SELDI-TOF) og deres anvendelighed inden for klinisk OC-diagnosticering.

Metode

Der er søgt i MEDLINE/Pubmed med følgende søgeord: *ovarian cancer, proteomic, biomarker, serum, urine, MALDI-TOF-MS, SELDI-TOF-MS*.

Proteometodologi

Proteomet kan analyseres med traditionel todimensional gel-elektroforese, men analyseres i større kliniske studier hovedsageligt med et massespektrometer [9-11]. Et beskedent krav til mængden af prøvemateriale i kombination med høj analysehastighed gør massespektrometret velegnet til kliniske studier. Til proteomanalyse anvendes hovedsageligt to massespektrometriske analysemetoder *matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight massspectrometry* (MALDI-TOF-MS) og *surface enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight massspectrometry* (SELDI-TOF-MS) [12]. Forskellen på MALDI-TOF-MS og SELDI-TOF-MS ligger primært i måden, som prøvematerialet bearbejdes på, og i det software, som benyttes til bearbejdning af data [12]. Ved MALDI-TOF-MS forberedes prøvematerialet ved tilsætning af matrix, inden det appliceres på en passiv overflade, hvorimod prøvematerialet appliceres direkte på en aktiv overflade ved SELDI-TOF-MS [12]. På grund af den aktive overflade og høje sensitivitet benyttes SELDI-TOF-MS hyppigst ved detektion af nye proteombiomarkører. Metoden er valideret som værende reproducerbar [13].

Når nye og ukendte biomarkører skal detekteres, forsøger man initialt rent kvantitativt at kortlægge så stor en del af proteomet som muligt. Dette gøres ved at anbringe prøve-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

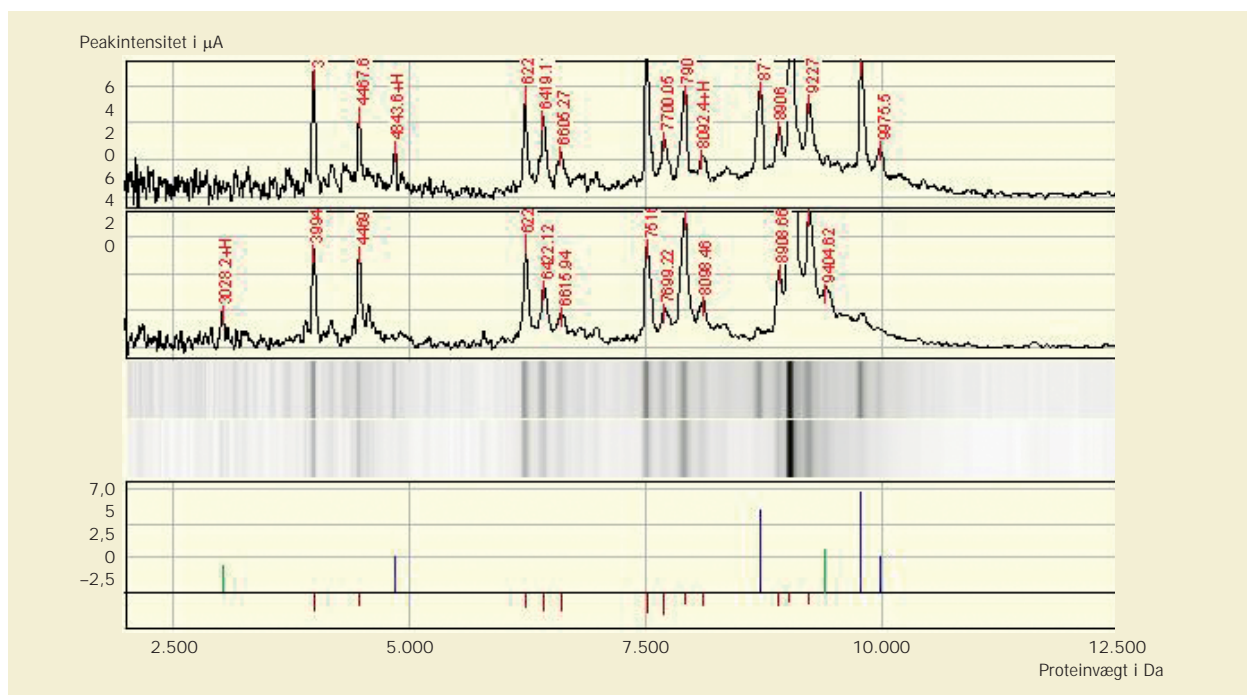
materialet på et bredt udvalg af forskellige proteinchip, som er beklædt med enten et kemisk eller et biologisk materiale. Baseret på generelle egenskaber som f.eks. ladning eller hydrofobicitet vil proteinchippet have høj affinitet til forskellige proteingrupper i prøvematerialet. I massespektrometret beskydes protein-matrix-krystallerne med en nitrogenlaser, hvorved proteinerne ioniseres, desorberes og accelereres mod en detektor i den anden ende af massespektrometrets vacuumrør (Figur 1). »Flyvetiden« måles og *mass to charge-ratioen* (m/z) udregnes automatisk. Ud fra proteinvægt og proteinintensitet genereres en proteinprofil af prøvematerialet.

Til identifikation af nye biomarkører sammenlignes proteinprofilerne fra raske og syge personer i kliniske studier (Figur 2). Pilotstudier identificerer først alle signifikante profilforskelle mellem raske og syge personer som værende potentielle biomarkørkandidater. Proteinerne kan således være enten op- eller nedregulerede hos de syge i forhold til hos de raske personer, eller profiler kan eksempelvis kun eksistere i en af grupperne. I en efterfølgende valideringsfase mindskes listen af potentielle biomarkørkandidater, og kun biomarkører med høj sensitivitet og specificitet vil blive identificeret ved sekvensanalyse og match i en proteindatabase. Identificerede nye biomarkører bliver efter yderligere validering videreudviklet til et *assay*, baseret på SELDI-TOF eller en mere traditionel klinisk diagnostisk platform (f.eks. ELISA).



Figur 1. Illustration af vacuumrøret i massespektrometret. Proteinchippet beskydes med laser, så proteinerne ioniseres og affyres fra chippen. Detektoren rammes tidsmæssigt i relation til proteinernes masse, hvilket registreres som proteinprofiler. Gengivet med tilladelse fra CIPHERGEN Biosystems Inc.

Reproducerbarhed af proteomprofiler fra serum og urin
I 2002 publicerede *Petricoin et al* et banebrydende studium, hvori de anvendte SELDI-TOF-MS til diagnosticering af patienter med OC ud fra serum [14]. I studiet beskrives en sensitivitet på 100% (95% konfidensinterval (KI): 93-100%), en specificitet på 95% (95% KI: 87-99%) og en positiv prædiktiv værdi på 94% (95% KI: 84-99%), når OC identificeres i forhold til kvinder uden cancer. På trods af at *Petricoin's* resultater ikke var reproducerbare [15], har studiet haft stor international betydning og dannet basis for eftertidens videreudvikling af proteomanalyser.



Figur 2. Illustration af sammenligningsgrundlaget, når proteinprofiler fra en cancerpatient sammenlignes med proteinprofiler fra en rask person. 1) Øverst proteomprofiler fra en cancerpatient. 2) Næstøverst proteomprofiler fra en rask patient. 3) Proteintoppe illustreret som et densitometrisk billede (gel-like view). 4) Nederst illustreres forskellen i »proteintoppe«, når cancerpatienten sammenlignes med den raske kontrolpatient. (Grøn pind: proteinet findes kun hos en af forsøgsgrupperne, blå pind: proteinet er opreguleret hos cancerpatienten, rød pind: proteinet er nedregulerende hos cancerpatienten. Gengivet med tilladelse fra CIPHERGEN Biosystems Inc.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Fra tidligere undersøgelser af OC-biomarkører i serum ved man, at stabiliteten af en markør kan afhænge af behandlingsproceduren af prøvematerialet inden analyse [16-19]. I meto-
dearbejde, der beskriver betydningen af håndtering og opbe-
varing af serum og plasma for stabilitet af proteomspektre, har
man påvist, at prøvematerialet skal behandles ens med hen-
syn til opbevaringstemperatur og tid inden nedfrysning [20].

Der har været interesse for kortlægning af det humane
urinproteom på grund af den noninvasive prøveindsamling
og muligheden for indsamling af større og gentagne mængder
urin. Sammenlignet med serum har urin både fordele og
ulemper i relation til proteomundersøgelser ved OC-diagno-
stik. Urin er mindre proteinholdigt og har en højere saltkon-
centration, hvilket gør forbehandlingsproceduren ved urin
mere tidskrævende [21]. Men de lavmolekylære og mindre
komplekse urinproteiner/peptider har imidlertid vist sig at
have en højere termodynamisk stabilitet og være mindre in-
teraktive end proteiner/peptider fra serum, hvilket teoretisk
set gør urin til et lovende materiale ved masspektrometriske
undersøgelser [22-24]. Indtil videre foreligger der kun få, min-
dre studier, hvori man beskriver henholdsvis eksterne og in-
terne faktorer [25] samt opbevaringstidens påvirkning af sta-
biliteten ved SELDI-TOF-MS-analyse af urin [26]. Ingen af
studierne danner grundlag for standardisering af proceduren
ved urinproteomanalyse.

Proteom-ovariecancerbiomarkører

Inden for OC-diagnostik er hovedsagelig SELDI-TOF-MS

anvendt til karakteriseringer af biomarkører [27-29]. Neden-
stående uddybes de største kliniske SELDI-TOF-MS-prote-
omstudier til identifikation af potentielle OC-biomarkører
(**Tabel 1**). På grund af forskellige udregningsmetoder er sensi-
tiviteten og specificiteten i de tre studier ikke sammenlignelig.
Derfor er der i Tabel 1 tilføjet et estimeret areal under kur-
ven for alle studierne.

Zang *et al* identificerede i 2004 tre biomarkører til diagno-
stisering af tidlige stadier af OC fra serumproteomanalyser
med SELDI-TOF-MS [27]. De tre biomarkører blev valideret i
en case-kontrol-undersøgelse med deltagelse fra fem centre.
Undersøgelsen inkluderede i alt 153 kvinder med epithelial
OC, 42 med andre OC-typer, 166 med benigne udfyldninger i
bækkenet og 142 raske donorer [27]. Data fra to af centrene
blev først analyseret uafhængigt af hinanden, hvorefter resul-
taterne blev krydsvalideret ved brug af data fra endnu to an-
dre centre. Efter identifikation af proteinerne blev de biomar-
kører, hvor en immuno-*assay* var mulig, testet med prøverne
fra det femte center. Tre serumbiomarkører til diagnosticering
af tidlig OC blev identificeret: apolipoprotein A1 (ApoA1)
(nedreguleret), en trunckeret form af transthyretin (TTR) (ned-
reguleret) og et kløvet fragment af inter- α -trypsin-inhibitor
heavy chain H4 (ITIH4) (opreguleret). I en multivariatmodel,
hvori man kombinerede de tre biomarkører og CA125, fand-
tes en sensitivitet på 74% (95% KI: 52-90%), hvilket var højere
end sensitiviteten på 65% (95% KI: 43-84%), som fandtes for
CA125 alene med en matchet specificitet på 97% (95% KI: 89-
100%). Ved sammenligning med en fast sensitivitet på 83% (95%

Tabel 1. Sensitivitet og spe-
cificitet ved proteomova-
riecancer-biomarkør-kombi-
nationer og CA125 alene.

Biomarkør- kombination (vægt)	Reference	Antal ovariecancer patienter	Antal raske kontrol personer	Sensitivitet (%)	Specificitet (%)	Estimeret sensitivitet ved 97% specificitet	
						AUC ^{a, b}	Estimeret AUC ^{a, b}
Serum ITIH4 (3,2 kDa), TTR (12,8 kDa), ApoA1 (28 kDa), CA125	27	23 (stadie I/II)	63	74 ^c	97 ^c	74 ^d	0,92
CA125	27	23 (stadie I/II)	63	65 ^c	97 ^c	65 ^d	0,89
Serum TTR (12,9 kDa), TTR (13,9 kDa), Beta-Hb (15,9 kDa), ApoA1 (28 kDa), TF (79 kDa), CA125	28	19 (stadie I/II)	30	86 ^e	86 ^e	76	0,96 ^d
CA125	28	19 (stadie I/II)	30	78 ^e	78 ^e	56	0,83 ^d
Urin EDN (8,7 Da)	29	128 (alle stadier)	188	72	95	68	0,90 ^c
C-osteopontin (17,4 Da)		55 (stadie I/II)		72	93	65	0,89 ^c

a) For reference 27 er arealet under (AUC) *receiver operating characteristic* (ROC)-kurven estimeret.

b) AUC er et estimat for sandsynligheden for, at en tilfældig valgt ovariecancerpatient har en højere biomarkør vægt end en tilfældig valgt kontrolperson. AUC = 1 svarer til komplet adskillelse, og AUC = 0,5 svarer til at »kaste en mønt« (testen har ingen værdi).

c) Uafhængig validering, fast specificitet for raske kontrolpersoner.

d) Tallet præsenteret i referencen. Under forudsætning af ROC-kurve med en simpel funktionel form og de præsenterede sensitiviteter og specificiteter er sensitiviteten ved 97% specificitet estimeret for reference 28 og 29.

e) Multivariatanalyse hvor sensitiviteten og specificiteten er beregnet ud fra de inkluderede markører.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

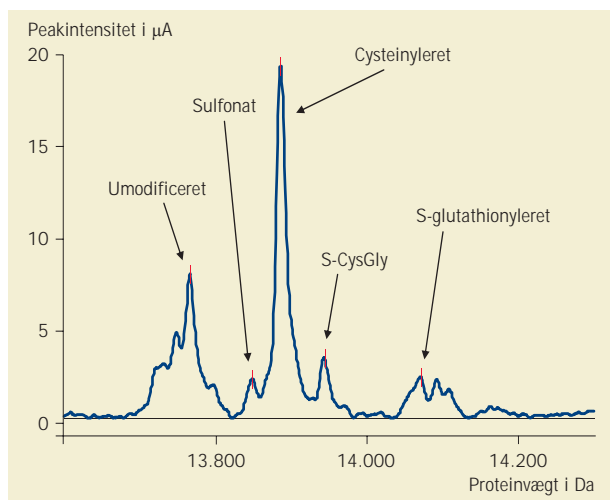
KI: 61-93%) var modelspecificiteten signifikant bedre end for CA125 alene, idet den var på 52% (95% KI: 39-65%).

Kozak et al har efterfølgende karakteriseret et panel på fem markører med SELDI-TOF-MS til diagnosticering af tidlig OC [28]. Markørerne består af to isoformer af TTR, betahæmoglobin (beta-Hb), ApoA1 og transferrin (TF). Ved multivariat analyse fandt man også her en forbedret sensitivitet og specificitet ved diagnostik af tidlig OC med panelet af de fem biomarkører i forhold til CA125 alene [28].

I januar 2006 publicerede *Ye et al* den første undersøgelse af identificerede urinproteomprofiler fra OC-patienter [29]. Præoperativ urin fra følgende patientkategorier blev indsamlet: 128 patienter med epitelial OC 24 med benigne ovariecyster, 28 med endometriose, 24 med anden gynækologisk cancer, 22 med cystitis, 12 med renal cancer og 20 med anden ikkegynækologisk cancer. Til kontrol blev urin fra disse patienter matchet med urin fra 188 aldersmatchede raske kvinder. Proteomanalyserne blev lavet som en *two-step*-analyse. Først blev forskelle i proteomprofiler mellem OC-patienter og patienter uden cancer analyseret med SELDI-TOF-MS og todimensional gelelektroforese, og potentielle biomarkørkandidater blev evalueret med antistofbestemmelse og ELISA-assay. Dernæst blev *assay'et* brugt til screening af urinprøver, der var indsamlet fra OC-patienter, fra kontrolpatienter, der havde andre cancertyper eller benigne lidelser, og raske kvinder. *Ye et al* fandt en signifikant højere protein-peak-intensitet for isoformer af eosinofilderiveret neurotoksin (glykosyleret EDN) og osteopontin (COOH-terminal kløvet osteopontin) hos patienter med tidlige stadier af OC. Sammenlignet med raske kontrolpersoner fandt *Ye et al* en sensitivitet på 72% og en specificitet på 93% ved kombination af de to biomarkører mod en specificitet på respektiv 47% og 63% for osteopontin COOH-fragmenter og glykosyleret EDN alene.

Identificerede ovariecancerbiomarkørers rolle i karcinogenesisen

De identificerede biomarkører er enten akutte fasereaktanter, proteolytiske produkter eller faktorer associeret til inflammation, hvilket støtter teorien om inflammation som en vigtig komponent ved tumorprogression [30]. Teorien giver ikke forklaring på den sygdomsspecifikke proces i relation til proteinekspresion ved cancersygdom [30]. Forhøjede niveauer af disse biomarkører er set ved andre cancertyper, hvilket øger interessen for de sygdomsspecifikke posttranslationelle modifikationer hos isoformer af markørerne. I undersøgelsen af *Zhang et al* er to af de tre biomarkører, TTR og ITIH4, fragmenter af det oprindelige protein. Der er ikke tidligere rapporteret om disse i forbindelse med proteomundersøgelser. TTR er i sin oprindelige form et transportmolekyle for serumtyrosin og trijodtyronin og faciliterer desuden transporten af retinol. TTR er identificeret i flere isoformer (**Figur 3**) og fundet i nedreguleret form ved andre sygdomstilstande end cancer og inflammatoriske tilstande [31]. Ud fra et prognostisk og



Figur 3. Illustration af transtyreitinspektrum fra serum. Forskellige isoformer af transtyreitin er detekteret med en SELDI Q10-proteinchip. Gengivet med tilladelse fra Ciphergen Biosystems Inc.

fremtidsmæssigt perspektiv er det af interesse, at TTR-koncentrationen hos OC-patienter er omvendt proportional med tumorstørrelsen [32]. Det kløvede fragment af ITIH4, som *Zhang* identificerede, er forskelligt fra det fragment af ITIH4, som kløves af plasmakallikrein, hvilket tyder på, at forskellige proteaser er ansvarlige for proteinkløvning [33].

For at øge den diagnostiske specificitet er det nødvendigt med *assays*, som kan detektere og kvantificere de posttranslationelt modificerede former af de proteiner, som dannes ved et sygdomsspecifikt lokalt *host response* i kroppen og efterfølgende indgår i den normale cirkulation. *Fung et al* har på baggrund af TTR- og ITIH4-resultaterne med serum fra bl.a. OC-patienter udviklet et SELDI-TOF-MS-baseret immunologisk og kromatografisk assay til detektion og kvantificering af proteinisoformer [34]. Metoden kræver detektion af yderligere multimarkørpaneler for at kunne bruges til måling af specifikke *host response*-proteiner.

Både ApoA1 og TTR er fundet i en nedreguleret form hos OC-patienter, hvorimod niveauet af ApoA1 ikke var ændret i serum hos bryst- og coloncancerpatienter. Niveauet af TTR var ikke ændret i serum fra bryst- og prostatacancerpatienter [27]. I et mindre studie, hvori serumlipidkoncentrationen hos kvinder med benigne og maligne ovarietumorer blev undersøgt, fandt man ligeledes en signifikant lavere koncentration af ApoA1 hos OC-patienter end hos raske kontrolpersoner [35].

Beta-Hb og TF, som blev identificeret af *Kozak et al* [28], indgår i henholdsvis oxygen- og jerntransporten i blodet. Det er tidligere foreslået, at en biokemisk modifikation af erythrocytmembranen hos kvinder med OC øger muligheden for hæmolyse [36], hvilket medfører en opregulering af beta-Hb hos OC-patienter. Ovenstående forklarer ikke, hvorfor beta-Hb og ikke andre Hb-former er opreguleret, ligesom det ikke forklarer noget om modifikation af erythrocytmembranen ved

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

andre cancerformer. TF er en akut fasereaktant og er, i lighed med *Kozak et al's* resultater, tidligere rapporteret at falde i koncentration hos OC-patienter [37].

Den specifikke funktion af de identificerede OC-biomarkører i urin er endnu ukendt. EDN har blandt andet vist sig at have antitumoraktivitet og antiangiogenetisk aktivitet [38], og serumniveaue af osteopontin er forhøjet ved andre cancertyper [39], om end funktionen af isoformen med det COOH-terminal kløvede fragment, som blev fundet af *Ye et al.*, er ukendt.

Konklusion

I forhold til serum CA125 alene og serum CA125 i kombination med ultralydundersøgelse har paneler af proteombiomarkører i henholdsvis serum og urin en højere sensitivitet og specificitet ved tidlige stadier af OC (Tabel 1). Trods lovende resultater og enighed om proteomteknologiens fremtidige muligheder fra internationalt førende videnskabelige tidsskrifter synes der at være store udfordringer, som skal overvindes, før metoden kan bruges som rutineredskab til diagnosticering og screening af OC-patienter.

Proteomet er, modsat genomet, under konstant dynamisk forandring i form af proteinekspression. Der kræves større viden om cellesignaler hos både syge og raske personer for at få kendskab til de sygdomsspecifikke proteiner. Biobanker med materiale fra raske kvinder, som senere får OC, kan i fremtiden bruges til detektion af biomarkører med høj sensitivitet for præklinisk sygdom. For at kunne omsætte proteomteknologiens muligheder til brugbare diagnostiske test, behøves større prospektive studier med blinde og uafhængige valideringer samt identifikation af yderligere OC-biomarkører. Set i lyset af kritikken af *Petricoin et al's* studium [14] er studiedesignet, herunder udvælgelse af korrekt risikopopulation, en udfordring i sig selv. Studierne af *Zang, Kozak* og *Ye et al* mangler eksempelvis en uddybende beskrivelse af deres raske kontrolgrupper [27-29] og bedre aldersmatchede kontrolgrupper [27, 28].

Jacobs & Menon har konkluderet, at en anvendelig screeningstest for OC kræver en specificitet på minimum 99,6% [40]. Skal dette mål nås, kræver det formentlig, at flere forskellige bioteknologier kombineres, og at man udnytter al tilgængelig bioinformation om OC.

Korrespondance: *Anette Lykke Petri*, Gynækologisk Klinik 4232, Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: alpetri@dadlnet.dk

Antaget: 21. november 2006

Interessekonflikter: *Estrid Høgdall, Claus Høgdall, Svend Aage Engelholm* og *Anette Lykke Petri* er henholdsvis deltagere i og ph.d.-studerende ved det danske Pelvic Mass-studium som er implementeret på Rigshospitalet. Projektet har samarbejde med CIPHERGEN Biosystems Inc. (SELDI-TOF-MS) og Statens Serum Institut (MALDI-TOF-MS). Pelvic Mass-projektet modtager økonomisk støtte fra CIPHERGEN Biosystems Inc

Litteratur

1. Kjaerbye-Thygesen A, Huusom LD, Frederiksen K et al. Trends in the incidence and mortality of ovarian cancer in Denmark 1978-2002 - comparison with other Nordic Countries. *Acta Obst Gyn Scand* 2005;84:1006-12.
2. Ozols RF, Rubin SC, Thomas GM et al. Epithelial ovarian cancer. I: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, red. Principles and practice of gynaecologic oncology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000:981-1058.
3. Benedet JL, Pecorelli S. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). *Int J Gyn Obst* 2000;70:207-312.
4. Menon U. Ovarian cancer screening. *Oncology* 2004;171:323-24.
5. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:1207-10.
6. Andersen ES, Knudsen A, Rix P et al. Risk of malignancy index in the preoperative evaluation of patients with adnexal masses. *Gynecol Oncol* 2003;90:109-12.
7. Giede KC, Kieser K, Dodge J et al. Who should operate on patients with ovarian cancer? *Gyn Onco* 2005;99:447-61.
8. Kræftplan II, Sundhedsstyrelsens anbefalinger til forbedringer af indsatsen på kræftområdet. København: Sundhedsstyrelsen, 2005.
9. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-53.
10. Fenne JB, Mann M, Meng CK et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
11. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys* 1997;30:279-331.
12. Vorderwülbecke S, Cleverley S, Weinberger SR et al. Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip System. *Nature Methods* 2005;2:393-95.
13. Semmes OJ, Feng Z, Adam BL et al. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer. I. *Clin Chem* 2005;51:102-12.
14. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.
15. Ransohoff DF. Lessons from controversy: ovarian cancer screening and serum proteomics. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:315-9.
16. Høgdall EVS, Johansen JS, Kjaer SK et al. Stability of YKL-40 concentration in blood samples. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:247-52.
17. Høgdall EVS, Høgdall CK, Kjaer SK et al. Ovx1 Radioimmunoassay results are dependent on the method of sample collection and storage. *Clinical Chemistry* 1999;45:692-4.
18. Høgdall CK. Stability of tetranectin concentration in blood samples. *Fibrinolysis* 1994;8:101-3.
19. Blaakær J, Micic S, Høgdall CK. Immunoreactive inhibin concentration in blood tested under variable sampling conditions. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996;58:325-28.
20. West-Nielsen M, Høgdall EV, Marchiori E et al. Sample handling for focused mass spectrometric proteomic investigations of serum and plasma. *Analytical Chem* 2005;77:5114-23.
21. Edwards JJ, Tollaksen SL, Anderson NG. Proteins of human urine. III: identification by two-dimensional electrophoretic map position of some urinary proteins. *Clin Chem* 1982;28:941-8.
22. Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Temperature range of thermodynamic stability for the native state of reversible two-state proteins. *Biochemistry* 2003;42:4864-73.
23. Marshall T, Williams K. Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following concentration by dye precipitation. *Electrophoresis* 1996;17:1265-72.
24. Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004;4:1159-74.
25. Schaub S, Wilkins J, Weiler T, et al. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney International* 2004; 65: 323-32.
26. Traum AZ, Wells MP, Aivado M et al. SELDI-TOF MS of quadruplicate urine and serum samples to evaluate changes related to storage conditions. *Proteomics* 2006; 6: 1676-80.
27. Zang Z, Bast RC Jr, Yu Y et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5882-90.
28. Kozak KR, Su F, Whitelegge JP et al. Characterization of serum biomarker for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005;5:4589-96.
29. Ye B, Skates S, Mok SC et al. Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res* 2006; 12:432-41.
30. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
31. Marten NW, Sladek FM, Straus DS. Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors. *Biochem J* 1996;317:361-70.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | EVIDENSBASERET MEDICIN

32. Mahlck CG, Grankvist K. Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:135-40.
33. Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002;48:1198-205.
34. Fung ET, Yip TT, Lomas L. Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer* 2005;115:783-89.
35. Gadowska H, Grzechociska B, Janecki J et al. Serum lipids concentration in women with benign and malignant ovarian tumours. *Eur J Obst Gyn Reprod Biol* 2005;120:87-90.
36. Kopczyński Z, Kuzniak J, Thielemann A et al. The biochemical modification of the erythrocyte membranes from women with ovarian cancer. *Br J Cancer* 1988;78:466-71.
37. Rai A, Zhang Z, Rosenzweig J et al. Proteomic Approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1518-26.
38. Pati S, Lee Y, Samaniego F. Urinary proteins with pro-apoptotic and anti-tumor activity. *Apoptosis* 2000;5:21-8.
39. Mor G, Visintin I, Lai Y et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7677-82.
40. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Nature* 2003;425:905.

Farmakologisk vægttabsbehandling af type 2-diabetes-patienter

Overlæge Søren Toubro

Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Human Ernæring, og Hvidovre Hospital, Ernæringskonsulenterne Afdeling 225

Sammenhængen mellem adipositas og risikoen for udvikling af type 2-diabetes (T2D) og komplikationer i forbindelse hermed er veldokumenteret. Blandt T2D-patienter er overvægt udtrykt fænotypisk ved forhøjet *body mass index* (BMI) eller taljemål til stede hos > 90% af patienterne. Prævalensen af adipositas vokser med panepidemisk karakter, således også i Danmark, hvor mere end 50% af befolkningen har et BMI > 25 kg/m². Den store stigning i prævalensen af fedme vil derfor senere slå igennem som T2D. De markante omkostninger til behandlingen betyder, at T2D bliver en politisk udfordring for vores solidariske sundhedssystem.

Vægttab udgør hovedhjørnestenen i behandlingen af T2D, fordi det udskyder sygdomsdebuten og de primært kardiovaskulære komplikationer. Den præventive effekt af vægttab har været dokumenteret i kirurgiske studier, hvor et bevaret vægttab på 20-25 kg efter ti års opfølgning medførte en 75% reduktion i antallet af nye T2D-tilfælde [1]. Effekten af kirurgisk vægttabsbehandling er nu også påvist at kunne reducere mortaliteten med 31% baseret på 16 års opfølgingsdata, denne effekt skyldes primært reduktion i akut koronarsyndrom [2]. Ligeledes har farmakologisk behandling i kombination med intensiv kost- og motionsvejledning over en fireårig periode hos en gruppe prædiabetiske risikopatienter vist en markant 40% reduktion i antallet af nye diabetestilfælde [3]. Vægttabet hos T2D-patienter angives ofte at være mindre end hos adipøse non-T2D-patienter. Dette kan delvist forklares af en aldersforskel mellem de sammenlignede grupper og studier.

En kombination af manglende efterlevelse af kost- og motionstiltag og stigende diabetesvarighed medfører en manglende opnåelse af behandlingsmålene, herunder glykeret hæmoglobin (HbA_{1c}) < 6,5%. Behandlingen suppleres derfor i første omgang farmakologisk med tabletter. Dette medførte ifølge UKPDS-studiet en vægtøgning på ca. 2 kg for patienter, der blev behandlet med sulfonylurinstoffer, i forhold til patienter, der blev behandlet med diæt, mens behandling med biguanider var vægtneutral, hvorfor sidstnævnte anbefales som førstegangsvægtvalg til adipøse T2D-patienter. Yderligere tilføjelse af behandling med *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)-agonister fremkaldte et fald i HbA_{1c} på 1% og en vægtøgning på 2-4 kg. Faldet i HbA_{1c} var mindre ved samtidig behandling med insulin. Væskeretention under behandling med PPAR-agonister har givet anledning til en debat om den kardiovaskulære risiko efter publicering af PROactive-studiet [4].

Langtidseffekten af peroral farmakologisk behandling er oftest tidsbegrænset. Dette forklares primært ved den fortsatte destruktion af de insulinproducerende β -celler, hvilket efter en årrække leder til insulinbehandling for at opfylde de terapeutiske mål. Ved et optimalt insulinregimen angives det, at 50-70% af patienterne opnår disse mål.

Insulinbehandlingen med *neutral protamine Hagedorn* (NPH)-analoger bevirker trods et fald i HgA_{1c} på 1-1,5% desværre endnu en forværring af den allerede eksisterende adipositas i form af en vægtøgning på 2-4 kg. Dog skal det bemærkes, at vægtøgningen efter et års behandling med den nye insulinanalog detemir kun er ca. 50% (½-1 kg) af den vægtøgning, der sker ved behandling med NPH-analogerne. Over en årrække kan den nuværende medicinske behandling således have fremkaldt en samlet vægtøgning på 4-10 kg.

Vægtøgning udgør hermed en uheldig bivirkning ved peroral farmakologisk insulinbehandling af T2D-patienten. Det er derfor yderst relevant at gennemgå data fra en Cochrane-analyse af vægttabseffekten (slutvægt - startvægt)