

Biomarkörer i urin som teck

SAMMANFATTNING:

Den allergiska inflammationen engagerar många olika celltyper och mediatorer. Två celler, eosinofila granulocyten och mastcellen, förknippas dock mer än några andra celler med den allergiska reaktionen. Dessa celler är multipotenta och utsöndrar i kroppen en mängd olika mediatorer, men enbart några få uppträder i urinen i mätbara nivåer. EPX/EDN (eosinophil protein x/eosinophil derived neurotoxin) tjänar som markör på eosinofilens aktivitet och omsättning hos den allergiska patienten.

Mätning av EPX/EDN har visat sig användbar kliniskt både hos barn och vuxna med astma och atopisk dermatit, eftersom nivåerna avspeglar svårighetsgraden hos sjukdomen, men också för att de signalerar att processen kan behandlas med anti-eosinofilbehandling såsom kortison och anti-IL5. Mastcellens aktivitet avspeglas av PGD₂ (prostaglandin D₂)-metaboliten 9 alpha, 11 beta-PGF₂ och förhöjda nivåer av denna ses vid anafylaktiska reaktioner utlösta av allergen, samt vid andra svåra allergiska reaktioner och provokationer. LTE₄ (leukotrien E₄) ökar också vid anafylaktiska och andra svåra allergiska reaktioner. Mätning av LTE₄ i urin kan användas till behandlingsstratifiering och uppföljning av behandling med leukotrienantagonister. Mätning av histamin och dess metaboliter har begränsat intresse vid allergiska sjukdomar.

Behovet att beskriva den inflammatoriska fenotypen hos den enskilde patienten med allergisk sjukdom, särskilt hos dem med svår allergi, är stor och växande i takt med introduktion av nya och mer selektivt verkande läkemedel. Mätning av biomarkörer i urin är enkelt, och utveckling av ytterligare biomarkörer som kan hjälpa oss att ännu bättre beskriva fenotypen hos individen är en viktig utmaning för framtiden.

Per Venge

professor och överläkare vid Institutionen för medicinska vetenskaper, Uppsala Universitet och Avdelningen för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala.

KONTAKTADRESS:

Per Venge
Avdelning för klinisk kemi och farmakologi
Akademiska sjukhuset
SE-751 85 Uppsala
per.venge@medsci.uu.se

PER VENGE, Uppsala Universitet

Den process som ligger till grund för våra allergiska sjukdomar kallar vi ofta med ett samlingsnamn för den allergiska inflammationen (1-3). Vi inbegriper i begreppet de celler och mediatorer som är aktiverade vid sjukdomen samt konsekvenserna som denna aktivering medför. De celler och mediatorer som är engagerade i den allergiska inflammationen visar en stor variation och skiljer sig mellan individer och även hos den enskilda individen vid olika skeden av den allergiska sjukdomen. Engagemanget av celler och mediatorer skiljer sig dessutom mycket mellan olika typer av allergisk sjukdom. Denna variation är betydelsefull att förstå och kartlägga för att vi på ett bättre sätt skall kunna hjälpa våra patienter med svåra allergiska problem. Det bör därför vara en strävan hos oss att beskriva den allergiska inflammationen hos den enskilde individen i termer av kvalitet och kvantitet. Med kvalitet menar jag att beskriva vilka celler och mediatorer som är involverade och med kvantitet i vilken omfattning dessa är involverade. Om vi till exempel ser att eosinofila granulocyten är en dominerande cell och att mediatorer frisatta från eosinofilen finns i höga koncentrationer i olika kroppsvätskor så vet vi att processen som regel kan dämpas med hjälp av kortison, medan processer drivna av exempelvis mastceller och neutrofila granulocyter är mer resistent mot kortison. I den internationella vetenskapliga litteraturen talar man om att bestämma den inflammatoriska fenotypen hos den enskilde patienten.

Finns metoderna idag som tillåter oss att bestämma den inflammatoriska fenotypen hos den enskilde patienten och är de möjliga att använda i den kliniska vardagen? Svaret på denna fråga är både ja och nej. Ja, metoderna finns, men nej, de har haft svårt att få fotfäste i den kliniska vardagen. Det senare delvis för att provtagning och omhändertagande av provet är tidsödande och relativt komplicerad och dessutom ställer stora krav på noggrannhet och standardisering. Jag tänker på undersökningar som bronkialbiopsier, BAL, men även sputum. Sökandet efter biomarkörer i andra kroppsvätskor som

på ett korrekt och meningsfullt sätt kan avspegla den allergiska inflammationen är därför en angelägen uppgift. I blodet kan vi räkna antalet eosinofila granulocyter, vilket är och har varit en viktig analys i många år, liksom att vi kan mäta halten av några av de mediatorer som utsöndras från den aktiverade eosinofilen såsom ECP (eosinophil cationic protein), EPX/EDN, EPO (eosinophil peroxidase). I många studier har sådana mätningar visats vara relaterade till svårighetsgraden av den allergiska sjukdomen exempelvis astma och atopisk dermatit (3).

Svårigheten med mätning av eosinofilens mediatorer i serum är dock att det ställer stora krav på standardiserad provtagning med avseende på tid och temperatur, något som inte alltid är lätt att åstadkomma i den praktiska vardagen (4). Detta är sannolikt huvudförklaringen till varför sådana mätningar inte används i den utsträckning som man borde förvänta sig. Ett alternativ är att räkna eosinofiler och mäta ECP i andra kroppsvätskor såsom sputum och nasallavage. Sådana mätningar visar oftast mycket god relation till astmaprocessen, men problemet är i stället svårigheten att få fram bra och representativt material. Tryptas är ett protein som utsöndras från mastcellen och kan mätas i blod och en del andra kroppsvätskor som ett uttryck för aktivering av mastcellen. Ökade tryptasnivåer i blodet ses enbart vid extensiv aktivering som vid anafylaxi, men sällan hos astmatiker och andra allergiska tillstånd. Blodmätningar av tryptas är därför av begränsad användbarhet i det dagliga omhändertagandet av den allergiske patienten.

Andra metoder som vunnit betydande popularitet är mätning i utandad luft av NO och diskussionen går just nu hög om dess kliniska värde (5-7). I flera studier har det visats att NO – halterna sannolikt avspeglar graden av eosinofil inflammation i luftvägarna och att NO hos den okomplicerade astmatikern kan användas för behandlingsmonitorering av kortison. Alternativ till de ovan beskrivna analyserna är mätning av vissa mediatorer i urin. En fördel med urinmätning är den enkla tillgången på material, särskilt hos

en på allergisk inflammation



FOTO: JANA KOLAROVA / WWW.SXC.HU

Mätning av eosinofila granulocyten i urin hos små barn är en användbar markör för att följa utvecklingen av allergisk sjukdom.

barn. En svårighet är dock att erhålla ett korrekt kvantitativt svar, eftersom urinen varierar mycket på grund av vätskeintag och vattenutsöndring. Ett populärt sätt att justera för detta är att korrigera för utspädningen av analyten med hjälp av någon endogen substans, ex. kreatinin.

I det följande kommer jag att ge en översikt över några av de biomarkörer som kan mätas i urin och som använts för att spegla olika aspekter av den allergiska inflammationen.

Vilka markörer kan vi mäta i urin och vad avspeglar dessa?

Arakidonsyrametaboliter

Arakidonsyra bildas från cellmembranets fosfolipider och är substratet för bildning av en hel rad mycket aktiva och viktiga

mediatorer. Arakidonsyrametaboliter påverkar nästan alla cellulära processer i kroppen. Tre enzymer är särskilt viktiga i bildandet av dessa metaboliter. Dessa är COX-1 och 2, 5-LOX och 15-LOX. Aktivering av COX-1 och 2 ger upphov till bildandet av prostaglandiner, 5-LOX till bildandet av leukotriener och 15-LOX till bildandet av lipoxiner. Inom varje grupp av metaboliter återfinns ett stort antal mediatorer med varierande funktion och läkemedelsindustrin jobbar mycket aktivt med att hitta bra läkemedel som kan reglera bildandet av dessa. Sedan länge har vi kunnat köpa hämmare av COX dvs. acetylsalicylsyra och mer specifika hämmare av COX-2, liksom hämmare av leukotriener. Den främsta effekten av dessa läkemedel är en reduktion av symptom

på inflammation såsom värk, feber och i fallet leukotrienhämmare reduktion av astmatiska besvär.

I urinen kan vi mäta många olika arakidonsyrametaboliter och det anses allmänt att mätning av PGD_2 och dess metabolit (9 alpha, 11 beta-PGF₂) i huvudsak avspeglar mastcellsaktivitet emedan leukotriener såsom LTE₄ sannolikt har sitt ursprung i både mastceller, eosinofiler och basofiler. Även epitelceller producerar leukotriener, men i vilken utsträckning denna produktion avspeglar sig i urinnivåerna är inte klarlagt.

Histamin

Histamin produceras enbart av basofila granulocyter och mastceller och ökade halter av histamin och histaminmetaboli-

ter i urinen är därför ett uttryck för en aktivering eller ökad omsättning av dessa celler. Detta ses bland annat vid myeloproliferativa sjukdomar, mastocytos och urticaria pigmentosa. Även vid anafylaktiska reaktioner ser man ökade nivåer. Vid andra typer av allergiska reaktioner är histaminutsöndringen måttlig om ens ökad.

EPX/EDN

EPX/EDN (eosinofil protein x/eosinofil derived neurotoxin) är ett protein som lagras i och utsöndras från den eosinofila granulocyten vid aktivering. Proteinet har ett dubbelnamn eftersom det inte finns någon konsensus om vad proteinet skall kallas. EPX/EDN är biologiskt ett mycket intressant protein med en betydande ribonukleasaktivitet (3), men som även visats påverka dendritiska celler på olika sätt. EPX/EDN är nära besläktat med ECP och dessa två proteiner bildades för att antal miljoner år sedan som en konsekvens av en genduplikation (4). När vi mäter EPX/EDN i plasma eller urin så är den främsta källan den eosinofila granulocyten, även om små mängder också bildas av den neutrofila granulocyten och av leverceller.

Kan vi använda urinmätning i kliniken för diagnos och uppföljning av patienter med allergisk sjukdom?

Astma

Eosinofila granulocyten är en dominerande cell i bronkerna hos individer med allergisk astma och det finns mycket stöd för att eosinofila granulocyten via sina mediatorer är av stor betydelse för utvecklingen av den allergiske astmatikerns symptom (8). Ett flertal studier har också visat att urinutsöndringen av EPX/EDN är ökad hos den obehandlade allergiske astmatikern och att utsöndringen minskar vid kortisonbehandling (3; 9–14). I flera av dessa studier, men inte alla, sågs även ett samband mellan EPX/EDN-nivåerna i urin och lungfunktion i form av FEV₁.

I nyligen publicerade studier visades att anti-IL5-behandling, som specifikt reducerar eosinofila antalet, inte hade någon påtaglig effekt på lungfunktionen men signifikant reducerade antalet svåra astmaexacerbationer (15,16). Detta ger anledning att misstänka att mätning av EPX/EDN i urin skulle kunna tjäna som en markör på eosinofil engagemang i den astmatiska lungan och att höga nivåer, i

likhet med vad som visades i en japansk studie med serum ECP (citerad i Venge et al.(4)), möjligen skulle kunna prediktera risk för exacerbation. I en stor studie på barn visade man att EPX/EDN i urin framför allt avspeglade huruvida barnen var atopiker och hade utvecklade allergiska symptom, eftersom det fanns en progressiv ökning i EPX/EDN-nivåerna i urin i relation till förekomst eller inte av atopi, «wheeze» och eksem (9). Således hade barnen med atopi och symptom betydligt högre nivåer än barnen med liknande symptom men ingen atopi. Konklusionen blev att mätning av EPX/EDN i urin hos små barn är en användbar markör för att följa utvecklingen av allergisk sjukdom.

LTE₄ i urin är ofta förhöjd hos den obehandlade astmatikern och i samband med astmaexacerbationer, liksom man ser ökad utsöndring i samband med allergenprovokation (6; 17–20). Behandling med leukotrien-antagonister eller kortison reducerar nivåerna signifikant (21). LTE₄-nivåerna samvarierar med lungfunktionen mätt som FEV₁. Det är intressant att de astmatiker som hade högst LTE₄-nivåer i urinen också var de som svarade bäst på behandlingen. Detta talar för att terapistratifiering av astmatiker borde omfatta LTE₄-mätning i urinen.

Nivåerna i urin av PGD₂-metaboliten 9 alpha, 11 beta-PGF₂ är sällan förhöjda hos den stabila astmatikern men förhöjda i samband med akuta exacerbationer (20). Flera studier har också visat ökad utsöndring i samband med allergen och mannitolprovokation. Hos ASA-intoleranta astmatiker ser man en kraftig ökning av både LTE₄ och 9 alpha, 11 beta-PGF₂ i samband med ASA provokation, men inga ökade basalnivåer i urin trots ökade basalnivåer i plasma (22). I en ny studie visades att 9 alpha, 11 beta-PGF₂ ökade signifikant efter vinprovokation i motsats till LTE₄ som förblev oförändrad (23). Mätning av PGD₂ eller snarare dess metabolit 9 alpha, 11 beta-PGF₂ ger en uppfattning om aktivering av mastcellen och bör vara av värde att mäta i särskilda fall för att försöka förstå de bakomliggande orsakerna till patientens besvär. Behovet ökar också i takt med introduktionen på marknaden av anti-allergiska läkemedel som har PGD₂ som specifikt mål.

En stor andel av våra astmatiska patienter har den icke-allergiska typen av astma. Gemensamt för både den aller-

giska och icke-allergiska astman är en ökad förekomst i bronkmukosan av mastceller (8). Hos en del icke-allergiska astmatiker tycks eosinofila granulocyten vara engagerad och vi kan då utnyttja eosinofilspecifika metoder att monitorera våra patienter. Hos de allra flesta icke-allergiska astmatiker har den eosinofila granulocyten närvaro ersatts av andra celler bland annat neutrofila granulocyten och makrofager. Har vi några biomarkörer i urin som kan avspegla dessa cellers engagemang? Svaret är nej, vilket är en stor brist och en stor utmaning för framtiden.

Atopisk dermatit

Hos barn och vuxna med atopiska dermatit ses förhöjda nivåer i urin av EPX/EDN, vilket speglar eosinofila granulocyten engagemang i sjukdomen (3, 9, 13, 24, 25). Nivåerna av EPX/EDN är också relaterade till den atopiska dermatitens svårighetsgrad. Även LTE₄ och 9 alpha, 11 beta-PGF₂ är förhöjda i urin men endast hos de patienter som uppvisar den allvarligaste typen av atopisk dermatit. Konklusionen av den tillgängliga litteraturen är att mätning av EPX/EDN i urin bör vara av kliniskt värde för uppföljning och bedömning av aktiviteten i sjukdomen hos patienter med atopiska dermatit.

Anafylaxi

Vid en anafylaktisk reaktion är det framför allt mastcellen och basofilen som aktiveras. Detta avspeglar sig också i urinmätningar av de diskuterade biomarkörerna eftersom utsöndringen av 9 alpha, 11 beta-PGF₂ och LTE₄ liksom histamin och dess metaboliter är kraftigt ökad vid en anafylaktisk reaktion inducerad av ett allergen (26). Däremot ses ingen eller en mycket måttlig ökning av eosinofilmarkören EPX/EDN. Det har också rapporterats att mätning i urin av 9 alpha, 11 beta-PGF₂ är ett känsligare mått på en allergisk anafylaktisk reaktion än tryptasmätning i plasma.

Födoämnesallergi

Det finns mycket få studier som har använt urinmätningar för att avspegla födoämnesallergiska reaktioner. I en studie mättes EPX/EDN och LTE₄ i urin efter födoämnesprovokation. LTE₄-nivåerna ökade signifikant hos den födoämnesallergiska gruppen och var korrelerad till EPX/EDN-nivåerna i feces (27). Däremot sågs inte några förändringar av EPX/EDN-nivåerna i urin.

Referenser

1. Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* 2009 Oct; 58(10): 631–8.
2. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008 Jul 24; 454(7203): 445–54.
3. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004 Jan; 59(1): 26–32.
4. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 1999 Sep; 29(9): 1172–86.
5. Majid H, Kao C. Utility of exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2009 Sep 30.
6. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Non-invasive measurement of airway inflammation in asthma. *J Asthma* 2006 Aug; 43(6): 407–15.
7. Nordvall SL, Janson C, Kalm-Stephens P, Foucard T, Toren K, Alving K. Exhaled nitric oxide in a population-based study of asthma and allergy in schoolchildren. *Allergy* 2005 Apr; 60(4): 469–75.
8. Amin K, Ludviksdottir D, Janson C, Nettelbladt O, Bjornsson E, Roomans GM, et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Dec; 162(6): 2295–301.
9. Gore C, Peterson CG, Kissen P, Simpson BM, Lowe LA, Woodcock A, et al. Urinary eosinophilic protein X, atopy, and symptoms suggestive of allergic disease at 3 years of age. *J Allergy Clin Immunol* 2003 Oct; 112(4):702–8.
10. Wennergren G. Inflammatory mediators in blood and urine. *Paediatr Respir Rev* 2000 Sep;1(3): 259–65.
11. Kristjánsson S, Strannegård IL, Wennergren G. Inflammatory markers in childhood asthma. *Ann Med* 1996; 28(5):395–9.
12. Oymar K. High levels of urinary eosinophil protein X in young asthmatic children predict persistent atopic asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2001 Dec; 12(6): 312–7.
13. Oymar K, Havnen J, Halvorsen T, Bjerknes R. Eosinophil counts and urinary eosinophil protein X in children hospitalized for wheezing during the first year of life: prediction of recurrent wheezing. *Acta Paediatr* 2001 Aug; 90(8): 843–9.
14. Oymar K, Bjerknes R. Urinary eosinophil protein X in children with asthma: influence of atopy and airway infections. *Pediatr Allergy Immunol* 2001 Feb;12(1): 34–41.
15. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009 Mar 5; 360(10): 985–93.
16. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009 Mar 5; 360(10): 973–84.
17. Oymar K, Halvorsen T, Aksnes L. Mast cell activation and leukotriene secretion in wheezing infants. Relation to respiratory syncytial virus and outcome. *Pediatr Allergy Immunol* 2006 Feb;17(1): 37–42.
18. Rabinovitch N, Zhang L, Gelfand EW. Urine leukotriene E4 levels are associated with decreased pulmonary function in children with persistent airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Sep; 118(3): 635–40.
19. Green SA, Malice MP, Tanaka W, Tozzi CA, Reiss TF. Increase in urinary leukotriene LTE4 levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax* 2004 Feb; 59(2):100–4.
20. Misso NL, Aggarwal S, Phelps S, Beard R, Thompson PJ. Urinary leukotriene E4 and 9 alpha, 11 beta- prostaglandin F concentrations in mild, moderate and severe asthma, and in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 2004 Apr; 34(4): 624–31.
21. Cai C, Yang J, Hu S, Zhou M, Guo W. Relationship between urinary cysteinyl leukotriene E4 levels and clinical response to antileukotriene treatment in patients with asthma. *Lung* 2007 Mar; 185(2): 105–12.
22. O’Sullivan S, Dahlen B, Dahlen SE, Kumlin M. Increased urinary excretion of the prostaglandin D2 metabolite 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 1996 Aug; 98(2): 421–32.
23. Misso NL, Aggarwal S, Thompson PJ, Vally H. Increases in urinary 9alpha,11beta-prostaglandin f2 indicate mast cell activation in wine-induced asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(2): 127–32.
24. Goto T, Morioka J, Inamura H, Yano M, Kodaira K, Igarashi Y, et al. Urinary eosinophil-derived neurotoxin concentrations in patients with atopic dermatitis: a useful clinical marker for disease activity. *Allergol Int* 2007 Dec; 56(4): 433–8.
25. Oymar K, Aksnes L. Increased levels of urinary leukotriene E4 in children with severe atopic eczema/dermatitis syndrome. *Allergy* 2005 Jan; 60(1): 86–9.
26. Ono E, Taniguchi M, Mita H, Fukutomi Y, Higashi N, Miyazaki E, et al. Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2009 Jan; 39(1): 72–80.
27. van OJ, Peterson CG, Ahlstedt S, Bengtsson U, Borres MP, Hulthen L, et al. Measurements of eosinophil activation before and after food challenges in adults with food hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140(4): 334–41.