

## **Lars E Gustafsson 1950-2017. Läkare, forskare och entreprenör, och hans forskargrupp**

### **Magnus Persson**

*Lars var min handledare under doktorandstudierna och kollega under de följande åren som ledde fram till min docentur. Vi publicerade flera dussin artiklar tillsammans. Lars och jag utvecklade en vänskapsrelation under dessa år vilket även innefattade umgänge mellan våra familjer med gemensamma seglatser och årliga besök på sommarvisten. Det har varit ett stort privilegium att få ha samarbetat med Lars och att ha kunnat räkna Lars som sin vän. Nedanstående är inte på något sätt en fullständig beskrivning av Lars forskargärning, men ett något personligt porträtt av Lars och några höjdpunkter i hans forskargärning.*

Sammanfattning: Lars kom från en gedigen akademisk miljö och utbildade sig till läkare vid Karolinska Institutet varefter han gjorde sin AT-tjänst på Serafimerlasarettet i Stockholm. Den kliniska erfarenheten präglade all Lars forskning. Lars handledde framgångsrikt drygt tjugo doktorander varav flertalet med läkarutbildning som grund. Två av Lars upptäckter har satt stort avtryck i forskarsamhället varav en nått klinisk användbarhet inom astma- och allergivården, och den andra befinner sig i skrivande stund i kliniska fas II-studier. Upptäckten 1991 att endogent producerad kvävemonoxid, NO kan detekteras i utandad luft, och att vissa inflammatoriska sjukdomstillstånd påverkar halten av NO, har givit upphov till uppemot 20 000 publikationer [PubMed 2022] och omsattes till klinisk nytta genom att Lars tillsammans med kollegor från Institutionen för Fysiologi och Farmakologi startade bolaget Aerocrine AB som patenterade och utvecklade tekniken för att mäta NO i utandad luft för kliniskt rutinbruk. Den andra signifikanta hypotesen som framgångsrikt testades var att en "ultra-kortverkande" NO-donator, given centralt intravenöst borde kunna ha en i det närmaste selektiv kärlvidgande effekt på blodkärlen i lungorna, och på så sätt borde den kunna vara användbar vid pulmonell hypertension. Lars och kollegor utvecklade ett stort antal NO-donerande substanser varav en utvaldes för klinisk utveckling och befinner sig i skrivande stund i kliniska fas II-studier med indikationerna Akut Pulmonell Hypertension respektive ARDS vid COVID-19. Detta patent ligger i bolaget Attgeno AB, vilket idag leds av tre av Lars tidigare doktorander.

### **De formerande åren**

Lars föddes och växte upp i Lund som son till läkaren och forskaren Bengt Gustafsson (1916-1986) och hans maka]. När Lars var 11 år utnämndes hans far till Professor i Medicinsk Symbiosforskning vid Karolinska Institutet och familjen flyttade till Stockholm. Lars hade en två år äldre bror Sven, också han valde läkar- och forskarbanan. Efter gymnasiestudier antogs Lars till läkarutbildningen vid KI. Efter medicinstudierna genomförde Lars AT-tjänst vid Serafimerlasarettet och blev legitimerad läkare 1979. Lars värderade sin läkarlegitimation högt och det var framför allt som läkare han tog sig an de vetenskapliga frågeställningarna. Lars hade ett specialintresse för kardiopulmonell

fysiologi med bärighet mot intensivvård och han arbetade ett tag som intensivvårdsläkare men valde till slut att helhjärtat fokusera på forskning inom dessa fält.

### **Åren som doktorand**

Lars antogs som doktorand vid dåvarande Institutionen för Fysiologi I. Hans handledare blev Per Hedqvist och de vetenskapliga frågeställningar som adresserades rörde nervsignalering i tarmen och ledde till disputation 1980. Det bör ha varit en dynamisk tid på institutionen, förmodligen präglad av Ulf von Eulers geni (Nobelpristagare i Medicin eller Fysiologi 1970, upptäckare av Noradrenalin som neurotransmittor och Substans P). Ulf var professor vid institutionen fram till 1971, dvs ungefär då Lars tog sina första steg som doktorand. Ulf verkade även utanför Sverige och institutionen hade internationell lyskraft med många samarbeten. Man kan bara gissa att det var en miljö som passade en vetgirig ung Lars som "hand i handske".

### **Vägen mot en egen forskargrupp**

Lars första doktorand var N Peter Wiklund (1958-), en påtagligt ambitiös nybliven läkare. Tillsammans publicerade de ett antal artiklar kring mediering av adenosins fysiologiska funktioner. Peters doktorandstudier rörde till stor del farmakologisk karaktärisering av purinerga receptorer i glatt muskelvävnad [från olika organ?]. Peter gjorde sin post-doc vid Wellcome i Kent UK under ledning av Salvador Moncada och utnämndes till docent i Fysiologi. Han var under lång tid en sammanhållande kraft i forskargruppen kring Lars. Peter är idag Professor i Urologisk kirurgi vid Mount Sinai Hospital System i NY, USA och var tidigare Professor i Urologi vid Karolinska Institutet.

Claes U Wiklund (1960-) antogs som doktorand 1986 och fortsatte i Peters fotspår, han doktorerade 19XX och är idag verksam som anesthesiolog i Frankrike.

Magnus G Persson (undertecknad) (1960-) antogs som doktorand 1987 och avhandlingen kom att omfatta intravitalmikroskopiska studier av regleringen av artäriolers vidgning och sammandragning med avseende på puriner och neurotransmittorer, i tvärstrimmig muskelvävnad. Institutionen hade vid den tiden ett tämligen nyinrättat laboratorium för intravitalmikroskopiska studier, lett av Lennart Lindblom. Vi var tre doktorander som arbetade med utrustningen, Anders Öhlén (huvudhandledare Lennart Lidblom), Johan Raud (huvudhandledare Sven-Erik Dahlén) och jag. Vi hade tydligt separata frågeställningar att studera och kollegialiteten var mycket god i det oftast mörklägda laboratoriet. Till den goda stämningen bidrog i högsta grad Ulla Palmertz som var laboratorieassistent. Anders var utbildad både ekonom och läkare och gick efter disputation vidare till läkemedelsindustrin och sedan vidare till Läkemedelsförsäkringen där han var VD 2009-2016. Johan är sedan många år verksam som forskningschef i mindre utvecklingsbolag.

I samband med upptäckten av kväveoxid, NO, som en endogen mediator (1986) började en intensiv ny period i Lars forskargrupp. Vi hade tidigt möjligheten att använda L-

NMMA, en hämmare av bildningen av NO från arginin och på så sätt kunde vi studera NOs fysiologiska roll i olika modellsystem. Lars etablerade ett antal internationella samarbeten, kanske mest notabelt med Salvador Moncada (Wellcome Ltd och senare University College London) och fler doktorander tillkom till Lars Gustafssons grupp.

Per Agvalds (disputation 2002) avhandlingsarbete fokuserade på studier av mekanismerna bakom frisättning av NO från NO-donerande läkemedel som nitroglycerin. Per är idag psykiater och VD på Attgeno AB som utvecklar ultra-kortverkande NO-donatorer för medicinskt bruk.

Christofer Addings avhandlingsarbete fokuserade på blodflödesreglering av lungcirkulationen med fokus på NO (disputation 1999) som en selektiv pulmonell vasodilator. I detta arbete utvecklades von Eulers gamla *in vivo* modeller för att studera lungcirkulation och integrerades med metoden att mäta NO i utandningsluft. Christofer fick efter disputation en Forskar-AT tjänst på KS och är nu överläkare i Urologi med fokus på robotkirurgi för blåscancer på KS. Christofer gjorde en post-doc på Astra Zeneca i ett läkemedelsprojekt med ett NO-innehållande anti-inflammatoriskt läkemedel i ett samarbete med Lars. Christofer är en av grundarna och f.n. medicinsk forskningschef på Attgeno AB.

Lars doktorand Kristofer Nilsson gjorde huvuddelen av sin avhandling (disputation 2010) med inriktning på att karaktärisera de nya ultrasnabba NO-donatorena, vilka sedemera kunde patenteras och belönades med Karolinska Institutets stora innovationspris 2005. I detta sammanhang grundades Attgeno AB där Lars under de initiala åren verkade som VD och han kom på det geniala bolagsnamnet som helt enkelt betyder "att ge NO"

## **NO som neurotransmitter**

Ett annat spår i Lars forskning rörde NOs roll som neurotransmittor. Tidigt efter upptäckten av NO som mediator av vasodilatation identifierades även att NO frisattes från autonoma nerver bl.a. i mag-tarm kanalen och urogenital organen. Lars hade tre doktorander som alla kartlade olika delar av hur frisättningen av NO reglerades. Henrik Iversen (disputation 1996) studerade NOs hämmande effekt på motoriken i glatt muskel, Caroline Olgart Höglund (disputation 1998) kartlade frisättningen av NO från nerver och Katarina Hallén Grufman (disputation 2004) studerade regleringen av frisättningen av NO från nerver samt faktorer som påverkade frisättningen.

## **Upptäckten av endogent NO i utandningsluft**

Kvävemoxid (NO) är under atmosfärstryck en gas. Således inlånades utrustning för att försöka studera frisättning av NO-gas i "head space" ovanför biologiska vävnader i samband med experimentella manipulationer. Utrustningen lånades från Salvador Moncada (se ovan). Experimenten var framgångsrika men tekniskt besvärliga. Det var i samband med rengöring av utrustningen som Lars en kväll noterade att det blev utslag på instrumenten när han blåste i insugsventilen. Det blev en lång natt på labbet. Efter att

initialt misstänkt att det var en artefakt kunde vi konstatera att utandningsluft konstant innehöll högre koncentration av NO än den luft vi andades in, dvs vi kunde i real-tid studera frisättning av en känd gasformig mediator från luftvägarna. Den tidskrift som på den tiden hade god "impact factor" och samtidigt hade en kort handläggningstid (före web-publicationernas tid) var BBRC (Biochemical Biophysical Research Communication), således valde vi att publicera där (Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Biochem Biophys Res Commun. 1991, Dec. 16).

Denna upptäckt ledde till en febril aktivitet i forskargruppen och ett förhållandevis stort antal projekt initierades varvid publikationstakten sköt i höjden. Parallellt insåg vi att det borde kunna finnas ett diagnostiskt värde i att studera NO i utandad luft, kanske i huvudsak vid lungsjukdomar och ett arbete initierades i avsikt att patentera upptäckten. Studier inleddes i samarbete med kliniker inom olika discipliner inom lungornas sjukdomar, infektion, onkologi, sarkoidos och astma. Det verkade som att intensiteten av luftvägsinflammation vid astma korrelerade väl med halten av NO i utandad luft och 1994 kunde vi publicera detta fynd i The Lancet (Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Lancet. 1994 Jan 15;343(8890):146-7.). Det bolag vi startat i avsikt att nyttiggöra fynden Aerocrine AB kunde ta in extern finansiering och påbörjade utvecklingen av ett kliniskt fungerande mätinstrument. Så småningom blev analys av NO i utandad luft en etablerad standard och rekommenderad av såväl American Thoracic Society (ATS) som dess europeiska motsvarighet (ERS). Lars var djupt involverad i arbetsgrupper satta att formulera dessa standarder.

Det är viktigt att påpeka att även om litteraturen kring NO i utandningsluft är omfattande och att Lars var absolut instrumentell för denna forskning, så är betydelsen ännu större. Lars fynd startade ett helt nytt forskningsområde enligt tesen "om man kan hitta en endogen mediator i utandningsluft borde man väl kunna hitta flera?" och detta arbete pågår än idag i flera laboratorier världen över.

### **Lars Gustafssons intresse för Pulmonell Hypertension**

Lungornas blodkärl har en unik egenskap i det att de kontraherar vid hypoxi (*the hypoxic pressor response*), detta till skillnad från övriga kärlbäddar, ett fynd som Linjestränd och von Euler hade upptäckte (von Euler US, Liljestränd G (1946). "Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat." *Acta Physiol.Scand.* **12** (4): 301-320). Den fysiologiska nyttan är uppenbar, på detta sätt styrs blodflödet från sämre ventilerade lungsegment till bättre, i avsikt att bibehålla optimalt gasutbyte. Detta fenomen vars molekylära bakgrund var oklar hade djupt intresserat Ulf von Euler som hade utvecklat en utrustning för att studera lungartärtryck *in vivo* och som fanns tillgänglig på Lars laboratorium. Med tillkomsten av blodflödesmätare kunde vi med stor noggrannhet studera pulmonell vaskulär resistens (PVR). Vi noterade i ett antal studier att NO hade stor

betydelse för regleringen av tonus i lungornas blodkärl och att NO-donatorer hade kraftigt vasodilaterande effekter. En bieffekt var att de NO-donatorer vi hade till hands även påverkade systemblodtrycket.

Lars identifierade tidigt det kliniska behovet inom intensivvård att finna behandling för högt blodtryck i lungcirkulationen och ägnade stor tid åt att finna nya substanser som skulle kunna användas i detta syfte. Lars åkte flera gånger till Afrika för att hämta hem växter (använda av medicinmän) vars växtsaft extraherades och som prövades i djurmodellerna för att studera hur lungans NO produktion och blodcirkulation kunde påverkas. Lars fasta övertygelse om att kunna finna en ny potent lungselektiv vasodilator och hans djupa kunskap inom organisk kemi och NO fysiologi ledde till att Lars startade en forskningslinje där forskargruppen fokuserade på en metod att "bubbla" olika kemiska lösningar med NO gas för att framställa och utveckla nya ultra-kortverkande NO-donatorer. Avsikten var att dessa skulle "lämna av" sitt vasoaktiva NO under passagen genom lungorna och ha ingen eller mycket liten effekt på systemkretsloppet. Utan att vara kemist (detta visar Lars storhet och "ingenting-är-omöjligt-attityd") utvecklade och patenterade han PDNO, en molekyl med de eftersträvade egenskaperna. Lars sjukdom satte dock käppar i hjulet för planerna på att själv utveckla PDNO till ett läkemedel och slutligen överfördes patenten till ett bolag lett av tre av Lars doktorander, Attgeno AB, som idag bedriver en strukturerad läkemedelsutveckling av PDNO men inriktning mot akut pulmonell hypertension.

Lars E Gustafsson has a lecture hall to his name at Biomedicum at Karolinska Institutet (room D1012)

Magnus Persson Juni 2023