

Fra Akk-O-Ve(!) til epitop

Et personlig tilbakeblikk på norsk allergenforskning

SAMMENDRAG:

I denne artikkelen gir professor Kjell Aas et personlig tilbakeblikk på norsk allergenforskning fra 1955 og fram til slutten av 1960-tallet. Sentralt i forskningsarbeidet står forsøk med anti-katarrvaksine (AKV) ved behandling av astma og allergi, og senere utvikling og rensing av allergenekstrakter.

Gjennom møysommelig immunologisk forskning greide man på 1960-tallet, ved hjelp av serum fra torsk, også å isolere et protein som viste seg å være det mest aktive fiskeallergen.

Kjell Aas

er pensjonert professor ved Universitetet i Oslo og tidligere leder av Voksentoppen senter for barn med astma og allergi.

KONTAKTADRESSE:

Kjell Aas
Kragstubbene 30
0783 Oslo
kjelaas2@online.no

KJELL AAS, Oslo

Denne beretningen startet for 50 år siden. Nå blir den ikke ledsaget av presise data og utvalgte litteraturreferanser. Forfatteren kvittet seg med alt sånt da han tømte kontoret sitt for godt. Leseren må derfor nøye seg med noen minner fra et utfordrende og spennende forskningsfelt. Den som ønsker detaljer, kan finne mye ved å søke etter «Abstracts» på PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>) med søkeord Aukrust L, Dale S, Elsayed S, Frostad AB, Grimmer Ø, Vik H og Aas K. Da vil det dukke opp navn på flere som har bidratt i denne forskningen.

Bakgrunn

Arent de Besche gjennomførte epokegjørende forskning 30 år tidligere, på 1920-tallet. Han hadde bl.a. vist – omtrent samtidig med Prausnitz og Küstner – at atopisk allergi kunne overføres til andres hud med pasientens serum. Etter at han avsluttet sin forskning, var allergologisk klinikk og systematisk allergiforskning lavt prioritert her i landet. Enestående

Artikkelforfatteren har kvittet seg med datalister og litteraturreferanser da han tømte kontoret for godt, men har mange minner fra et utfordrende og spennende forskningsfelt. FOTO: MARIANNE MONSEN



unntak var øre-nese-halsavdelingen ved Rikshospitalet med professor Peter Berdal og Olf Strømme samt Oddvar Andrup ved Rikshospitalets bakteriologiske institutt og hudavdeling (senere Diakonissykehuset). Å satse på forskning i dette området var ikke lurt om man ønsket å gjøre en akademisk karriere. Det var intet miljø for den slags og ingen fremtidsutsikter. Man måtte belage seg på venstrehåndsforskning, det vil si forskning etter endt arbeidstid og uten økonomisk støtte.

Den gangen mente man, etter en studie av E. Eilertsen i 1955, at 1,7% av norske barn led av astma, og det ble oppfattet som foruroligende høy forekomst. Det hører til historien at den ledende overlege i psykiatri ved Rikshospitalet hevdet og skrev at astma var en psykiatrisk lidelse.

De som kom til en av de få andre legerne med interesse for denne sykdommen, ble testet med 15–20 forskjellige allergenekstrakter. Øre-nese-halsleger og lungeleger brukte mest intrakutantesting. Barneleger brukte helst risptesting, og noen få prøvde seg med prikktesting. Av barn som ble kutantestet var det bare ca. 20% som viste positive reaksjoner på hudtestingen. Mange av de som reagerte positivt på hudtest med inhalasjonsallergener ble satt på «desensibilisering» som det ble kalt den gangen.

Når alle hudprøvene var negative, ble sykdommen oppfattet som «infeksjonell astma», og mange brukte da benevnelsen «bakterieallergi» (noen sa feilaktig «bakteriell allergi»). De fleste med diagnosen «bakterieallergi» ble satt på behandling med antikatarrvaksine (AKV) etter samme prinsipp som «desensibilisering» med økende doser og konsentrasjoner fra en lav startkonsentrasjon.



I arbeidet med å isolere rene fiskeallergener var det nødvendig å få fremskaffe blod og serum fra levende fisk. Tapping av blod fra torsk foregikk på bryggekannten i Oslo. ILLUSTRASJONSFOTO: FISKEBRYGGA I OSLO 1964. FOTO: HENRIK LAURVIK/NTB/SCANPIX

AKV var en blanding av ekstrakter av de fem vanligste bakterier dyrket fra nese-, hals-, og sputumprøver. Til tross for at den ikke hadde noen virus som grunnlag, ble AKV også brukt som såkalt «forkjølelsesvaksine».

Også internasjonalt var desensibilisering med AKV anerkjent som effektiv behandling ved infeksjonell astma både hos barn og voksne. Den norske legestand hadde stor tro på denne vaksinen. Statens institutt for folkehelse produserte og solgte årlig 70–80 liter, og i tillegg ble det importert omtrent like mye fra USA og Storbritannia. Professorene Dick Henriksen og Berdal ved Rikshospitalet tilrådet Aas å satse på forskning på denne behandlingsformen som tema for et doktorgradsarbeid. Aas som da egentlig hadde startet nyrefysiologisk forskning på Barneklubben, tok denne utfordringen.

Innledningsvis måtte relevant litteratur studeres. Den var omfattende, men stort sett med anekdotiske rapporter om gode resultater etter åpne kliniske studier. Velkontrollerte dobbeltblinde studier var mangelvare. Slike forsøk måtte gjennomføres som første fase i forsk-

ningen. Av ca. 400 barn over seks år henvist til poliklinisk undersøkelse for «infeksjonell astma» var det bare et trettital der grundig anamnese og testing falt negativt ut. Testingen omfattet hudprøver, men også bronkial provokasjonstesting (BPT) som ble innført som rutine både med allergenekstrakter, kontrollvæske og histaminklorid (senere acetylklorid) som henholdsvis negativ og positiv kontroll. (Noen av de positive reaksjonene på BPT var sannsynligvis uspesifikke, se senere).

Fra AKV til Akk-O-Ve!

Materialet for AKV-forsøket ble lite, men forsøket kunne gjennomføres randomisert, placebo- og blindkontrollert. Et overveldende flertall av pasientene rapporterte bedring, men da koden ble åpnet, viste det seg at placebo hadde virket vel så godt som den genuine vaksinen. (Tross den forhåndsinformasjon som var gitt etter prinsippet «informed consent», oppstod det i etterkant krevende situasjoner når pasienter som hadde fått placeboinjeksjoner, bad om å få den samme behandlingen videre fordi den hadde hjulpet så godt!).

Da resultatet av dette forsøket ble presentert her hjemme og internasjonalt, ble det mottatt med hoderisting og skjeve, medfølende smil. Et vanlig motargument var at det forelå mange rapporter om allergisk sjokk etter injeksjon av AKV selv i lave konsentrasjoner. Det måtte tas som bevis for at vaksinen var allergologisk aktiv!

Ja, det var et godt argument som krevde nærmere undersøkelser. Aas gjennomførte derfor en serie forsøk med dobbel immundiffusjon, immunologiske inhibisjonsforsøk og noen få Prausnitz-Küster-deBesche (PK-)tester på egen hud. Slik ble det fastslått at AKV virkelig var allergologisk aktivt, men at den aktiviteten skyldtes innhold av hesteserum. Allergikative komponenter fra hesteserum fulgte med fra dyrkningsmediet for bakterien *Hemophilus influenza*. AKV var ikke bare ineffektiv som behandling ved infeksjonsastma, men kunne være skadelig. Dette budskapet ble mottatt nærmest fiendtlig av de kolleger som brukte AKV flittigst, men ble etter hvert akseptert av de fleste. Det tok likevel bortimot 10 år før Folkehelseinstituttet og andre produsenter sluttet å selge denne vaksinen. ►

Allergenekstraktene

Med erfaringene fra arbeidet med AKV var det naturlig å spørre hvordan det stod til med de andre ekstraktene som ble brukt til allergidiagnostikk og -behandling. To spørsmål var særlig viktige:

1. Hvor aktive var de egentlig?
2. Hva inneholdt de egentlig?

Biologisk aktivitet og standardisering

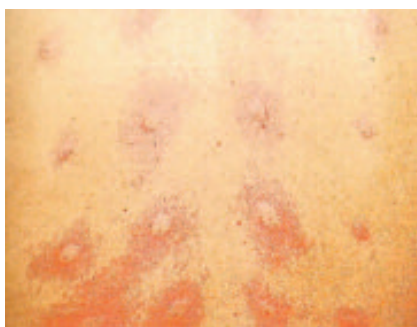
Ekstraktene ble levert som sterile rå-ekstrakter («crude extracts») av materia- lene. Styrken ble angitt som vekt av materialet i forhold til væskemengden og deklartert som 1.10 eller 1.100. Dette fortalte jo intet om den biologiske aktiviteten. Når de ble sammenliknet i hud- tester, kunne pollenekstrakter og dyrehårsekstrakter 1.10 000 gi utslag av samme størrelse som et husstøvekstrakt 1.100 hos pasienter med de aktuelle allergiene. I sammenliknende hudtester gav ekstrakter fra forskjellige produsenter og av samme materiale fra forskjellige produksjonsår til dels svært forskjellige reaksjoner. Mange kliniske rapporter og forskningsresultater fra forskjellige enheter var dermed umulige og menings- løst å sammenlikne.

Lars Belin ved Sahlgrenska Sjukhuset i Gøteborg og Aas startet derfor et samarbeid i håp om å komme frem til et bedre system.

Først gjaldt det å utvikle en felles standard for hudtesting. De valgte prikk- testing med grundig metodebeskrivelse og med histaminchloridoppløsninger som positiv internkontroll. Slik kunne de tale med samme språk om resultater ved prikktesting. På samme tid ble de oppnevnt av Nordisk forening for allergi- forskning til en Nordisk standardiserings- komité sammen med Alf Backman i Finland og Bent Weeke i Danmark. De foreslo standardisering av hud- testing med bestemte konsentrasjoner av histaminchlorid som positiv kontroll, der histaminutslaget ble angitt som +++ . Videre foreslo de at alle allergenekstrak- ter skulle deklarerer med allergenakti- vitet i forhold til dette, med betegnelsen «Histamine Equivalence in Prick testing (HEP)». Foreningen godtok dette som gjeldende nordiske standarder, og prinsippene ble etter noen tid også godkjent internasjonalt. Senere er til- svarende prinsipper videreutviklet med immunologiske teknikker med bruk av IgE-antistoffer.



FIGUR 1. Forfatteren som eget forsøksdyr. Sykepleier Valborg injiserer fortyninger av pasientserum og kontrollserum.



FIGUR 2. PK-reaksjoner på forskjellige eks- trakter og fraksjoner.

Fra PK-testing til IgE-teknologi

Dette var jo lenge før IgE ble påvist som det virksomme immunglobulin ved atopisk allergi. Vi hadde bare den tungvinte biologiske ekvivalenten i Prausnitz-Küstner-deBesche's test (PK-tes- ten) der den virksomme komponenten i serum ble kalt reagin. PK-testen ble en viktig metode for å objektivisere kvaliteter og kvalitetsforskjeller i ulike allergenekstrakter og fraksjoner. Tilsvarende overføringer av allergi- reaksjoner kan skje med menneske- serum til aper, og Paul Ehrlich Institute i Frankfurt stilte sin apestall til rådigh- het, men avstanden dit var for lang. Aas satset på PK-test, men da metoden ikke er uten risiko, besluttet han å fungere som sin egen forsøksprimat (fig 1 og 2).

Det medførte ikke bare strenge tiltak for å sikre blindkontrollerte eksperimen- ter, men også at noen forsøk ble ødelagt og måtte gjentas fordi forsøksprimaten uforvarende kom til å spise mat som førte til uønskede utslag utenom forsøkspro- tokollen. Slik kan man lære seg å forstå pasienter som gjør tabber i forhold til eliminasjonsdiettene sine.

Da RAST og annen IgE-teknologi ble

tilgjengelig, var det naturlig å erstatte PK-testen, innledningsvis i et nært sam- arbeid med SGO Johansson og medarbei- dere i Uppsala. Det var sant å si en stor lettelse.

Allergenekstraktens innhold

Hva inneholdt de kommersielle allerge- nekstraktene? Det skulle vise seg å være litt av hvert og ikke bare ønskede kompo- nenter.

Irritanter

Under utvikling og arbeid med bronkiale provokasjonstester i klinisk arbeid og forskningsaktiviteter ble det klart at mange allergenekstrakter førte til reak- sjoner som ikke samsvarte med anamnese og hudtesting, men med noe samsvar med reaktiviteten på histamin og acetyl- kolin. Det gjaldt i særdeleshet kommersielle fjærekstrakter og husstøvekstrakter. Konklusjonen var at de inneholdt «irritan- ter» som ga uspesifikke reaksjoner i BPT. Slike komponenter lot til å være virk- some også ved intrakutantesting. Det ga grunn til å mistenke at mye av den fjærsanering og desensibilisering som var iverksatt, var lite berettiget.

Hva med husstøvekstraktet?

Husstøvekstrakt

Ved siden av AKV og pollenekstrakter var kommersielle husstøvekstrakt mest brukt i «desensibilisering». Slike ekstrakt ble lagd av innsamlet husstøv, i noen tilfeller ble det brukt «autovaksine» med ekstrakt fremstilt av husstøv fra pasientens egen bolig. Aas gjennomførte en pilotunder- søkelse med norsk husstøvekstrakt fra Nyegaard og Co, også denne randomi- sert og dobbeltblindkontrollert med pla- cebo, der effekten ble undersøkt med bronkial provokasjonstest. Behandlingen med aktivt ekstrakt var noe (så vidt signi- fikant) bedre enn med placebo. Noen år senere ble det vist at det aktuelle eks- traktet inneholdt allergener bl.a. fra hus- støvmidd, hund og katt. Det ble etter hvert også påvist antigener fra kumelk, fisk, egg og peanøtter, samtidig som det var varierende innhold av irritanter. Fra andre forskere ble det rapportert funn av endotoksiner i tilsvarende ekstrakter.

Rensing av ekstrakter

Det var nå åpen bart at mange kommersi- elle allergenekstrakter var helt uaksept- able for bruk på mennesker samtidig

som det var mulig å gjøre dem bedre. Aas skrev dette til de største produsentene med anbefaling enten å tilrettelegge for produksjon av rensede og biologisk standardiserte preparater eller å legge ned produksjonen. I Norge var det Nyegaard og Co (Nyco[®]) som produserte allergenekstrakter. De meddelte at de ville avslutte denne virksomheten. Sosialdepartementet og Industridepartementet mente imidlertid at slik ekstraktproduksjon burde opprettholdes i landet. Nyco ble tildelt en industriell utviklingskontrakt med millionbeløp over en treårsperiode under forutsetning at den klinisk medisinske delen skulle ledes av Rikshospitalet ved Aas. Den tekniske forskningsdel ble ledet av Bjørn Skålhegg og Øyvind Grimmer i Nyco.

Samarbeidet førte til utvikling av høyrensede og biologisk standardiserte preparater som fikk navnet «Spectralgen». Grimmer utviklet også en genial liten lancett med tørrsubstans av Spectralgenpreparater («Phazet») som egnet seg godt i prikktesting.

Fagfolks ønsker og forventning var at rensede allergenpreparater ville være mer effektive i hyposensibilisering (som det etter hvert ble kalt), og Arve B Frostad og andre iverksatte storstilte, dobbeltblinde kontrollerte forsøk med Spectralgen i hyposensibilisering. Til stor skuffelse – og ettertanke – var behandlingen med slike preparater bare marginalt bedre enn med de gamle ekstraktene. Det lot til at det ikke i noen vesentlig grad var ekstraktene som det var noe galt med, men kanskje selve behandlingsprinsippet.

Nyco la etter hvert ned produksjonen av allergenekstrakter, men i mellomtiden hadde flere forskere vært trukket inn i arbeidet med allergenekstrakter og allergener. Andre produsenter har fortsatt å selge allergenekstrakter, men har langsomt forbedret preparatene sine i takt med utviklingen i forskning – med en god del etterslep hos noen.

Allergenrensing

Under en forelesningsrunde i USA fikk Aas vite at en forskergruppe i Baltimore med Philip Norman hadde klart å rense et hovedallergen fra ragweedpollen som de kalte Antigen E. Dette antigenet ble brukt i møysommelige absorpsjonsforsøk av Ishizaka og medarbeidere samme sted i forsøk på å isolere reagin i tilstrekkelige mengder for å identifisere dette antistoffet. Det var tvil om Antigen E var rent

nok og stabilt nok for en slik målsetning. Et problem ved allergenrensing var nettopp det at proteinet kan endre seg og bli ustabilt ved rensing. Utfordringen og mulighetene for å absorbere ut reagin med et rent allergen var åpenbar. Rene allergener var også en nødvendighet for å komme videre i mange andre oppgaver i allergologisk basalforskning. Uten det stod mye forskning i stampe.

Aas kastet seg over oppgaven med studier i proteinkjemi og immunologi. Det var nødvendig å satse på et hovedallergen som kunne tåle påkjenningsene ved rensing, fortrinnsvis ett som sannsynligvis hadde lineære epitoper (antigene determinanter). Hvordan finne det?

Nå viste det seg at venstrehåndsforskning kan ha noen fordeler ved det at forskningshypoteser kan filtreres gjennom kliniske observasjoner og logisk resonnement. Valget ble gjort etter en slik klinisk observasjon.

Et spedbarn ble innlagt med alvorlige allergiske systemreaksjoner og ekstrem avmagring. Barnet stod på brystmelk som eneste ernæring. Etter en del diagnostiske problemer fant man at barnet reagerte allergisk når moren hadde spist fisk. Her måtte det dreie seg om et veldig stabilt og resistent allergenmolekyl. Det hadde tålt koking og hadde beholdt aktivitet gjennom morens fordøyelseskanal, passasje til brystmelken, og ny runde tross magesafter og enzymer i barnets fordøyelsessystem. I fisk var det molekylet vi hadde bruk for, og fisk – særlig torsk – kunne skaffes i store mengder. Kliniske studier viste at flertallet av barn med fiskeallergi reagerte på torsk, mens noen reagerte også på andre fiskeslag. Denne allergologiske differensieringen mellom fiskesorter kunne bidra til å nå målet: å isolere og karakterisere et hovedallergen.

Hvor i fisken var det mest av hovedallergen? I kjøttet eller i blodet? Forskjellige kjøttproteiner var det greit å skaffe. For å få blod og serum måtte man til Akvariet i Bergen for å lære å tappe blod fra hjertestrengen på levende fisk. Deretter var det å tappe blod fra Møretorsk på fiskebryggen i Oslo og fra laks sammen med en laksefisker i ytre Oslofjord. Diverse ekstrakter og fraksjoner av ekstrakter og serum ble injisert på kaniner og hvite mus for å fremskaffe antisera. Gjennom møysommelige immunologiske kryssforsøk, utfelling osv

i laboratoriet og blindkontrollerte PK-tester kunne det isoleres og utkrystalliseres et protein med egenskaper som et usedvanlig potent hovedallergen.

Underveis i dette ble Pediatrisk forskningsinstitutt (PFI) etablert ved Barne-klinikken, men til å begynne med var det dårlig med utstyr der. Det var fortsatt nødvendig å låne utstyr ved andre avdelinger når det ble ledig en ettermiddag eller aften. Det var besværlige vilkår for grunnforskning. For ikke å snakke om all oppvasken!

Etter hvert ble det mer drift ved PFI, og det ble til og med både brukbart utstyr og god assistenthjelp. Nå ble det også bevilget forskningsmidler til det fortsatte arbeidet med torskallergenet, og Said Elsayed kom inn fra Egypt. Med ham kunne arbeidet skride frem mer konsentrert. Underveis ble han godkjent som biokjemiker ved Universitetet i Oslo og tok sin doktorgrad på torskallergenet som nå var isolert og karakterisert med sekvensering av sine 113 aminosyrer. Med utgangspunkt i sekvensen kunne vi også kalkulere oss frem til korte sekvenser som måtte representere viktige lineære epitoper.

I mellomtiden var reagin imidlertid identifisert og kalt immunglobulin E (IgE) av Ishizaka. Kort tid etter fulgte en eventyrlig utvikling av IgE-teknologi initiert og drevet frem av SGO Johansson og medarbeidere i Uppsala.

Snipp. Snapp. Snute. Så var dette eventyret ute!

Med det rene og ekstremt potente allergenet satt den delen av PFI som ble kalt Allergologisk Forskningslab med et immunologisk verktøy som ville være nyttig i mange andre sammenhenger i allergiforskningen. Det var mange utfordringer og oppgaver, men allergenforskningen på molekylnivå var nå blitt såpass avansert etter 10 års virksomhet, at videreføring krevde ekstra ressurser. Det kunne ikke skaffes, og virksomheten måtte avvikles. Elsayed fortsatte sitt arbeid ved Haukeland Universitetssykehus i Bergen. Andre forskere innen dette området er etter hvert spredt for alle vinder. Noen har etterlatt seg varige spor på de veiene som skritt for skritt har ført frem til dagens detaljerte kunnskap om allergener, aktive epitoper og allergimekanismer. De veiene vil forhåpentligvis en gang i fremtiden føre frem til bedre forebygging og behandling av allergi. ●