

Kronisk træthedssyndrom, en usynlig sygdom?

”Seahorse XF”-teknologi kan måle cellers evne til at producere energi under stress og afslører dysfunktionelle energisystemer i Kronisk træthedssyndrom.

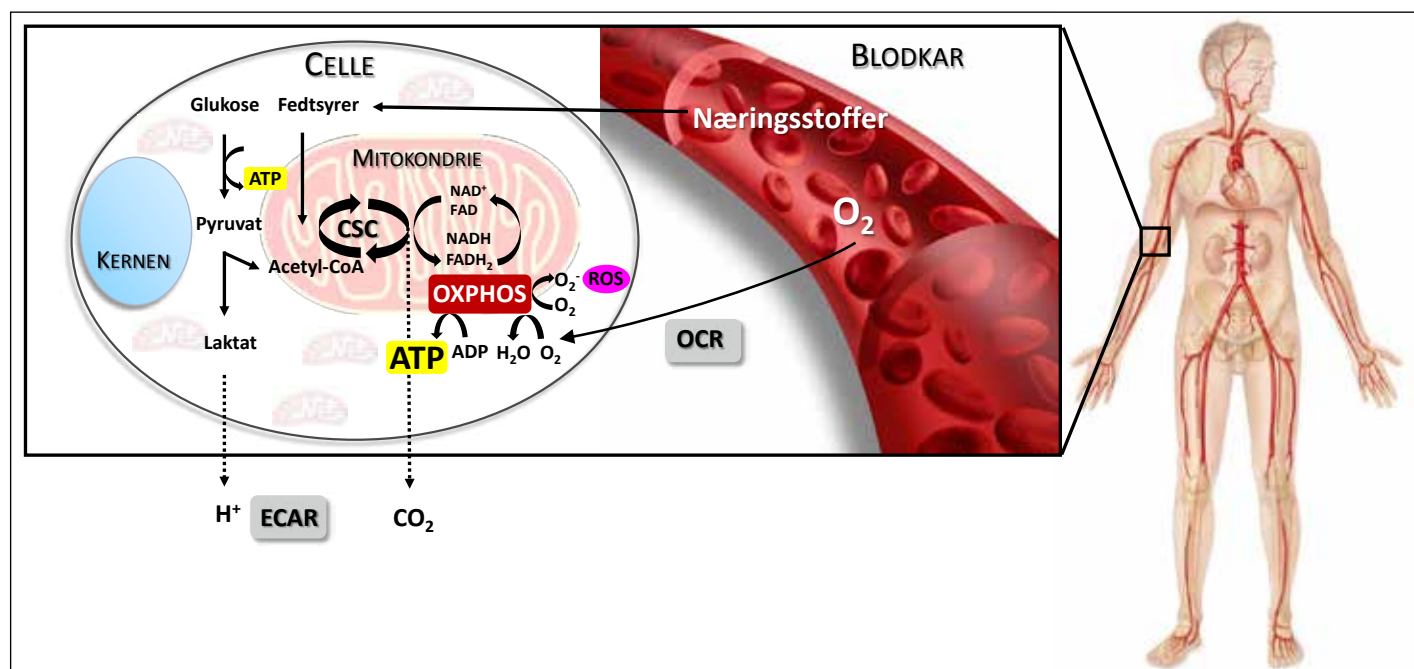
Af Rikke Katrine Jentoft Olsen, lektor ved Molekylær Medicinsk Forskningsenhed, Institut for Klinisk Medicin, Aarhus Universitet og Aarhus Universitetshospital, Lasse Martlev, Nordisk Seahorse Produktspecialist, Agilent Technologies, Paula Fernandez Guerra, Post.doc ved Molekylær Medicinsk Forskningsenhed, Institut for Klinisk Medicin, Aarhus Universitet og Aarhus Universitetshospital og Louise Brinth, læge ved Kardiologisk Afdeling/Koordinerende Forskningsenhed, Bispebjerg Frederiksberg Hospital

Evolutionen har udrustet vores celler med små kraftværker - mitokondrierne, der mobiliserer de nødvendige energi- og forsværssystemer, når vi udsættes for stress. Ny forskning tyder på, at dysfunktionelle mitokondrier spiller en central rolle i den ekstreme udmattelse, som patienter med Kronisk træthedssyndrom oplever ved fysisk og mental anstrengelse. Seahorse XF-teknologi er en metode, der kan måle mitokondriernes energiomsætning i levende celler under stress. Forskere fra Molekylær Medicinsk Forskningsenhed, Aarhus Universitet og Synkocenteret, Bispebjerg Frederiksberg Hospital er gået sammen med Agilent Technologies, der udbyder

Seahorse XF-teknologi, med henblik på at få en større indsigt i mitokondriernes rolle i Kronisk træthedssyndrom. Lykkes det at udvikle mitokondrielle sygdomsmarkører og behandlingsmetoder, er der tale om en medicinsk revolution for en sygdom, der i mangel på målbare sygdomsmarkører, er blevet kaldt ”den usynlige sygdom”.

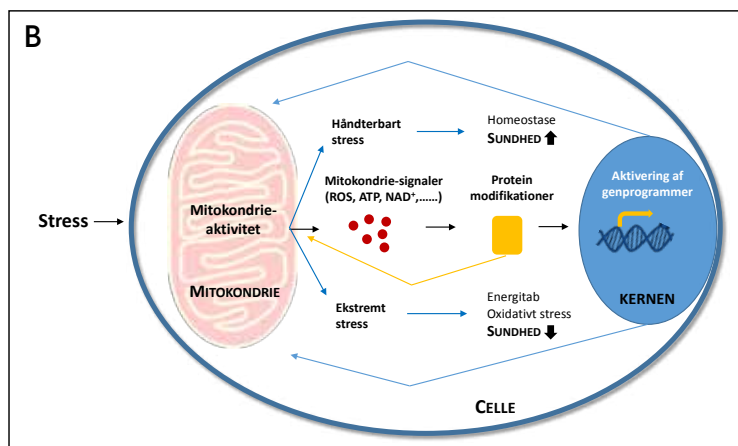
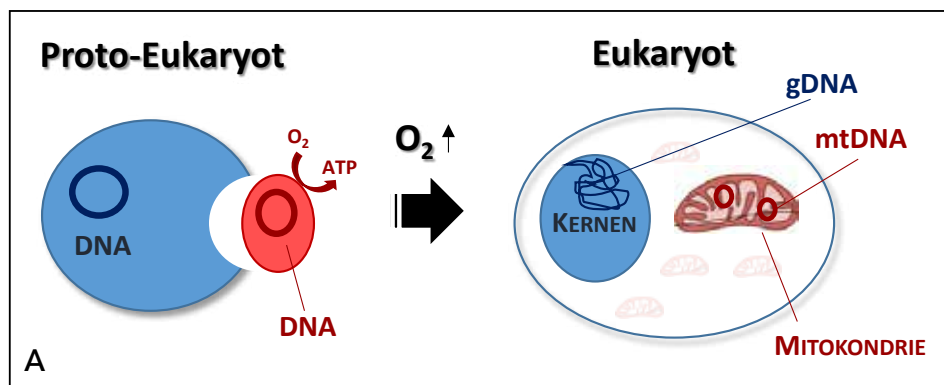
Kronisk træthedssyndrom, en omstridt sygdomstilstand

Kronisk træthedssyndrom er en omstridt medicinsk tilstand, karakteriseret ved en kronisk invaliderende træthed, og en langvarig og ofte forsinket udmattelse efter fysisk og mental anstrengelse. Årsagen



Figur 1. Mitokondrierne er cellens kraftværker.

Skematisk repræsentation af en celle med mitokondriet centralt placeret. Cellen optager ilt og næring fra blodbanen. I cellen omdannes næringsstoffer i form af glukose og fedtsyrer til acetyl-CoA, som giver substrat til Citronsyrecyklus (TCA). I TCA forbrændes acetyl-CoA til CO_2 og de overskydende H-atomer overføres til hydrogentransportørerne NAD og FAD. Herefter overføres energien fra NADH og FADH_2 til ilt via elektrontransportkæden (OXPHOS) i mitokondrie-membranen. ATP kan også dannes uafhængigt af elektrontransportkæden, i cytosolen ved en proces, der kaldes glykolyzen. Ved glykolyzen forbrændes glukose til pyruvat. Pyruvat kan forbrændes yderligere via mitokondriel respiration eller kan blive omdannet til laktat. Ved Seahorse XF-teknologi, se figur 4, side 23, måles iltforbruget (OCR = Oxygen Consumption Rate), som et udtryk for aktiviteten af elektrontransportkæden og den ekstracellulære forsyingsgrad (ECAR = Extracellular Acidification Rate), som et udtryk for glykolytisk laktat-produktion.



Figur 2. Mitokondrier og stresssignaler. Mitokondriernes oprindelse udgør en af de vigtigste begivenheder i jordens historie og definerer årgangen til den Eukaryote celle og flercellede organismer med vævsspecifikke organsystemer. For ca. 2.4 milliarder år siden - i overgangen fra en iltfattig til en iltrig atmosfære - optog en protoeukaryot celle en respirerende bakterie, der siden udviklede sig til mitokondriet. I processen overførte den respirerende bakterie store dele af sit eget genom (DNA) til værtsens kerne-genom, og der opstod et gensidigt afhængighedsforhold, hvor mitokondriernes evne til at koble ilt til produktionen af henholdsvis

ATP og reaktive iltradikaler løbende justeres i forhold til cellens funktion, livscyklus samt behov for at beskytte sig mod udefrakommende stresspåvirkninger. Det indbyrdes afhængighedsforhold sikres via sindrige molekylære kommunikationssystemer mellem mitokondrierne og cellekernens genom. Mitokondrierne udsender signaler, bl.a. reaktive iltradikaler, der kan aktivere transskriptionsfaktorer og sikre aktivering af målrettede genprogrammer til genoprettelse af homeostases. Mitokondrierne kan ligeledes sikre en slags metabolisk hukommelse af stressbegivenheden. Dette sker ved, at mitokondriesignaler efterlader kemiske ændringer i cellens kernegenom (såkaldte epigenetiske ændringer), der sikrer et hurtigt og målrettet stressrespons ved fremtidige stresspåvirkninger. Kortvarige og håndterbare stresspåvirkninger er derfor sundhedsfremmende, mens kroniske eller ekstreme stresspåvirkninger kan forstyrre stresssignalerne og føre til sygdom. Figur 2B er modificeret fra artiklen Wallace DC. *Genetics: Mitochondrial DNA in evolution and disease. Nature. 2016.*

til sygdommen kendes ikke, og der eksisterer ingen biomarkører, der entydigt kan stille diagnosen. En årelang debat har hersket i videnskabelige og sundhedsfaglige kredse om, hvorvidt sygdommen skal kategoriseres og behandles som en somatisk eller psykiatrisk lidelse. Den mangelfulde sygdomsforståelse gør, at patienterne ofte gennemgår langstrakte og dyre udredningsforløb til stor belastning for sundhedssystemet og patienterne selv.

Internationale forskningsstudier har dokumenteret forandringer i såvel det autonome nervesystem, immunsystemet og i patienternes metaboliske funktion. Det er blevet foreslået, at disse fysiologiske mekanismer, som kroppen mobiliserer i forbindelse med fysisk og psykisk stress, direkte eller indirekte kan bidrage til udviklingen af Kronisk træthedssyndrom. Klinisk anerkendelse og implementering af forskningsresultaterne har dog været begrænset af uensartede fund, omstridte og skiftende diagnosekriterier og af manglen på cellulære mekanismer, der kan forklare sygdommens multisystemiske og psykosomatiske karakter. Meget taler for, at cellens små kraftværker, mitokondrierne, kunne være den samlende faktor.

Dysfunktionelle mitokondrier i Kronisk træthedssyndrom

Mitokondrierne er små trådlignende organeller, der findes i stort set alle vores celler. De kaldes cellens kraftværker, fordi de forbrænder kroppens brændstoffer i form af glukose, fedtsyrer og aminosyrer til energimolekylet adenosintrifosfat (ATP). ATP dannes under forbrug af ilt i mitokondriernes elektrontransportkæde. Mitokondrierne driver således respirationen og sikrer energi til cellen og kroppens mange funktioner, figur 1.

Hjertelunge-funktionstest og målinger af metabolitter i serum og plasma indikerer, at patienter med Kronisk træthedssyndrom har nedsat evne til at producere ATP ved mitokondriel respiration. Patienterne kompenserer ved at omprogrammere deres energiproduktion til glykolyse, der finder sted i cytosolen, uden for mitokondrierne. Ved glykolyse kan glukose omsættes

Busch Vakuump teknologi til den kemiske industri

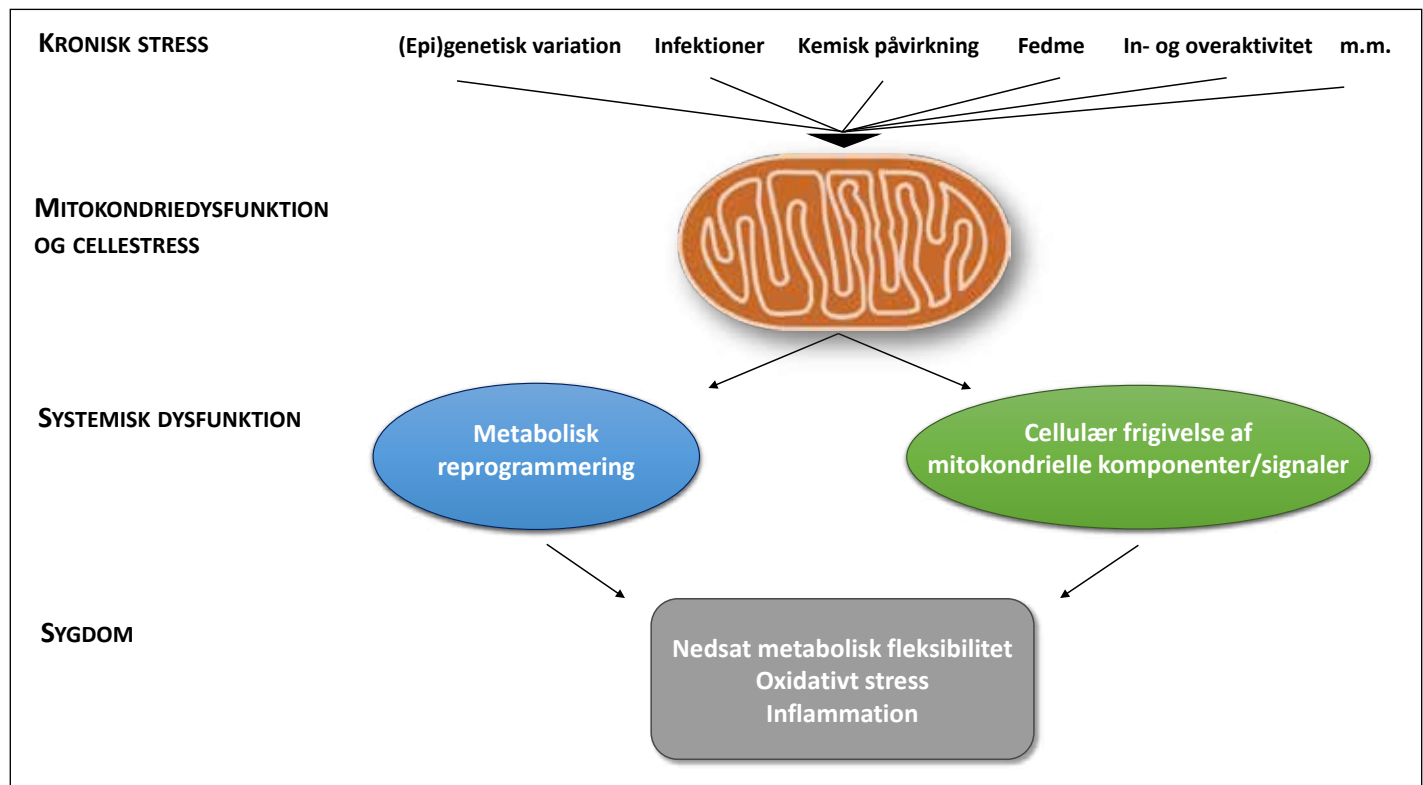
Busch tilbyder et bredt produktsortiment, så du kan finde den bedste vakuum løsning til din kemiske eller farmaceutiske anvendelse.

Stol på en pålidelig vakuum partner.
Stol på Busch.



Busch Vakuumpumpen A/S
+45 87 88 07 77 | info@busch.dk
www.busch.dk





Figur 3. Kronisk stress, mitokondriedysfunktion og sygdom.

til mælkesyre/laktat med et relativt lille ATP-udbytte. En lignende proces finder også sted hos raske ved ekstremt muskelarbejde, hvor musklerne ikke får tilført nok ilt til mitokondrierne. Tilstedeværelse af mælkesyre forsure musklerne, og er forbundet med muskeltræthed, som netop er et af kernesymptomerne ved Kronisk træthedssyndrom.

Årsagen til denne ændring i mitokondriernes funktion hos patienter med Kronisk træthedssyndrom kendes ikke. Fald i mitokondriernes respirationskapacitet er fundet i en række kroniske livsstilssygdomme og aldring, og vi har påvist lignende ændringer i patienter med medfødte fejl i mitokondrierne. En teori er, at kroniske stresspåvirkninger i disse sygdomstilstande overbelaster og udmatter cellulære og fysiologiske stresssystemer, som i stor udstrækning er koblet til mitokondriernes energifunktion.

Mitokondrierne sikrer cellulær overlevelse og reparation ved stress

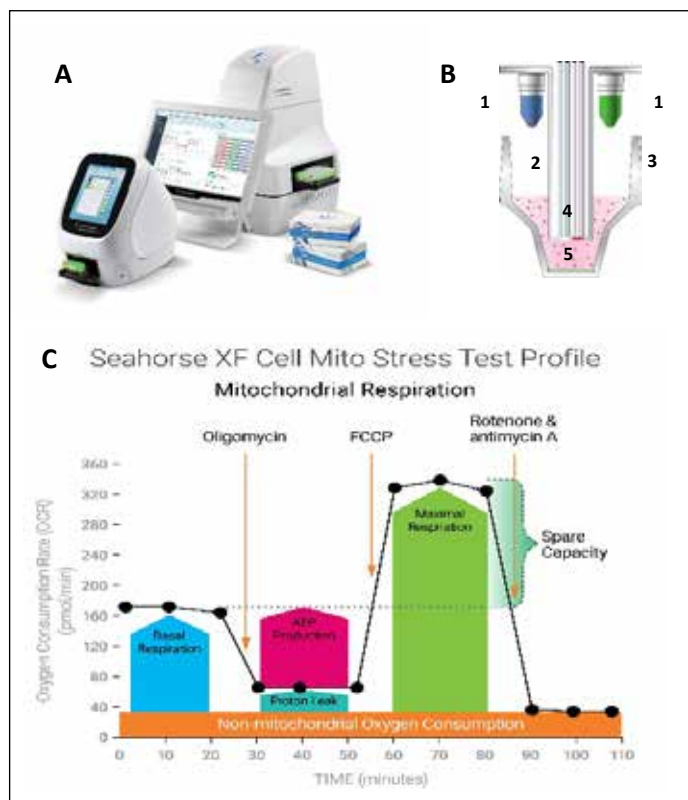
Gennem evolutionen har mitokondrierne været, og er fortsat, styrende for cellens og dermed organismens evne til at tilpasse sig ændringer i det omkringværende miljø, figur 2, side 21.

Helt centralt for denne rolle er mitokondriernes evne til ikke blot at koble ilt til produktionen af ATP, men også til produktion af reaktive iltradikaler, de såkaldte "reactive oxygen species" eller ROS. ROS dannes som et naturligt biprodukt i forbindelse med produktionen af ATP i elektrontransportkæden, figur 1, side 20. I forbindelse med en ydre stresspåvirkning (eksempelvis en infektion) øger mitokondrierne produktionen af ROS, der effektivt kan tilintetgøre indtrængende bakterier eller virus. I cellens reparations- eller vedligeholdelsesfase kobler mitokondrierne ilt til ATP-produktion med henblik på at genoprette forbrugte energireserver. Samtidigt iværksættes antioxidante og antiinflammatoriske systemer for at modvirke oxidative skader på cellens egne komponenter, og cellens mængde af mitokondrier øges. Disse tilpasninger sker i høj grad ved, at mitokondrierne udsender signaler (bl.a. finjuste-

rede koncentrationer af ROS) til regulatoriske proteiner og til kernegenomet, hvorved målrettede genprogrammer igangsættes og cellulær homeostase genoprettes. Hvis de cellulære skader ikke kan repareres, udsender mitokondrierne systemiske signaler, der aktiverer immun-inflammatoriske og neuroendokrine signaler samt det autonome nervesystem. Herved alarmeres hele organismen og der etableres systemiske ændringer i organismens metabolisme og adfærd, der hjælper til håndtering af stresspåvirkningen, figur 3.

Kroniske stresspåvirkninger kan forstyrre mitokondriernes kommunikation med cellekernens genom og skabe en tilstand, hvor mitokondrierne er i konstant forsvarsposition. Dette er formentlig en evolutionært konserveret mekanisme, der tillader cellen at overleve under vedvarende stressexponering. Prisen for denne tilpasning er en nedsat evne til at genoprette energireserver og bekæmpe oxidative skader ved selv almindelige stresspåvirkninger, og en følgelig nedsat funktionsevne og forringet livskvalitet. Det er endnu uvist, hvad der driver udmattelsen af de mitokondrielle stresssystemer i Kronisk træthedssyndrom, og om forskellige patienter har forskellige grader af mitokondriedysfunktion. Det er også uklart, i hvilken grad mitokondriedysfunktionen hos patienter med Kronisk træthedssyndrom adskiller sig fra den dysfunktion, der ses ved andre kroniske livsstilssygdomme, og om den kan modvirkes eller repareres.

Seahorse XF-teknologi er en metode, der kan måle mitokondriernes energiomsætning og metabolisk fleksibilitet i levende celler under stress, figur 4. Amerikanske forskere har for nyligt vist, at denne teknologi kan påvise mitokondrielle forandringer i blodceller fra patienter med Kronisk træthedssyndrom. Vi har opnået lignende resultater i en mindre gruppe danske patienter – data, der endnu ikke er publiceret. Vores ønske er at kombinere SeaHorse-teknologi med undersøgelser af globale forandringer i patienternes protein- og metabolitmønstre, og relatere disse til målbare forandringer i det autonome nervesystem og immunsystemet med henblik på at identificere diagnostiske biomarkørprofiler og teste behandlingseffekten af medikamenter



Figur 4. Agilent Seahorse XF Analyzers.

A: Seahorse XF Analyzer. **B:** Skematisk repræsentation af Seahorse XF cellebrønd og sensor probe. 1) Integrerede injektionsporte, 2) sensor probe, der sænkes og danner mikrokammer, 3) cellebrønd med cellemedie, 4) sensor til detektion af OCR og ECAR, 5) mikrokammer med celler i bunden. **C:** Skematisk repræsentation af resultaterne fra en Seahorse XF Cell Mito Stress Test, der anvendes til at analysere funktionen af mitokondriet. Her måles OCR over tid, hvor den basale respiration måles først (blå). Ved første injektion tilsættes oligomycin, der hæmmer ATP-syntasen i elektrontransportkæden, hvorved der sker et fald i OCR og man får et indirekte mål for ATP-produktionen (lilla). Anden injektion er FCCP ("uncoupler"), som tillader protonerne at passere frit gennem mitokondrie-membranen, hvorved OCR øges. Dette er et mål for den maksimale respiration (grøn). Forskellen mellem den basale og maksimale respiration er et udtryk for cellens kapacitet til at øge den mitokondrielle respiration. Tredje injektion er rotenone og antimycin A (hæmmer henholdsvis kompleks I og kompleks III i elektrontransportkæden), hvorved den mitokondrielle respiration stoppes, og der dannes et mål for proton-lækage fra membranen (turkis) samt oxygenforbrug, der sker uafhængigt af mitokondriet (orange).

og interventioner, der kan genoprette mitokondriernes funktion og evne til at kommunikere med kernegenomet.

Seahorse XF-teknologi

Agilent Seahorse XF-teknologi er en patenteret teknologi, der i real-tid måler forskellige metaboliske parametre og funktioner i levende celler.

Agilent Seahorse XF Analyzers måler cellulære metaboliske funktioner via de to store energiskabende processorer - mitokondriel respiration og glykolyse - på levende celler vha. label-frit system med sensor-prober i et mikropulverformat, figur 4A.

Glykolyse genererer ATP uafhængigt af oxygen ved at producere mælkesyre. Instrumentet måler denne forsurening (pH) af mediet fra cellen og udtrykker det som "Extracellular Acidification Rate" eller ECAR, figur 1, side 20.

Mitokondriet genererer også ATP ved at forbruge oxygen og oxidere glukose, fedtsyrer og aminosyrer. Den mitokondrielle

Kronisk træthedssyndrom

Sygdommen har været udsat for mange forskellige diagnosekriterier og medicinske sygdomsbetegnelser. De mest anvendte internationale kliniske betegnelser er "Chronic fatigue syndrome (CFS)" og/eller "Myalgic Encephalomyelitis (ME)".

0,2% og 0,4% af befolkningen skønnes at lide af CFS/ME, hvilket i Danmark svarer til mellem 10.000-20.000 personer.

Hos ca. 80% af patienterne opstår sygdommen oftest i forbindelse med en infektion. Andre udløsende faktorer kan være kemisk påvirkning eller et større fysisk eller psykisk traume.

I fremskredne stadier er patienterne ude af stand til at arbejde og deltage i et normalt socialt liv. Ca. 5% af patienterne er bundet til sengen.

Unge kvinder, der rapporterer bivirkninger efter vaccination med Human Papillomavirus (HPV), udviser et lignende syndrom.

I Danmark og flere andre lande kategoriseres sygdommen som en funktionel eller psykosomatisk lidelse, og behandlingen er kognitiv adfærdsterapi og graderet genoptræning, evt. kombineret med psykofarmaka.

Mitokondrier og evolutionær tilpasning

"Det er ikke den stærkeste eller mest intelligente art, der overlever, men derimod den art, der bedst kan tilpasse sig forandringer".

Citatet er oversat fra et af Charles Darwins videnskabelige værker. I dag ved vi, at det i stor udstrækning er mitokondrierne, der er styrende for cellens og dermed organismens evne til at tilpasse sig ændringer i det omkringværende miljø.

Patienter med Kronisk træthedssyndrom kunne udgøre en lille andel af befolkningen, som er arveligt mere sårbare med hensyn til at håndtere miljøpåvirkninger i form af eksempelvis infektioner, kemikalier og fysisk/mentalt aktivitet.

respiration måles via ændringen af oxygenforbruget, og kaldes "Oxygen Consumption Rate" eller OCR, figur 1, side 20.

For at måle ECAR og OCR skaber en sensor i hver cellebrønd et mikrokammer, figur 4B, som tillader systemet hurtigt at kunne detektere ændringer i både oxygen-koncentration og pH i mediet. Der kan måles gentagne gange fra minutter til flere timer og under forskellige temperaturforhold.

Pipettecenteret

Kalibrering og service af alle fabrikater pipetter.

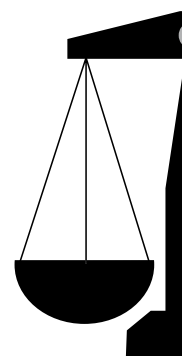
Vi kalibrerer både ved indsendelse eller på kundens adresse.

Salg af pipetter og laboratorie varer.



Pipettecenteret

Skovkanten 41 · 4700 Næstved
Tlf. 55 73 62 05 · Mobil 30 33 32 49
Email: nielslindgaard@stofanet.dk
www.pipettecenteret.dk



Ved hver sensor er der integrerede injektionsporte, som giver mulighed for at tilsætte op til fire reagenser - substrater, inhibitorer, drugs etc., figur 4B, side 23. Injektionen kan programmeres således, at den automatisk tilsætter sit indhold i hver cellebrønd i cellepladen på et ønsket tidspunkt.

Teknologien inkluderer også kits og reagenser, som muliggør måling af mitokondriel respiration fra glukose, fedtsyrer og andre substrater, figur 4C, side 23. De kan anvendes til en lang række celletyper, såsom primære celler, celler i suspension, adhærente celler, isolerede mitokondrier, islets, 3D spheroids, zebrafisk, *C. elegans*, *D. Melanogaster*, gærceller og andet biologisk materiale.

Teknologien anvendes inden for en lang række forskningsområder, hvor mitokondrierne vides at spille en rolle, såsom kræftsygdomme, diabetes, immunologi og hjertekarsygdomme.

Tak til

Vores kollegaer og patienterne, der har bidraget med viden og vævsprøver til studierne. Specielt tak til Lektor Peter Bross og bioanalytiker Helle Just, der har bidraget til etablering af Seahorse XF-teknologi ved Molekylær Medicinsk Forskningsenhed, Aarhus Universitetshospital.

E-mail:

Rikke Olsen: rikke.olsen@clin.au.dk

Lasse Martlev: lasse.martlev@agilent.com

Kilder

Committee on the Diagnostic Criteria for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome, Board on the Health of Select Populations, Institute of Medicine. Beyond Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Redefining an Illness. Washington (DC): National Academies Press (US); 2015 Feb 10. <http://me-foreningen.dk/>.

Vermeulen RC, Vermeulen van Eck IW. Decreased oxygen extraction during cardiopulmonary exercise test in patients with chronic fatigue syndrome. *J Transl Med*. 2014 Jan 23;12:20.

Keller BA, Pryor JL, Giloteaux L. Inability of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients to reproduce VO_2 peak indicates functional impairment. *J Transl Med*. 2014 Apr 23;12:104.

Fluge Ø, Mella O, Bruland O, Risa K, Dyrstad SE, Alme K, Rekeland IG, Sapkota D, Røslund GV, Fosså A, Ktoridou-Valen I, Lunde S, Sørland K, Lien K, Herder I, Thürmer H, Gotaas ME, Baranowska KA, Bohnen LM, Schäfer C, McCann A, Sommerfelt K, Helgeland L, Ueland PM, Dahl O, Tronstad KJ. Metabolic profiling indicates impaired pyruvate dehydrogenase function in myalgic encephalopathy/chronic fatigue syndrome. *JCI Insight*. 2016 Dec 22;1(21):e89376.

Naviaux RK, Naviaux JC, Li K, Bright AT, Alaynick WA, Wang L, Baxter A, Nathan N, Anderson W, Gordon E. Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 13;113(37):E5472-80.

Olsen RK, Cornelius N, Gregersen N. Redox signalling and mitochondrial stress responses: lessons from inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2015 Jul;38(4):703-19.

Wallace DC. Genetics: Mitochondrial DNA in evolution and disease. *Nature*. 2016 Jul 28;535(7613):498-500.

Tomas C, Brown A, Strassheim V, Elson J, Newton J, Manning P. Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS One*. 2017 Oct 24;12(10):e0186802.



Esben Taarning, R&D Director i Haldor Topsøe A/S (tv.) modtager Torkil Holm Prisen 2018 af Klaus Bock fra priskomiteen. Foto: Tom Jersø.

Torkil Holm Prisen 2018 til Esben Taarning

Den 37-årige R&D Director ved Haldor Topsøe A/S, Esben Taarning, modtog Torkil Holm Prisen 2018. Hvert andet år uddeles Torkil Holm Prisen til en yngre kemiforsker, som har opnået anerkendelse inden for sit felt og som har potentiale for yderligere forskningsmæssig udvikling.

Prisen er på 50.000 kr. og blev overrakt ved det internationale kemisymposium Torkil Holm Symposiumet. I begrundelsen for tildelingen af prisen sagde formanden for priskomiteen, professor ved DTU Kemi, David Tanner:

- Esben Taarning tildeles prisen for sit enestående bidrag til udviklingen af bæredygtige og katalytiske metoder for valorisering af biomasse, dvs. omformningen af biomasse til værdifulde kemikalier, der kan bruges til kemisk syntese.

Esben Taarning er 37 år, cand.scient. i kemi fra Københavns Universitet og ph.d. fra DTU Kemi. I 2009 blev han ansat som forsker i Haldor Topsøes Research & Development-afdeling, og i 2016 blev han udnævnt som R&D Director, Sustainable Chemicals samme sted.

Torkil Holm Symposiumet afholdes hvert andet år i samarbejde mellem Torkil Holm Fonden og ATV.

Thomas Bjørnholm forskningsdirektør i Villum Fonden

Thomas Bjørnholms opgave som ny forskningsdirektør i Villum Fonden bliver at give støtte til teknisk og naturvidenskabelig forskning. Fonden tildeler årligt godt en milliard kroner, hvoraf halvdelen går til teknisk og naturvidenskabelig forskning, som Bjørnholm bliver ansvarlig for.

Thomas Bjørnholm blev 1. september 2010 prorektor på Københavns Universitet. Han kom fra en stilling som leder af Nano-Science Center på Det Naturvidenskabelige Fakultet på KU. Som prorektor har Thomas Bjørnholm haft ansvaret for forskning og innovation. Han har bl.a. været igangsætter og anker på initiativer som Tenure Track-ordningen, stjerneprogrammer og 2016-puljer til tværdisciplinær forskning samt engageret i f.eks. Greater Copenhagen

Kilde: KU