



# Protein AF

## En kroppsegen klinisk innovation

En 20-årig svensk grundforskning ligger bakom upptäckten av Antisekretorisk Faktor, ett kroppseget protein med betydelse för olika sekretoriska och inflammatoriska tillstånd. Forskningen har redan lett fram till medicinska livsmedel med klinisk användning.



Den här skriften beskriver den mer än 20-åriga svenska grundforskning som ligger bakom upptäckten av det kroppsegna protein AF (Antisekretorisk Faktor) vars uppgift är att reglera vätske- och jontransporten över cellmembran i kroppens olika organ.

Protein AF har en kraftig effekt när det gäller att motverka olika typer av sekretion. Den kliniska betydelsen har studerats vid olika sjukdomar där en störd vätsketransport har stor betydelse, t ex vid olika mag-tarmsjukdomar, diarré tillstånd och Mb Ménière. Protein AF har även antiinflammatoriska egenskaper vilket visats i studier på inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD), vid reumatiska sjukdomar och mastit (bröstkörtelinflammation). Nyligen publicerade amerikanska studier beskriver att protein AF sannolikt har en funktion vid reglering av vårt immunsystem.

De följande sidorna beskriver hur ett svenskt antibiotikaförbud inom djurhållningen skulle leda till de AF-produkter som nu framförs. Följ med på en resa från grundforskning till färdig produkt. Läs mer om forskningsprojekten och kliniska studier som belyser protein AF.

# Banbrytande grundforskning

## Antibiotikaförbud i djurfoder och forskning om diarrésjukdomar

Som ett av de första länder i världen beslöt Sverige att antibiotikatillsatser i djurfoder skulle förbjudas den 1 januari 1986. Denna typ av foder gavs bl a till smågrisar för att förebygga diarré vid avvänjning från suggan vid övergång till torrfoder. Precis som inom humanmedicinen sågs tilltagande problem med resistensutveckling varför ett antibiotikaförbud ansågs väsentligt. Antibiotikaförbudet medförde bl a att allt fler smågrisar fick diarré och ökande antal dödsfall uppkom p g a massiva infektioner och stress. Sammanlagt innebar det ett stort ekonomiskt avbräck för uppfödarna.

För att komma tillrätta med problemen och för att om möjligt hitta en ny typ av foder initierades ett tvärvetenskapligt projekt med företrädare för veterinärmedicin, mikrobiologi, infektionssjukdomar och immunologi.

Forskarna Stefan Lange och Ivar Lönnroth vid avdelningen för klinisk bakteriologi vid Sahlgrenska universitetssjukhuset i Göteborg hade sedan början av 1980-talet studerat möss och kolerasmitta. Man sökte efter den substans som gör att mössen och råttorna utvecklar motståndskraft mot diarré, orsakad av kolerasmittämne. Det är känt att den människa som överlever kolera inte får sjukdomen igen på ca fyra år. Lange och Lönnroth upptäckte ett försvarssystem som aktiveras snabbare än det vanliga immunförsvaret, sannolikt förmedlat av en kroppsegen substans som kan stimuleras på olika sätt. Denna motståndskraft kunde bl a utlösas genom stimulans med enterotoxiner eller genom tillförande av socker och aminosyror i vissa proportioner.

Ytterligare forskning kom så småningom att leda till upptäckten av en substans i hypofysen på råttor som gav resistens mot kolerasmitta. Detta protein gavs namnet Antisekretorisk Faktor, förkortat AF (Lange och Lönnroth, 1984; Lange et al, 1987). Det visade sig att protein AF reglerar sekretionen, dvs vatten- och jonbalansen, i kroppens olika organ. Bland annat normaliserar protein AF vätskeflödet i tarmen, dvs det som är förödande vid alla diarrésjukdomar.



Antibiotikaförbudet i djurfoder ledde till ökad diarré och dödlighet bland smågrisar. Detta kunde minskas signifikant genom användandet av en ny typ av specialprocessade cerealler som visade sig stimulera ett kroppseget protein, protein AF.

## Nytt AF-grisfoder gav omedelbara effekter

För att hitta ett nytt foder som skulle kunna appliceras på smågrisarnas avvänjningsdiarré gjordes nu försök baserade på Lange och Lönnroths experiment med koleratoxin på råttor och deras upptäckt av protein AF. Till en början åstadkoms stimulansen av grisarnas eget AF genom att använda foder med tillsatser av socker och aminosyror i vissa bestämda mängder. Analyser av halten av AF i grisarnas urin gjordes också och det visade sig att sambandet fanns; Grisar utan diarré hade en hög halt av AF, medan grisar med diarréproblem hade en låg halt av protein AF. Användandet av detta foder gav omedelbara effekter och ledde till en markant minskning av diarréproblem och en kraftig reduktion av dödstalen bland smågrisar.

Arbetet med att ta fram ett foder som i sig självt skulle innehålla de socker och aminosyror som tidigare tillsatts och att framtaga en tillverkningsprocess intensifierades och under 1991 introducerades foderprodukter för smågrisar och suggor. Dessa produkter som alltså ökar grisarnas egen motståndskraft mot

magsjukdomar är nu helt dominerande på den svenska marknaden.

## Specialprocessat spannmål genom hydrotermisk behandling

Den patenterade tillverkningsprocess som används är en hydrotermisk behandling, en slags mältningsprocess, där spannmålen (havre och vete) läggs i blöt i vatten för att därefter värmas upp. Inga tillsatssämnen används. Vid optimal temperatur stoppas processen och kornen torkas och krossas. Behandlingen leder till att stärkelsen i spannmålen bryts ned och att aminosyror, enkla sockerarter och enzymer frigörs. Detta enzymatiskt aktiverade specialprocessade spannmål (SPC) stimulerar kroppens egna produktion av protein AF.

## AF-visionen: Läkemedel och Medicinska livsmedel

Med anledning av de mycket goda resultaten med AF-foder på djursidan ”breddades tänkandet” till att inkludera användande på humansidan och tre visioner för den närmaste forskningen och utvecklingen utkristalliserades. Målen sattes till att:

- 1) Utveckla ett AF-läkemedel för människa genom framtagandet av en syntetisk peptid, d v s en analog till protein AF.
- 2) Framtaga en analysmetod för att mäta halten av AF i blod.
- 3) Framställa medicinska livsmedel baserade på erfarenheterna med olika djurfoder. Detta arbete prioriterades med tanke på den långa tid det tar att utveckla ett färdigt läkemedel.

## Första försöken med AF-produkter på människa

Steget från djur till människa när det gäller AF var inte särskilt långt då det handlar om ett basalt fysiologiskt förlopp som är rätt lika för alla däggdjur. AF-foderkonceptet hade också testats på kalv, häst, hund och katt och även fungerat på dem. Forskarna började därför att prova smågrisfodret på sig själva genom att koka gröt på fodret och baka bröd på detsamma. Gastroenterologerna på Sahlgrenska sjukhuset blev också intresserade och bl a provades AF-spannmålet på patienter med ulcerös colit. Alla försökspersoner mådde bra och reagerade med en signifikant ökning av halten AF i blod. Denna höjning av AF kvarstod upp till fyra veckor efter intag av små-

grismaten. Det visade sig alltså att den princip som fungerat på djur även fungerade på människor.

## Europas första medicinska livsmedel (Medical Food)

Efter de positiva försöken med egenhändigt framställda AF-produkter för människa blev nästa steg att utveckla medicinska livsmedel baserade på protein AF. Inom EU hade diskussioner förts om att kunna godkänna produkter med specifik inverkan på vissa sjukdomar, alltså livsmedel för särskilda medicinska ändamål (vilket är att särskilja från functional food), och EG-direktivet 1999/21/EG blev lag den 1 maj 2000. Som första produktserie i Europa godkändes MagiForm® som Medical Food, vilket i Sverige regleras enligt Livsmedelsverkets SLVFS 2000:15 om Livsmedel för särskilda nä-

## De framgångsrika resultaten med AF-produkterna hos djur gav visioner om att kunna utveckla läkemedel och medicinska livsmedel för människa.

ringsändamål. Müsli, kex och skorpar med AF-stimulerande egenskaper togs fram och har därefter utökats med mera potenta AF-inducerande medicinska livsmedel i form av enbart SPC samt Äggulepulver B221® som är en form av exogen tillförsel av höga halter av protein AF.

Utvecklingen av äggulepulver B221® skedde som ett resultat av att forskarna fann att vissa patienter inte svarade med induktion av AF efter SPC-intag. Man började då undersöka om det skulle gå att tillföra protein AF. De fann då att genom att utfodra höns med motsvarande AF-inducerande foder så anrikades AF i höga koncentrationer i äggulan. Av praktiska skäl framställdes då ett äggulepulver. Sådant äggulepulver givet till patienter är alltså en form av exogen tillförsel av AF, vilket bl a används i akutskedan eller vid initial behandling av patienter med svår sjukdom eller förmodat låga AF-nivåer. SPC-produkterna ges däremot som en form av underhållsbehandling, vilken alltså syftar till att stimulera patientens endogena produktion av protein AF.

# Kemi och biologi

---

## Kemisk och biologisk karaktärisering

Under de första åren på 1990-talet arbetade framför allt Ivar Lönnroth med att karaktärisera protein AF kemiskt och biologiskt och i mitten av 1990-talet var protein AF kartlagt. Proteinet är medelstort, 41 kiloDalton, och molekylen består av ca 380 aminosyror. Den aktiva, antisekretoriska delen är en peptid med en 8–38 aminosyror lång sekvens i den N-terminala delen.

Det renade proteinet användes för att framställa antikroppar i kanin, som i sin tur användes för att klona fram genen som bildar proteinet. Proteinet kan numera framställas ur bakterier och fås i en mycket ren form. Delar av proteinet kan också syntetiseras med kemisk teknik.

Protein AF är verksamt som både protein och peptid, vilket är ovanligt, och det verkar framför allt på nerver i tarmen och påverkar de nervsignaler som reglerar vätskeflödet. Det har alltså dels en farmakologisk effekt i sig självt, dels sätter den igång bildningen av kroppsegna skyddande ämnen mot sekretion och inflammation. Det är det mest potenta antidiarré-ämne som finns beskrivet och det är visat att protein AF inhiberar sekretion orsakad av, utöver koleratoxin, ett flertal toxiner från bl a *E.coli*, *campylobacter*, *Clostridium difficile* och okadasyra från blåmusslor.

AF-nivån i plasma ökar snabbt, inom loppet av några timmar, efter det att tarmen utsätts för diarréstimuli. AF är förmodligen till stor del inaktivt och behövs kanske inte hos en frisk människa. Däremot kan AF alltså aktiveras genom inverkan av bakterietoxiner. En ökad AF-syntes sker även efter det att tarmen påverkats av AF-inducerande specialprocessade cerealier (SPC).

Det föreligger sannolikt också ett biologiskt minne för syntes av AF. På en frisk människa kan man förvänta sig att erhålla signifikanta AF-värden om man intar AF-inducerande spannmål i en dos av 1 g/kg kroppsvikt och dygn fördelat på 2–3 tillfällen. Det tar ca 10–15 dagar att komma upp i värdet 1 AF-enhet/ml plasma och detta värde kvarstår beroende på hur länge man äter de specialprocessade cerealerna. Om man gör ett uppehåll med dessa spannmål under ca tre månader sker en nedgång till låga AF-nivåer. Börjar man nu åter att äta de AF-stimulerande spannmålen så erhålls en snabb uppgång och på 2–3 dagar uppnås signifikanta AF-nivåer.

Denna regulatoriska peptid reglerar vätske- och jontransport över cellmembran i kroppens olika organ sannolikt genom att reglera genomsläppligheten i de kanaler som reglerar jon- och vattentransporter. AF har därigenom en fundamental inverkan på sjukdomar där sekretion har betydelse. Det har därmed inverkan vid flödet av vätska genom tarmväggen vid t ex Crohns sjukdom och vid reglering av vätsketrycket i innerörat vid Ménières sjukdom eller vid andra tillstånd där det föreligger vätskeobalanser i kroppens vävnader.

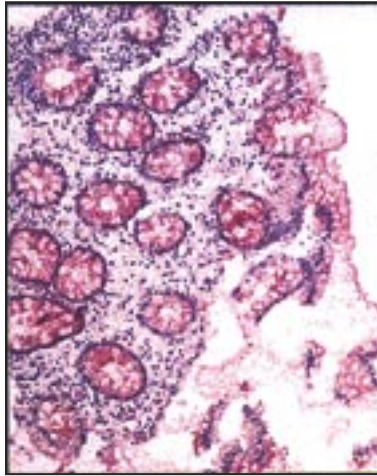
Utöver de högpotenta antisekretoriska effekterna har protein AF även viktiga antiinflammatoriska egenskaper. Detta har visat sig ha klinisk betydelse vid reumatoid artrit och inflammatoriska tarm-sjukdomar (IBD) såsom ulcerös colit och Mb Crohn samt vid andra sjukdomar där inflammationen spelar stor roll som t ex mastit, vilket är ett vanligt problem hos ammande mödrar.

I augusti 2001 sammanfattades den då dittills gjorda forskningen och studierna i den statustyngda amerikanska tidskriften *International Review of Cytology* (Lange och Lönnroth, 2001).

En nyligen publicerad artikel av ett forskarlag i USA (Davidson and Hickey, 2004) pekar även på den sannolika betydelsen av protein AF vid immunologiska reaktioner i bl a centrala nervsystemet och författarna menar att en ökad förståelse av betydelsen av protein AF kan resultera i ny klinisk tillämpning.

## Protein AF finns lagrat i de flesta av kroppens vävnader

Med immunohistokemisk teknik har forskarna påvisat förekomst av protein AF i de flesta av kroppens vävnader. Studier av framför allt Eva Jennische vid Avdelningen för Anatomi och Cellbiologi vid Göteborgs Universitet har visat att protein AF finns lagrat i tre celltyper; epitelceller, lymfatiska celler, framför allt lymfocyter, och nervceller. AF uttrycks i slemhinneepitel i mag-tarmkanalen, respirationsorganen, urogenitalorganen liksom i körtelepitelceller, framför allt endokrina celler, i t ex hypofysen. Även andra vita blodkroppar verkar kunna uttrycka AF beroende på omständigheterna, t ex om det förekommer inflammation eller inte. Protein AF har också påvisats i nervvävnad, i nervceller och i synaptiska nervterminaler, både i det perifera och i det centrala nervsystemet.



Immunreaktivitet och histologisk förändring vid AF-behandling. Bilderna ovan visar vävnadsprover från en patient med svår Crohns sjukdom före (t.v.) och efter (t.h.) behandling med specialprocessade cerealier (SPC).

Till följd av de positiva kliniska effekterna vid Ménières sjukdom har också immunohistokemiska analyser visat att AF kan lokaliseras till purkinjercellerna i cerebellum, vilka anses vara av betydelse för inhibitoriska vestibulära funktioner. AF har också påvisats i de perifera receptororganen cochlea och vestibularis.

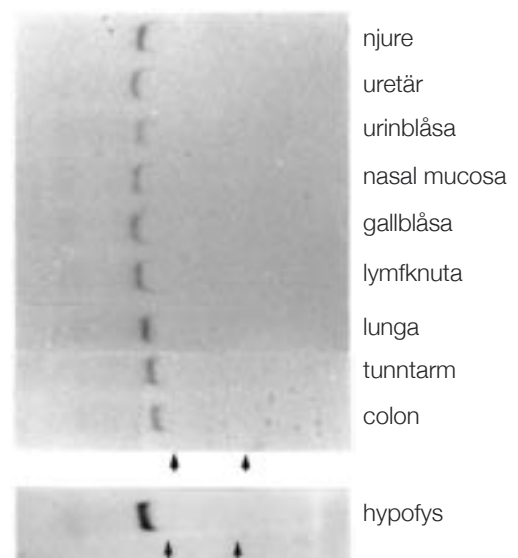
Arbetet pågår med att identifiera en säker klassisk receptor för AF. Hittills har forskarna funnit två intressanta bindarproteiner, flottilin-1 och vestibule-1, som kan vara möjliga samarbetsaktörer för AF. De tror även att  $GABA_A$ -receptorn kan interagera i viss mån med AF.

**Protein AF reglerar vätske- och jontransport över cellmembran i kroppens olika organ. Det är det mest potenta antidiarréämne som beskrivits och har utöver de anti-sekretoriska egenskaperna även uttalade antiinflammatoriska effekter. Nyligen har också beskrivits potentiellt viktiga immunologiska egenskaper hos protein AF.**

Genom en modell som utvecklades av Stefan Lange (Lange, 1982) för att mäta hypersekretion i tarmen hos råttor genom att binda av ett ca 10–15 cm långt segment från tunntarmen, kan koncentrationen av AF i olika vävnader bestämmas. AF-aktiviteten hos människor mäts genom att renat AF från plasma injiceras intravenöst i råttor som stimulerats med koleratoxin. En AF-halt som inhiberar 50% av

sekretionen i segmentet tilldelas ett AF-värde av 1,0. Studierna har visat att ett AF-värde som överstiger 0,5 är korrelerat till en påverkan på diarrén. För att kunna påvisa mRNA för AF i olika vävnader har också Northern blot-teknik använts.

För att inte behöva gå omvägen via råttor för koncentrationsbestämningar av protein AF, pågår för närvarande en intensiv forskning för att hitta en blodanalysmetod på människor. En sådan analysmetod skulle då på ett enkelt sätt kunna visa vilken halt av AF en människa har. Det är sannolikt så att en låg halt av AF kan uppmätas vid olika sjukdomar, medan en hög halt återfinns hos friska. En patient med en låg koncentration av protein AF skulle då kunna påbörja behandling med lämplig AF-produkt och detta utan att behöva ändra sin eventuella övriga medicinering.



Protein AF i vävnader hos gris. AF kan påvisas i de flesta vävnader hos såväl djur som människa.

# Antisekretoriska effekter

## Korta tarmar/Tarmresektion

Efter de mycket positiva resultaten på djur och de goda initiala resultaten på människor ville forskarlaget i första hand testa om specialprocessade cereali-er (SPC) verkligen skulle kunna reducera diarré-  
besvären hos en patientgrupp med mycket höga tarmflöden, orsakade av korta tarmar. Under ledning av professor Ingvar Bosaeus vid Sektionen för Klinisk Nutrition vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset, och med stor erfarenhet av just dessa patienter, lades en öppen pilotstudie upp (Lange, Bosaeus et al, 2003).

I studien ingick åtta patienter med korta tarmar p g a tarmresektion till följd av Crohns sjukdom. Deras tunntarmslängd varierade mellan 80 cm till 400 cm. Samtliga patienter led av kronisk diarré, men ingen av dem hade en pågående tarminflammation. Kontrollgruppen bestod av sex tarmfriska försökspersoner.

Patienterna och kontrollgruppen behandlades med 54 g SPC dagligen uppdelat på minst tre tillfällen tillsammans med måltiderna under en 14-dagars period. Ingen studiedeltagare skulle ändra sin ordinarie diet eller eventuella medicinering.

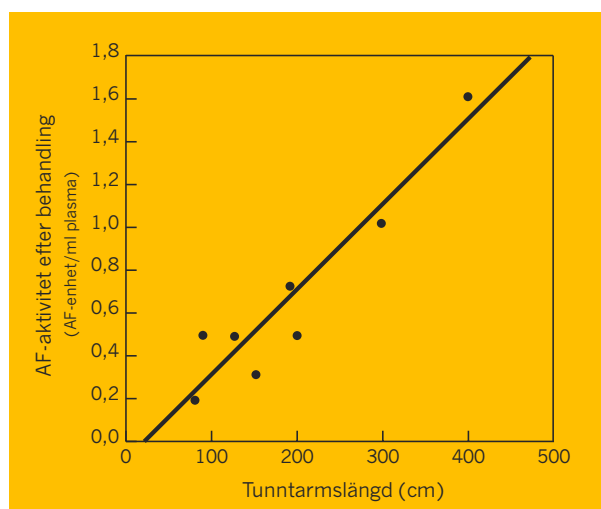
AF-nivåer i plasma mättes före, under och efter behandlingen. Hos de friska patienterna ökade AF-nivåerna i plasma från i medeltal  $0,28 \pm 0,37$  enheter/ml plasma före behandlingsstart till  $1,28 \pm 0,23$  AF-enheter efter tvåveckorsperioden ( $p < 0,05$ ). AF-nivåerna låg kvar på en förhöjd nivå

( $1,28 \pm 0,39$ ) under minst fyra veckor efter utsättning av de specialprocessade cerealierna.

Hos behandlingsgruppen var de initiala värdena låga ( $0,04 \pm 0,07$  AF-enheter) och efter behandlingsperioden på två veckor steg medelvärdet till  $0,66 \pm 0,45$  enheter. De två försökspersonerna med längst tunntarm kvar, 300 cm och 400 cm, erhö-ll AF-nivåer som var i paritet med de friska patienterna, d v s en AF-nivå överstigande 1,0 AF-enhet/ml plasma. Dessa patienter minskade också sin avföringsfrekvens under studieperioden. Regressionsanalys från de åtta patienterna visade att det var ett signifikant förhållande mellan kvarvarande tunntarmslängd och AF-nivå under behandlingsperioden ( $r=0,94$ ,  $p < 0,01$ ) (figur 1). Studien visade att tunntarmslängden bör överstiga en meter för möjlighet att inducera AF och även för att kunna behålla AF-nivåerna på en hög nivå efter upphörande av intag av den AF-inducerande dieten.

## Sekretorisk diarré till följd av carcinoid-tumörer

Diarrépatogenesen hos patienter med korta tarmar är multifaktoriell och det är troligen så att AF endast påverkar den sekretoriska komponenten av diarrén. För att undersöka denna hypotes gjordes en studie på patienter med endokrina tumörer (Laurenus et al, 2003). Diarrébesvären hos dessa patienter kan vara mycket svårbehandlade, terapieresistenta och persisterande även hos optimalt medicinerade patienter.



Figur 1. Det råder ett signifikant förhållande mellan kvarvarande tunntarmslängd och AF-nivå hos patienter med korta tarmar.

Syftet med studien var att undersöka om specialprocessade cerealier (SPC) kunde stimulera till AF-bildning och om denna AF-bildning kunde påverka tarmtömningsfrekvensen. Forskarna ville också undersöka om behandling med Äggulepulver B221® kunde minska tarmtömningsfrekvensen. Behandling med Äggulepulver B221® inkluderades eftersom ett antal patienter med diarré till följd av tarmresektion hade svarat positivt. Behandlingen med AF-produkterna fungerade som en tilläggsbehandling och patienterna uppmanades att följa sin ordinarie medicinerings.

Åtta svårt sjuka patienter, varav sex patienter med tunntarmscarcinoidsyndrom och två patienter med metastaserande medullär thyroideacancer, inkluderades i studien.

Efter en öppen behandlingsperiod på fyra veckor med Äggulepulver B221® randomiserades patienterna enligt cross-over modell till vardera sex veckors behandling med SPC respektive kontrollcerealier utan AF-inducerande egenskaper i dosen 1 g per kilo kroppsvikt fördelat på fyra doser dagligen.

Behandling med Äggulepulver B221® resulterade i en signifikant minskning av tarmtömningsfrekvensen ( $p < 0,01$ ) (tabell 1). Många patienter noterade också en fastare avföring. Det blev en signifikant skillnad ( $p < 0,05$ ) i tarmtömningsfrekvens vid gruppjämförelser mellan SPC och kontrollcerealier (tabell 1).

Patienterna hade mycket låga eller odetekterbara AF-nivåer i plasma före studien, men under behandlingsperioden med Äggulepulver B221® skedde en liten ökning av AF i plasma. En signifikant ökning av AF-koncentrationen skedde också som resultat av behandling med SPC. Hos fyra av fem patienter där AF-nivåer mättes under behandling med SPC uppmättes AF-nivåer i plasma som översteg 0,5 enheter, vilket i tidigare studier korrelerat till positiva behandlingseffekter av diarrébesvär.

Trots att dessa svårt sjuka patienter var optimalt medicinerade sågs en positiv tilläggseffekt av AF-terapi hos flera patienter. Behandlingen med Äggulepulver B221® tolererades av samtliga patienter. De två patienterna med metastaserande medullär

thyroideacancer och intakta tunntarmar erhöll de högsta AF-nivåerna (1,0 AF-enheter) efter behandling med SPC.

Behandlingen med Äggulepulver B221® indikerar att protein AF kan ha en lokal effekt i tarmen genom att interagera med receptorer/bindarproteiner i specifika celler i mucosan. Det skulle kunna förklara varför de positiva effekterna på diarrén efter behandling med Äggulepulver B221® kunde ses vid systemiska nivåer klart understigande de 0,5 AF-enheter som erfordras för signifikanta effekter när kroppen stimuleras till endogen produktion av AF som följd av behandling med SPC. Behandling med Äggulepulver B221® kan därför vara den lämpligaste AF-terapi hos patienter med svårigheter att äta stora mängder specialprocessade cerealier.

## Ménières sjukdom

Eftersom AF-produkterna visat sig ge så goda resultat vid sekretoriska tillstånd i mag-tarmkanalen funderade forskarna på om behandlingsprincipen skulle kunna fungera vid andra sjukdomar där vätskeobalanser förekommer eller kan misstänkas.

Ett exempel på en sådan sjukdom är Mb Ménière som kan bero på ett förhöjt tryck i innerörat, vilket kan ge patienten svåra yrsel- och kräkningsanfall. Detta förhöjda tryck kan bero på att vätskebildande celler i innerörat, producerar för mycket endolymfa eller att avrinningen från innerörat är för dålig. Ökat tryck på balansorganet orsakar rotations yrsel. Om trycket ligger på hörselnäcken kan följden bli hörselnedsättning och tinnitus.

Efter ett antal pilotförsök på patienter med goda resultat genomfördes en studie på Institutionerna för ÖNH och Audiologi vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset under ledning av docent Per Hanner (Hanner et al, 2004). Syftet med studien var att undersöka om protein AF kan induceras vid patologiskt vätsketryck i innerörat samt att undersöka om en stimulerad AF-produktion kan påverka Ménière-patienternas kliniska symptom.

24 patienter med svår Mb Ménière, som hade haft sin sjukdom mellan 10 månader upptill 30 år,

**Tabell 1. Antal tarmtömnings under behandlingsperioderna jämfört som parat t-test**

| Testperiod         | Medelvärde±SD | n | p     |
|--------------------|---------------|---|-------|
| Baseline           | 5,6±2,6       | 7 | <0,01 |
| Äggulepulver B221® | 4,2±2,4       | 7 |       |
| Kontrollcerealier  | 4,0±1,9       | 5 | <0,05 |
| SPC                | 2,6±1,3       | 5 |       |



deltog i studien. Som tillägg till sin ordinarie medicinerings fick de äta specialprocessade cerealier (SPC) i dosen 1 g/kg kroppsvikt och dygn under två till fyra veckor. Patienterna förde dagbok över sina subjektiva och auditiva symptom, yrselns frekvens, karaktär samt duration. Ton- och talaudiometri samt neurologisk status utfördes liksom bestämning av AF-aktivitet i plasma före och efter dietperioden.

Koncentration av Antisekretorisk Faktor i plasma varierade hos patienterna mellan 0-0,6 enheter före

## Mer än hälften av patienterna med svår Mb Ménière blev bättre eller helt symptomfria genom en enkel, billig och biverkningsfri metod.

behandling till 0-1,7 AF-enheter efter behandling (tabell 2). En ökad AF-aktivitet i plasma efter behandling överstigande 0,5 AF-enheter, vilket enligt tidigare studier korrelerat till förbättring av diarrébesvär, sågs hos 83% av patienterna. 17% av patienterna hade ingen eller endast en låg ökning av AF-nivåerna och hos ingen av dessa kunde en förbättring av de kliniska symptomen noteras. Hos 29% av patienterna noterades en signifikant ökning av AF utan att de svarade kliniskt.

Normaliserad hörsel och samtidig total yrselfrihet kunde ses hos 12,5% av patienterna, medan yrselfunktionen förbättrades hos 54% av patienterna. Förbättringen varierade från total utläkning till kvarstående, lättare, diffusa obehag av balansrubbing, utan tidigare rotatoriska yrselattacker.

Trots att mer än hälften av patienterna med svår Mb Ménière blev bättre eller helt symptomfria genom en enkel, billig och biverkningsfri metod vill forskarna ytterligare studera varför vissa av patienterna inte tycks få någon effekt av de AF-inducerande cerealierna.

De immunohistokemiska undersökningarna visar att AF finns i såväl det centrala nervsystemet som i

det perifera receptororganet, vilket kan innebära möjligheter att påverka såväl centrala som perifera regleringsfunktioner.

## Behandling med Äggulepulver B221® vid Mb Ménière

Som studien ovan visade finns det patienter som inte svarar med en ökad AF-produktion efter intag av AF-inducerande cerealier (SPC). I analogi med de positiva behandlingsresultaten med vid sekretorisk diarré har därför Äggulepulver B221® också testats vid Ménières sjukdom (Hanner et al, 2003).

En 67-årig kvinna som sedan mer än 30 år lidit av svår Mb Ménière med frekventa attacker från 8 timmar upp till tre dygn av illamående, yrsel, diarré och kräkningar fick äta SPC under två månaders tid. Då ingen effekt kunde ses på vare sig frekvens eller duration av symptomen fick hon prova Äggulepulver B221® i en dos av 2 g fem gånger dagligen, för att undersöka om denna form av exogen tillförsel av höga halter av protein AF skulle kunna ha någon positiv behandlingseffekt.

På dag 18 av behandlingen blev patienten helt besvärsfri och hennes Ménièrestatus minskade från 6 till 1 (American Academy of Otolaryngology). Efter att ha varit symptomfri under sex månader reducerade patienten dosen av Äggulepulver B221®, vilket ledde till att hon fick nya attacker med inslag av svår rotationsyrsel. En återgång till den ursprungliga dosen ledde omedelbart till en klinisk förbättring, och patienten blev ånyo helt besvärsfri från yrselattacker utan behov av annan medicinering. Dock kunde ingen förbättring noteras av hennes högersidiga hörselnedsättning.

Resultatet visar att patienter som inte svarar på behandling med AF-inducerande spannmål kan bli hjälpta av behandling med Äggulepulver B221®. För att hjälpa kroppen att sätta igång en egen produktion av protein AF är det säkerligen värdefullt att introducera AF-inducerande cerealier i samband med eller som uppföljning av behandling med Äggulepulver B221®.

**Tabell 2. AF-koncentration i plasma i medeltal jämfört som parat t-test hos patienter med negativ respektive positiv behandlingseffekt.**

| Testperiod                | Medelvärde±SD | n  | p     |
|---------------------------|---------------|----|-------|
| Före behandling, neg eff  | 0,19±0,17     | 10 | ns    |
| Före behandling, pos eff  | 0,25±0,25     | 13 |       |
| Efter behandling, neg eff | 0,67±0,53     | 11 | <0,01 |
| Efter behandling, pos eff | 1,28±0,30     | 13 |       |

# Antiinflammatoriska effekter

## Inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD) som Mb Crohn och ulcerös colit

I en studie på patienter med ulcerös colit och Crohns sjukdom (Björck et al, 2000) undersöktes om AF-inducerande spannmål kunde stimulera den egna AF-bildningen, samt om en ökning av AF-halten var korrelerad till en förbättrad tarmfunktion.

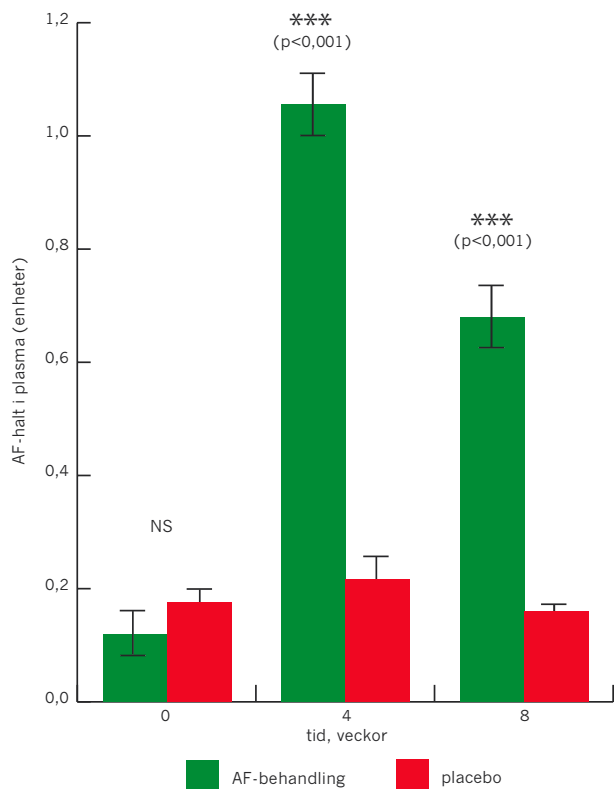
26 patienter randomiserades till behandling med AF-inducerande spannmål i form av müsli, bröd och/eller pasta under 30 dagar som tillägg till sin ordinarie kost och medicinering. Kontrollgruppen bestod av 24 patienter som fick placebodiet av samma slag, men utan AF-inducerande egenskaper. Patienterna förde dagbok över sin tarmfunktion, och deras AF-halter i plasma mättes före och efter behandlingsperioden. Rektalbiopsier gjordes också.

Resultaten visade att de patienter som fått specialprocessade cerealier (SPC) som tillägg till kosten fick

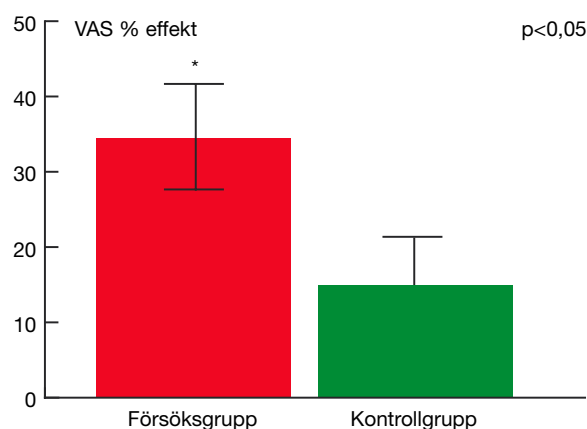
en förbättrad tarmfunktion korrelerat till en ökning av AF-halten i plasma ( $p < 0.001$ ). De ökade AF-nivåerna kvarstod en månad efter behandling, medan inget hände i placebogruppen (figur 2). Tarmbiopsier visade också att AF-patienterna fick en markant ackumulering av AF i tarmens epitelceller.

Studien visade också en signifikant skillnad ( $p < 0.05$ ) i upplevd förbättring mellan de patienter som ätit AF-dieten (medelvärde +34.6%) och placebogruppen (medelvärde +15.4%) enligt en VAS-skala (figur 3).

De goda resultaten har medfört att kirurgerna börjat AF-behandla fler patienter som genomgår operationer mot mag-tarmkanalen, där man erfarenhetsmässigt vet att det kommer att sluta med en dålig tarmfunktion. Behandlingen inleds tidigt genom att ibland redan första dygnet tillföra Äggulepulver B221® löst i vanlig juice för att på så sätt ge höga nivåer av protein AF direkt i tarmen utan att låta



Figur 2. Patienter behandlade med specialprocessade cerealier (SPC) fick signifikant högre AF-nivåer i plasma än placebogruppen. SPC-behandlade patienter fick också en signifikant bättre tarmfunktion.



Figur 3. De AF-behandlade patienterna visade en signifikant upplevd förbättring enligt en VAS-skala jämfört med placebogruppen.

kroppen först producera det. För det mesta kan man sluta med äggulepulvret inom 5–10 dagar och där- efter bara ge en underhållsdos med AF-inducerande spannmål, eftersom man vill att den endogena AF- produktionen hos patienterna skall stimuleras.

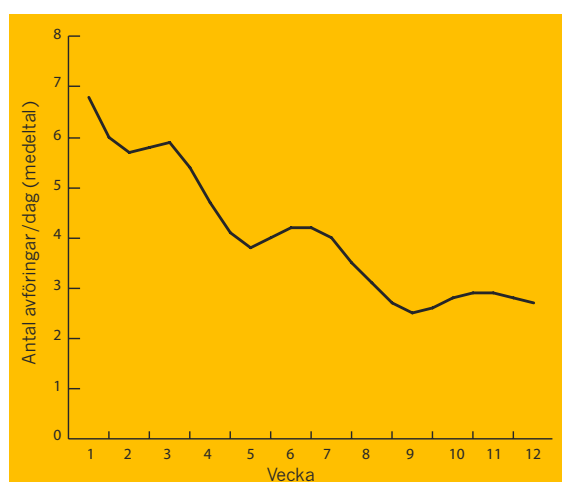
## Behandling av IBD hos barn

Den första pilotstudien på barn med Mb Crohn och ulcerös colit har nyligen rapporterats (Finkel, Bjarnason et al, 2004) och resultaten visar att kliniska symp- tom förbättrades och att behandling med specialpro- cessade cerealier (SPC) är en säker och vältolererad behandling. De positiva studieresultaten kommer att följas upp med en randomiserad dubbelblind studie.

## Behandling av svår Mb Crohn

Som följd av de goda resultaten med AF-behandling hos Crohnpatienter gjordes en öppen studie på sex patienter med svår, långvarig och terapiresistent Mb Crohn (Shafazand et al, 2003). Patienterna fick äta specialprocessade cerealier (SPC) under en tid av tre månader och kliniska symptom, blodprover, endo- skopi, histologi, CDAI (Crohn's Disease Activity Index) och livskvalitet (SF-36) registrerades.

En kontinuerlig och signifikant förbättring av kliniska symptom och livskvalitet registrerades (figur 4 och 5). Även en histologisk förbättring noterades. Denna och tidigare studier har visat att AF-induce- rande specialprocessade cerealier har en antiinflam- matorisk effekt. Antagligen är den antiinflamma- toriska effekten den mest betydelsefulla ur behand- lingssynpunkt hos Crohn-patienter.



Figur 4. En kontinuerlig och signifikant förbättring i form av minskat antal avföringar/dag noterades.

## Behandling med Äggulepulver B221® vid svårt skov av ulcerös colit

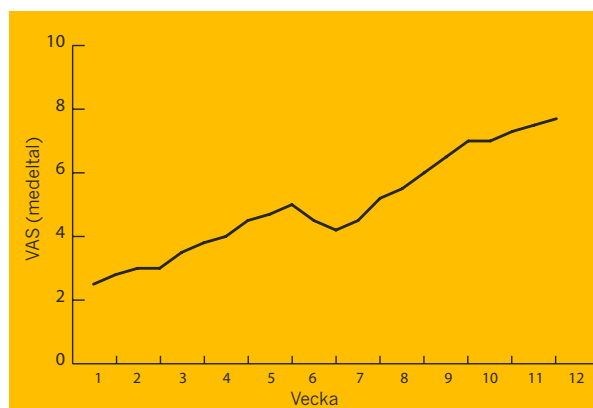
Tilläggsbehandling med äggulepulver innehållande en hög halt av antisekretoriska faktorer har även studerats på patienter med svårt skov av ulcerös colit. Äggulepulver B221® användes i dosen 2 g fyra gånger dagligen under 14 dagar och jämfördes med placebo-äggpulver (Eriksson et al, 2003).

10 patienter i vardera behandlingsgrupp ingick i studien. Äggulepulver användes som tilläggsbehand- ling till den ordinarie medicineringen, som även in- kluderade parenteral eller enteral nutrition.

## Det är troligt att den antiinflammatoriska effekten av AF föregår den antisekretoriska vid svåra skov av ulcerös colit.

Tidigare studier på patienter med kronisk IBD, endokrin diarré och diarré till följd av tarmresektion visade variabla, men signifikanta effekter på antalet tarmtömningar efter aktiv AF-induktion. I denna studie avsågs i första hand att undersöka en eventuell effekt på tarmslemhinnan, utöver effekt på diverse laboratorieparametrar och klinisk effekt.

Studien visade att en signifikant effekt av AF kunde ses i form av minskad inflammation i biopsier från tarmmucosan. Den sekretoriska effekten skiljde sig



Figur 5. Patienterna upplevde även en kontinuerlig och signifikant förbättring av livskvaliteten.

dock inte åt mellan grupperna. Därför är det sannolikt att den antisekretoriska effekten av protein AF vid ulcerös colit först har en betydelse efter det att inflammationen dämpats. Denna hypotes stöds av att tarmslemhinnan delvis återställdes till följd av AF-behandlingen. Den antisekretoriska effekten av AF kan kanske åstadkommas med AF-behandling i högre doser eller vid användande av specialprocessade AF-inducerande cerealier (SPC) som kan påverka kroppens endogena produktion av protein AF.

### **Prevention av mastit med AF**

Bröstkörtelinflammation hos ammande mödrar är ett vanligt och smärtsamt tillstånd. Sjukdomen kan variera från kortvariga inflammatoriska episoder till mera långvariga sådana med allvarliga symptom. När en infektion inte kan konstateras kan mjölkstockningen bero på inflammatoriska förändringar. Det har nyligen också framförts en hypotes att sub-

### **Sannolikt kan AF-inducerande spannmål (SPC) öka AF-nivåerna i bröstmjolk och därmed förhindra subklinisk mastit. Denna sjukdom ökar risken för överföring av virus från en HIV-positiv mamma till sitt ammande barn.**

klinisk mastit skulle kunna innebära en ökad risk för överföring av HIV-1 från moder till det ammande barnet.

Tidigare undersökningar på kvinnor i utvecklingsländer hade visat att de hade mätbara nivåer av protein AF i bröstmjolk och att dessa AF-nivåer var högre än hos kvinnor i industriländer. Därför beslöts att göra en randomiserad dubbelblind studie på ammande mödrar på Karolinska sjukhuset i Stockholm (Svensson et al, 2004).

3–7 dagar efter förlossningen fick den aktiva behandlingsgruppen specialprocessade AF-inducerande cerealier (SPC, 12 pat.), kontrollgruppen fick cerealier utan AF-inducerande egenskaper (16 pat.).

Resultaten visade att en kvinna i behandlingsgruppen fick mastit jämfört med sex kvinnor i kontrollgruppen. Tre kvinnor i kontrollgruppen hade

mastit vid två tillfällen och en kvinna diagnostiserades med mastit tre gånger ( $p=0,0086$ , permutations-test). Den enda kvinna i behandlingsgruppen som fick mastit hade endast ätit spannmålen under vardagar och inte under helger p g a ett missförstånd.

AF-nivåer i bröstmjolk mättes före och efter behandlingen. Efter den avslutade behandlingen var det en signifikant skillnad i mediannivå av protein AF mellan behandlingsgruppen, 1,1 AF-enheter/ml bröstmjolk (0,7-1,25) och kontrollgruppen, 0,1 (0,0-0,25) ( $p<0,0001$ ). När mediannivå jämfördes mellan kvinnor med eller utan mastit var det en signifikant skillnad mellan de kvinnor som inte fick mastit, 0,5 AF-enheter/ml bröstmjolk (0,2-1,1) och de kvinnor som fick mastit, 0,0 (0,0-0,1) ( $p=0,017$ ). Den kvinna i behandlingsgruppen som fick mastit hade den lägsta AF-koncentrationen i den gruppen.

Studieresultaten tyder på att en AF-nivå i bröstmjolk som överstiger 0,5 enheter kan skydda mot mastit, vilket är i överensstämmelse med djurstudier där en motsvarande nivå skyddat avkomman mot diarré (Lange och Lönnroth, 2001). Detta kan vara av speciellt stort kliniskt värde i utvecklingsländer där diarrésjukdomar fortfarande är ett stort problem. Det är givetvis också högintressant om AF-inducerande spannmål kan öka AF-nivåerna i bröstmjolk och på så sätt förhindra den subkliniska mastit som i afrikanska studier har relaterats till en förhöjd risk för överföring av virus från en HIV-positiv mamma till sitt ammande barn.

### **AF-behandling av reumatoid artrit**

Då tidigare studier på patienter med inflammatoriska tarmsjukdomar visat att kosttillskott med specialprocessade cerealier (SPC) minskar de kliniska symptomen samt har en positiv påverkan på de inflammatoriska processerna, avsåg forskarna att studera om SPC kunde ha en positiv effekt på sjukdomsaktiviteten vid reumatoid artrit (Mörck et al, 2003).

I en dubbelblind placebokontrollerad studie randomiserades patienter med aktiv reumatoid artrit till att inta SPC eller kontrollcerealier i en dos av 0,5 g/kg kroppsvikt dagligen fördelat på tre tillfällen under 12 veckors behandlingstid. Denna dos är relativt låg då normaldosen är 1 g/kg kroppsvikt. Patienterna fick behålla sin ordinarie medicinerings (metotrexat eller salazopyrin). Ingen patient behandlades med kortison. Före dietbehandlingen samt efter 4 och 12 veckor analyserades CRP, DAS 28 (Daily Activity Score mätt i 28 leder) och HAQ (Health Assessment Questionnaire). 16 patienter i behandlingsgruppen fullföljde studien och 18 patienter i kontrollgruppen.

Resultaten visade att AF-halten ökade signifikant i den grupp som fick SPC (tabell 3).

Jämförelse mellan utgångsstatus och registreringsarna efter 12 veckors behandling visade även en signifikant skillnad i CRP mellan grupperna. CRP öka-

de  $66 \pm 29\%$  hos kontrollgruppen, medan CRP minskade  $4 \pm 12\%$  i SPC-gruppen ( $p < 0,05$ ). Ingen skillnad kunde dock ses mellan grupperna avseende ledstatus och ledsymptom.

**Tabell 3. AF-koncentration i plasma i medeltal jämfört som parat t-test.**

| Testperiod                | Medelvärde $\pm$ SD | n | p      |
|---------------------------|---------------------|---|--------|
| Före behandling, SPC      | 0,2 $\pm$ 0,1       | 5 | ns     |
| Före behandling, placebo  | 0,2 $\pm$ 0,1       | 4 |        |
| Efter behandling, SPC     | 1,1 $\pm$ 0,1       | 5 | <0,001 |
| Efter behandling, placebo | 0,1 $\pm$ 0,1       | 4 |        |

## Nya utvecklingsområden

### Reseprofylax

Protein AF induceras hos friska individer, och de ökade AF-nivåerna kvarstår upp till en månad efter avslutad behandling med AF-inducerande spannmål (SPC). Sannolikt finns det således ett biologiskt minne i kroppen för produktion av AF.

Det har visats att människor som lever i ”smutsiga” miljöer kan ha högre nivåer av protein AF, troligen beror det på en kontinuerlig exposition av bakterietoxiner och annat som kan aktivera AF-systemet. Det har därför diskuterats om ett förebyggande intag av AF-inducerande specialprocessade cerealier (SPC) skulle kunna hjälpa till att bygga upp kroppens egna försvar inför resa till exempelvis tropiska länder där diarrésjukdomar är vanliga. Inga kontrollerade kliniska studier finns på detta, däremot är hypotesen den att man borde kunna skydda sig mot enterotoxinutlösta diarréer med en hög AF-nivå.

### Kommande kliniska studier och utvecklingsområden

Vilka sjukdomar beror på inflammatoriska processer och vid vilka tillstånd kan sekretoriska orsaker vara grunden till problemen? Dessa frågeställningar är vägledande för den fortsatta forskningen.

I alla hittills gjorda studier har patienterna fortsatt med ordinarie kost och medicinering. Då tilläggsbehandling med AF-produkter är enkel och mycket skonsam, är det många områden som intresserat forskare och läkare för fortsatta pilotförsök och kliniska studier. Nedan följer några exempel på sjukdomar, där vätskebalansen/inflammationen kan vara störd och AF-produkter skulle kunna vara till nytta.

#### Sekretoriska sjukdomar/processer

diabetes (AF i pancreasceller)  
diarré hos HIV-patienter  
pre-op/akutoper. (förbättra nutritionsstatus)  
cystisk fibros  
Mb Ménière  
ödematösa tillstånd (ex hjärnödem)

#### Inflammatoriska sjukdomar/processer

mucosit (till följd av cytostatika)  
tarmfistlar  
proktit  
mikroskopisk colit  
Mb Bechterew  
reumatoid artrit  
Mb Crohn hos barn  
IBS/colon irritabile

# Behandlingsanvisningar

## Dosering

**SPC:** Normaldosen av de AF-inducerande specialprocessade spannmålen (SPC) är 1 g per kg kroppsvikt och dygn fördelat på 2–3 tillfällen. Vid behandling av barn kan dosen behöva höjas något och vid behandling av äldre kan dosen behöva sänkas något. En gradvis upptrappning av dosen rekommenderas så att den rekommenderade normaldosen börjar att intas efter 4–6 dagar. De specialprocessade cerealerna kan intas tillsammans med t ex fil eller yoghurt. Det går också att koka gröt på SPC.

**Äggulepulver B221®:** Normaldoseringen är 2 g 5 gånger dagligen. Pulvret rörs ut i lite kall vätska, t ex juice eller vatten, och blandas lättast om man använder en visp eller mixerstav.

Behandling med Äggulepulver B221® kan vara den lämpligaste AF-terapin hos patienter med svårigheter att äta stora mängder specialprocessade cerealier. Studieresultaten tyder också på att patienter som inte svarar på behandling med AF-inducerande spannmål kan bli hjälpta av behandling med Äggulepulver B221®.

För att hjälpa kroppens egna produktion av protein AF är det värdefullt att introducera AF-inducerande cerealier (SPC) i samband med eller som uppföljning av behandling med Äggulepulver B221®.

Hos svårt sjuka patienter eller hos patienter med förmodat låga AF-nivåer kan behandling inledas med Äggulepulver B221® för att på så sätt ge höga halter av protein AF direkt i tarmen. Vanligtvis kan man sluta med äggulepulvret inom 5–10 dagar och därefter bara ge en underhållsdos med SPC

för att på så sätt stimulera kroppens endogena AF-produktion.

När det gäller potensförhållandet mellan de olika AF-produkterna är förhållandet ungefär det följande: 20 g SPC = 2 g Äggulepulver B221®.

## Förväntad behandlingseffekt

En positiv behandlingseffekt kan i normalfallet ses inom 10–15 dagar med AF-spannmålen och inom några timmar med Äggulepulver B221®. Om man slutar med AF-produkterna ses en avtagande effekt efter några veckor. Om man börjar på nytt nås tidigare AF-nivåer i plasma redan inom några dagar, vilket tyder på att det finns ett biologiskt minne för syntes av protein AF i kroppen.

## Biverkningar, interaktioner och försiktighet

AF-produkterna har ätits av tiotusentals patienter och biverkningar i medicinsk mening finns ej rapporterade. Enstaka patienter har rapporterat att de tillfälligt blivit hårda i magen. För att undvika detta rekommenderas en gradvis ökning av dosen under några dagar tills normaldos intas.

Det finns inga rapporter om några interaktioner med andra produkter eller läkemedel. Detta är viktigt att känna till då patienterna skall fortsätta med annan samtidig medicinering. Vare sig SPC eller Äggulepulver B221® skall på något sätt ersätta/ändra ordinerad medicinering. Glutenallergiker skall dock undvika att äta de specialprocessade spannmålen och äggallergiker skall inte inta Äggulepulver B221®.

# Referenser

---

- Björck, Bosaeus, Ek, Jennische, Lönnroth, Johansson and Lange, *Food induced stimulation of the antisecretory factor can improve symptoms in human inflammatory bowel disease: A study of a concept*, Gut, 2000; 46:824-829
- Davidson and Hickey, *Distribution and immunoregulatory properties of antisecretory factor*, Laboratory Investigation, 2004 Mar; 84(3):307-319
- Eriksson, Shafazand, Jennische and Lange, *Effect of Antisecretory Factor in Ulcerative Colitis on Histological and Laborative Outcome: A short Period Clinical Trial*, Scand J Gastroenterol, 2003; 38: 1045-1049
- Finkel, Bjarnason, Lindblad and Lange, *Specially Processed Cereals: A clinical innovation for children suffering from inflammatory bowel disease?*, Scand J Gastroenterol, 2004; 39:87-88
- Hanner, Jennische and Lange, *Antisecretory Factor: A clinical innovation in Ménière's disease?*, Acta Otolaryngol, 2003; 123:779-780
- Hanner, Jennische, Lange, Lönnroth and Wahlström, *Increased antisecretory factor reduces vertigo in patients with Ménière's disease: a pilot study*, Hearing Research, 2004; 4803:1-6
- Lange, *A rat model for an in vivo assay of enterotoxic diarrhoea*, FEMS Microbiol Lett, 1982; 15:239-242
- Lange and Lönnroth, *Passive transfer of protection against cholera toxin in the rat intestine*, FEMS Microbiol Lett, 1984; 24:165-168
- Lange, Lönnroth and Skadhauge, *Effects of the antisecretory factor in pigs*, Pflügers Arch, 1987; 409:328-332
- Lange and Lönnroth, *The Antisecretory Factor: Synthesis, anatomical and cellular distribution and biological action in experimental and clinical studies*, International Review of Cytology, 2001; vol 210:39-75
- Lange, Bosaeus, Jennische, Johansson, Lundgren and Lönnroth, *Food-induced antisecretory factor activity is correlated with small bowel length in patients with intestinal resection*, APMIS, 2003; 111:985-988
- Laurenius, Wängberg, Lange, Jennische, Lundgren and Bosaeus, *Antisecretory factor counteracts secretory diarrhoea of endocrine origin*, Clinical Nutrition, 2003; 22(6):549-552
- Mörck, Ek, Jennische, Laurenius, Tarkowski och Lange, *Anti-inflammatorisk effekt av kosttillskott med specialprocessade cerealier vid reumatoid artrit – en dubbel-blind pilotstudie*, Posterpresentation vid Riksstämman, 2003
- Shafazand, Eriksson, Jennische och Lange, *Födoinducerad ökning av antisekretorisk faktor förbättrade det kliniska tillståndet hos sex patienter med svår Crohns sjukdom*, Posterpresentation vid Riksstämman, 2003
- Svensson, Lange, Lönnroth, Widström and Hanson, *Induction of antisecretory factor in human milk may prevent mastitis*, Acta Paediatrica, 2004, in press

## **AS-FAKTOR AB**

Box 30192, 104 25 Stockholm. Tel 08-657 42 70. [info@as-faktor.se](mailto:info@as-faktor.se) [www.as-faktor.se](http://www.as-faktor.se)