

Towards better diagnosis and monitoring of asthma and cystic fibrosis in children : the value of non-invasive inflammometry

Citation for published version (APA):

Robroeks, C. M. H. H. T. (2010). *Towards better diagnosis and monitoring of asthma and cystic fibrosis in children : the value of non-invasive inflammometry*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2010

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In the introduction (**chapter 1**), we describe problems in childhood asthma and in cystic fibrosis (CF) and the potential additional value of non-invasive inflammometry. There is a major overlap of asthma phenotypes. The relationship between phenotypes, genotypes and responds to treatment is not clear yet. In spite of marked progress in several aspects of asthma management and treatment in the past 30-50 years, worldwide large problems exist with the control of asthma in both adults and children. The consequences of childhood asthma for daily life are huge and comprise respiratory complaints, diminished quality of life, disturbed physical activities, school absence or work absence for the parents, extra visits to a doctor, emergency care visits, and hospital admissions. A CF diagnosis can be made properly by means of a sweat test, however, there is a wide variety of CF phenotypes among individuals with a similar CFTR genotype. Chronic inflammation and infections in CF lung disease results in a progressive decline in lung function and results in irreversible lung damage. Pulmonary CF disease is the major cause of mortality. Available techniques to measure airway inflammation, like broncho-alveolar lavage, induced sputum and lung biopsy, are too invasive to be used in children regularly. In both asthma and CF, lung function parameters and presence of symptoms do not reflect ongoing inflammation in a direct manner and treatment cannot be adjusted based on inflammation activity but only on the consequences of the disease. In the past decade, there has been an increasingly interest in non-invasive measurement of airway inflammation. Non-invasive measurements of chronic airway inflammation by means of inflammatory markers in exhaled breath (condensate) is completely non-invasive, has a 100% success rate in children from the age of 6 years, takes little time, and has the advantage that several parameters can be assessed simultaneously.

By applying non-invasive inflammatory markers in exhaled breath (condensate) in order to monitor children with chronic inflammatory lung diseases like asthma and CF, we hypothesise that there will be an improved level of disease control, a reduced number of exacerbations, less severe exacerbations and, consequently, an increase quality of life in these children.

Section one of this thesis focuses on the methodology of non-invasive inflammometry.

In **chapter 2** we studied the methodology of bronchial and alveolar nitric oxide (NO) measurement assessment in children. These parameters could be of clinical importance for the treatment of asthma, as airway inflammation is more prominent in distal airways of patients with asthma. To discriminate between alveolar and bronchial NO, measurements need to be assessed at various flow rates. The feasibility, linearity and long-term repeatability of NO measurements at four different exhalation flow rates, in 21 children with moderate persistent asthma was studied. Three and six months after the first NO measurement, the tests were repeated. A significant learning effect was present. Feasibil-

ity of NO measurements at these four flow rates increased from 67% to 91% and 95% at the first, second and third visit, respectively. This study showed good feasibility and linearity of NO measurements in asthmatic children of 6 years and over at flow rates between 50mL/sec to 200mL/sec. The long-term reproducibility of alveolar and bronchial NO values during 6 months was moderate.

Chapter 3 and 4 focuses on the methodology of exhaled breath condensate (EBC). Optimal collection and analysis of EBC are prerequisites for standardisation and reproducibility of assessments. In **chapter 3** we aimed to assess reproducibility of EBC volume, hydrogen peroxide, 8-isoprostane and cytokine measurements using different condensers. At four points in time, 30 healthy subjects performed sequential EBC collections randomly using the following four condensers: glass, silicone, EcoScreen[®] (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany) and an optimised glass condenser. The optimised glass condenser yielded significantly more EBC volume. The reproducibility of EBC volume, of the new glass condenser was comparable with EcoScreen[®], but was significantly better compared with silicone and glass. The new condenser was associated with significantly more detections of hydrogen peroxide, 8-isoprostane, and cytokines. Reproducibility of biomarkers was equally variable for all condenser types. In conclusion, significantly more EBC volume and biomarker detections were found using the optimised glass condenser. However, biomarker reproducibility in EBC in healthy adults was not influenced by the type of condenser. EBC is a promising non-invasive method to assess respiratory inflammation in adults and children with lung disease. Especially in pre-school children, condensate collection is hampered by long sampling times because of open-ended collection systems.

In **chapter 4** we aimed to assess the feasibility of condensate collection in pre-school children using a closed glass condenser with breath recirculation system, which also collects the residual non-condensed exhaled breath, and subsequently recirculates it back into the condenser. Condensate was collected before and after breath recirculation in 70 pre-school children with and without recurrent wheeze. Cytokines were measured in 50 μ L samples using ultrasensitive multiplexed liquid bead array. The success rate of condensate collection increased from 64% (without recirculation) to 83% (after breath recirculation), and mean condensate volume from 214 to 465 μ L respectively. Detection of cytokines was successful in 95–100% of samples. Cytokine concentrations before and after breath recirculation were not different ($p > 0.232$). In asthmatic children, only TNF- α concentrations were significantly decreased, compared to non-asthmatics. In pre-school children, the collection of EBC is feasible using a new closed glass condenser with breath recirculation system. This new method may help to assess, non-invasively, cytokine profiles in asthmatic and non-asthmatic pre-school children.

Section two of this thesis focussed on an asthma and CF lung disease diagnosis by means of non-invasive inflammometry.

Inflammatory markers in EBC indicate ongoing inflammation in the lungs and might differentiate between asthma and CF. The objective of **chapter 5** was to assess the presence, concentration, and short-term variability of Th-1 and Th-2 mediated cytokines (interferon- γ , tumour necrosis factor- α , interleukin-10, -5, -4, -2) in EBC of children with asthma, or CF

and healthy controls. In addition, we analysed the discriminating ability of these markers in EBC between children with asthma or CF, and healthy children. In 33 asthmatic children, 12 children with CF and 35 healthy children, EBC was collected with a glass condenser during tidal breathing. Cytokines were measured with flow cytometry. Detections of cytokines in the EBC samples were low. Interleukin-2, -4, interferon- γ and interleukin-10 were detected in respectively 16%, 16%, 11% and 9% of all samples in asthma and CF. In the healthy population, interferon- γ , tumour necrosis factor- α and interleukin-10 were detected in 9%, 14% and 3% respectively. Interleukin-5 and tumour necrosis factor- α were not detected in children with CF, and interleukin-2, -4 and -5 were not detected in healthy children. Cytokine concentrations did not differ significantly between children with asthma or CF. Based on these results we concluded that cytokines can be detected in EBC of children with asthma and CF, however, concentrations found are close to the detection limits of the used assay. These findings emphasize the importance to develop more sensitive techniques for analysis of EBC and to standardise the EBC collection method.

In **chapter 6**, we combined the use of a glass condenser system with a sensitive analytical technique (multiplex immunoassay technology) in order to improve assessments of cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in EBC of children with asthma and healthy controls. Measured markers were 1) cytokines: interleukin1 α , -1 β , -2, -4, -5, -6, -10, -12p70, -13, -18, interferon- γ , tumour necrosis factor- α , 2) chemokines: MIP1 α (CCL3), MIF, eotaxin (CCL11), RANTES (CCL5), IP10 (CXCL10), IL8 (CXCL8), MCP1, and 3) soluble adhesion molecules (sICAM, sVCAM). Sixty children were included: 31 asthmatics (71% atopic), and 29 controls. Detection percentages of cytokines, chemokines and adhesion molecules ranged from 94-100%, except for eotaxin (CCL11) and RANTES (CCL5) (detection rates of 10% and 45% in healthy controls respectively). Intra-subject variability of biomarkers in EBC in the group as a whole ranged from 5.2% to 35.0%. In asthmatics, the levels of cytokines [interleukin-2, -4, -5, -6, -13, interferon- γ], chemokines [MIP1 α (CCL3), MIF, RANTES (CCL5), IP10 (CXCL10), IL8 (CXCL8), MCP1], and adhesion molecules [sICAM, sVCAM] were significantly increased in comparison with controls. This study shows that in EBC, collected with a glass condenser, cytokines, chemokines and adhesion molecules can be detected by means of multiplex immunoassay technology. In addition these data show that these non-invasive markers were elevated in EBC of asthmatics compared to controls.

Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and various solitaire markers in EBC have shown to be significant different between asthma, CF, and controls. However, the ability of these markers to indicate an asthma diagnosis, to assess asthma severity and control, is largely unknown. In **chapter 7.1** we studied the discriminating ability of non-invasive markers considered together between children with asthma and controls, and between levels of asthma control and severity. Assessed inflammatory markers in EBC were nitrite, nitrate, hydrogen peroxide, 8-isoprostane, interferon- γ , tumour necrosis factor- α , interleukin-2, -4, -5, -10, and acidity. 114 Children were included: 64 asthmatics and 50 controls. FeNO, and EBC interferon- γ and interleukin-4 differed significantly between asthma and controls. Multivariate backward logistic regression models demonstrated that interleukin-4 was the only significant indicator of an asthma diagnosis. Asthma control was best assessed by exhaled nitric oxide, 8-isoprostane, interferon- γ and interleukin-4 with a sensitivity of 82% and a specificity of 80%, whereas, FeNO, 8-isoprostane, nitrate and nitrite in condensate

were significant indicators of asthma severity (sensitivity 89%, specificity 72%). The similar study was performed in 48 CF patients and 50 controls (**chapter 7.2**). Interferon- γ and nitrite concentrations were significantly higher, whereas FeNO levels were significantly lower in CF compared to controls. Using multivariate logistic regression models, a diagnosis of CF was significantly indicated by 8-isoprostane, nitrite and interferon- γ (sensitivity 78%, specificity 83%). An exacerbation of CF was significantly indicated by 8-isoprostane and nitrite (sensitivity 40%, specificity 97%). Most indicative biomarkers of CF severity were FeNO, and condensate acidity (sensitivity 96%, specificity 67%). In these cross-sectional studies we demonstrated that non-invasive markers could indicate (exacerbations of) asthma and CF, and severity of the disease in children.

Structural lung changes in CF can be assessed by HRCT imaging of the lungs, and include bronchiectasis, mucus plugging, peribronchial thickening, parenchymal abnormalities and air trapping. HRCT enables visualisation of (small) areas with structural lung changes, even in an early stage. These structural abnormalities may be observed by HRCT imaging, even in the presence of normal lung function parameters and in the absence of pulmonary symptoms. The relationship between lung function on the one hand, structural lung changes as visualized by HRCT scans, and non-invasive IM on the other is yet unclear in CF patients. In **chapter 8** we hypothesized that structural lung changes on HRCT imaging (as a result of long term damage to the lungs by chronic airway infection and inflammation) together with ongoing airway inflammation (as assessed by non-invasive markers) are important determinants of lung function (dynamic as well as static indices) in CF. Data on non-invasive markers (FeNO, and EBC acidity, nitrate, nitrite, 8-isoprostane, hydrogen peroxide, interferon- γ), HRCT imaging, and static and dynamic lung function indices were analyzed in 34 CF patients. HRCT scans were scored in a standardized and validated way, a composite score and component scores were calculated. In general, the correlations between non-invasive markers and structural lung changes, and between IM and lung function were low. Patients with positive sputum *Pseudomonas* cultures had higher EBC nitrite levels and higher parenchymal HRCT subscores than patients with *Pseudomonas*-negative cultures. Multiple linear regression models demonstrated that FVC was significantly predicted by hydrogen peroxide in EBC, and the scores of bronchiectasis and mosaic perfusion. Total lung capacity was significantly predicted by 8-isoprostane, nitrate, hydrogen peroxide in EBC, and the mucous plugging subscore. In this study we show that static and dynamic lung function indices in this CF group were predicted by the combination of non-invasive markers and structural lung changes on HRCT imaging.

In exhaled breath, hundreds of volatile organic compounds (VOCs) can be detected. The integrative analysis of large numbers of VOCs in exhaled breath has the promise to discriminate between various inflammatory conditions of the respiratory tract. In **chapter 9.1 and 9.2** we studied the potential of this novel technique to discriminate asthma and CF from healthy controls. In **chapter 9.1**, breath samples were analysed from 63 children with asthma and 57 healthy controls. Analysis of VOCs was assessed by means of gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (GC-TOF-MS). A total of 945 determined compounds were subjected to discriminant analysis to find those that could discriminate diseased from healthy children. A set of samples from both asthmatic and healthy children was selected to build a model that subsequently was used to predict the asthma or

healthy status of a test group. This way the predictive value of the model could be tested. Discriminant analyses demonstrated that based on 8 VOCs asthmatic and healthy children were correctly classified in 92%, with a sensitivity of 89% and a specificity of 95%. In **chapter 9.2** we investigated whether 'metabolomics' of VOCs could discriminate between CF and controls, and between CF patients with and without *Pseudomonas* colonization. 105 Children (48 CF, 57 controls) were included. By using 22 VOCs, a 100% correct identification of CF patients and controls was possible. With 10 VOCs, 92% of the subjects were correctly classified. The reproducibility of VOC measurements with a one hour interval was very good. Chapter 9.1 and 9.2 show that 'metabolomics' of VOCs in exhaled breath was possible in a reproducible way. This new technique was able to discriminate between children with asthma and controls, and between CF patients and healthy controls. In addition, a good separation could be made between CF patients with or without *Pseudomonas* colonization.

Section three focussed on non-invasive monitoring airway inflammation in asthma and CF.

Extrafine hydrofluoroalkane (HFA) beclomethasone differed from other inhaled corticosteroids by its fine aerosol characteristics. Therefore, extrafine HFA-beclomethasone may be particularly useful for treating peripheral airway inflammation in asthma. The aim of **chapter 10** was to analyse the anti-inflammatory effect of extrafine HFA-beclomethasone compared to fluticasone-DPI (which is 2.2 times more potent) in asthmatic children by means of bronchial and alveolar NO, and inflammatory markers in EBC. In a 6 months cross-over study, 33 children, aged 6-12 years, with moderate persistent asthma, were randomly treated with extrafine HFA-beclomethasone (200 µg daily, autohaler) and fluticasone-DPI (200 µg daily, discus). Primary outcome parameters were: alveolar NO concentration and bronchial NO flux. Secondary outcome parameters were: inflammatory markers in EBC, lung function indices, symptoms, exacerbations, and adverse effects. All parameters were recorded at baseline and after each treatment period. Results show that alveolar NO concentration and bronchial NO flux were comparable after treatment with HFA-beclomethasone and fluticasone-DPI. In addition, inflammatory markers in EBC, lung function indices and symptoms, did not differ between treatments. Patients used less β_2 -agonists during the last 2 weeks of HFA-beclomethasone treatment. Based on this study, we concluded that the anti-inflammatory effect of HFA-beclomethasone and fluticasone-DPI, is similar in children with moderate persistent asthma.

Chapter 11.1 and 11.2 investigate the ability of non-invasive inflammatory markers to predict exacerbations of childhood asthma and CF, respectively. In addition, the time course of changes in exhaled inflammatory markers during exacerbations was studied. The design was a prospective one-year longitudinal study. Regular two-monthly visits to the outpatient clinic were required. In addition to these standard 2 monthly visits, four additional visits were planned during an exacerbation. In asthmatics these visits were planned on day 1, 3, 5 and at the end of the exacerbation. However, additional measurements in CF were planned on day 1, 5, 10 and after clinical stabilisation. The primary outcome measure was the occurrence of an exacerbation. Assessment was made of the presence and severity of pulmonary symptoms, use of medication, and measurements of forced

expiratory volume in one second (FEV₁) using home monitor. To monitor an exacerbation, patients were requested three times per week, using a home monitor, to 1) assess FEV₁ measurements; 2) record medication use; 3) register the presence and severity of pulmonary symptoms. The following independent parameters were assessed during outpatient visits: 1) FeNO, 2) inflammatory markers in EBC: acidity, nitrite, hydrogen peroxide, interleukin-1 α , -5, -13, interferon- γ , 3) lung function indices, 4) control scores. In **chapter 11.1**, 40 children with asthma (aged 6-16 yrs) participated. 38 of the 40 children completed the study. Sixteen children developed exacerbations, of which 10 were moderate and 6 severe. Inflammatory markers in EBC were detected in 85-100% of samples. Univariate Cox regression analysis revealed that condensate acidity, interleukin-5 and asthma control score were significant predictors of asthma exacerbation. Multivariate Cox regression analysis showed that the time until an exacerbation was significantly predicted by the asthma control score and by the level of interleukin-5 in EBC. The Kaplan-Meier survival curve of this multivariate model showed that children with the 10% most optimal values of interleukin-5 and the asthma control score had a more than two times reduced risk of exacerbations in the subsequent year. In **chapter 11.2**, 26 CF patients, aged 6-30 years, were included. 17 Patients experienced a first exacerbation of which 8 demonstrated a second event during the study period. In this study the cystic fibrosis control (cystic fibrosis clinical score) and severity (Shwachman-Kulczycki score) was used. Univariate Anderson-Gill models showed that macrophage inhibiting factor (MIF), tumour necrosis factor- α , interleukin-6, -8 and -10 were significant predictors of an exacerbation of CF. Multivariate analysis demonstrated that MIF was the strongest predictor. The risk of an exacerbation increased to 100% in patients with low MIF levels. Symptoms and lung function indices were not significant predictors. These studies showed that by means of inflammatory markers in EBC, an asthma exacerbation and a pulmonary CF exacerbation could be predicted on average one month before clinical onset.

In similar study designs as described in chapter 11.1 and 11.2, we studied whether VOCs are able to predict an asthma and pulmonary CF exacerbation reliably in **chapter 12.1 and 12.2**, respectively. In addition, the chemical background of the most predicting VOCs was studied. In **chapter 12.1**, 16 of the 40 included children with asthma experienced an exacerbation, of which 3 had a second event during the study. With support vector machine analysis, the most optimal model of baseline measurements versus exacerbation within patients was based on 6 VOCs (correct classification 96%, sensitivity 100%, specificity 93%). The model of baseline values of patients with an exacerbation compared to levels of patients without an exacerbation consisted of 7 VOCs (correct classification 91%, sensitivity 79%, specificity 100%). All VOCs were identified as hydrocarbons. In **chapter 12.2**, 17 of the 26 included CF patients experienced an exacerbation of which 8 experienced a second event during the study. The occurrence of 18 VOCs was significantly different in samples of exhaled breath obtained 3-8 weeks prior to exacerbation compared to samples obtained during an exacerbation (intra-subject). A support vector machine classifier based on this dataset contained 6 VOCs and classified 94% of exacerbations (sensitivity 94%, specificity 95%). In addition, 15 VOCs were differentially present in exhaled breath from patients not having an exacerbation versus patients suffering an exacerbation event within 3-8 weeks after sampling, indicating that these VOCs might predict an exacerbation (inter-subject). A support vector machine classifier based on this dataset contained 8 VOCs and

classified 92% of exacerbations (sensitivity 100%, specificity 84%). The VOCs with predictive value of a CF exacerbation, were mainly long chain hydrocarbons. These studies shows that VOCs in exhaled breath are able to indicate CF exacerbations weeks before these adverse events are clinically manifest.

Chapter 13 includes a general discussion including directions for future research. The paradox in daily practice is that although chronic airway inflammation is the hallmark of asthma and CF, methods to evaluate this inflammation are not routinely involved in the diagnosis and management of these diseases. In the past decade, the number of scientific reports on non-invasive inflammometry increased exponentially. Different forms of breath analysis are possible: 1) measurement of FeNO; 2) analysis of biomarkers in EBC; 3) assessment of VOCs. This thesis shows that breath analysis may be of help in the diagnosis and monitoring of chronic inflammatory airway diseases in children. When methodological issues are further clarified, analyses of exhaled breath is a promising tool for the diagnosis and monitoring of children with asthma and CF, which should be applied in addition to conventional parameters, like symptoms, physical examination and lung function indices. Future studies are needed to investigate which (combination of) markers of breath analysis are most helpful for answering everyday clinical questions for a specific disease.

Samenvatting

In de introductie (hoofdstuk 1) hebben we de klinische problemen bij astma en cystic fibrosis (CF) op de kinderleeftijd beschreven en de mogelijk aanvullende waarde van het meten van inflammatoire stoffen in de uitademingslucht (niet-invasieve inflammometrie). Er is een grote overlap tussen de verschillende fenotypen van astma. De relatie tussen fenotype, genotype en reactie op behandeling is nog niet volledig bekend. Wereldwijd blijkt zowel bij kinderen als bij volwassenen met astma ondanks evidence-based behandelrichtlijnen, nog steeds onvoldoende controle van de ziekte te bestaan. De gevolgen van astma op kinderleeftijd in het dagelijks leven zijn groot zijn wat geïllustreerd wordt door, afgenomen kwaliteit van leven, verstoorde lichamelijke activiteiten, schoolverzuim en ziekteverlof van de ouders, extra poliklinische- en extra eerste hulp bezoeken alsmede ziekenhuis opnamen. CF kan goed worden gediagnosticeerd met behulp van een zweettest. Er bestaat echter een grote variëteit van fenotypen bij eenzelfde genotype. De chronische luchtwegontsteking en infecties bij CF resulteren in een progressieve afname van de longfunctie en heeft irreversibele longschade tot gevolg. De chronische longziekte is verantwoordelijk voor de hoge mortaliteit bij CF patiënten.

Bij zowel astma en CF zijn longfunctietesten en ziekte symptomen niet toereikend om een goed luchtwegontsteking weer te geven. De huidige technieken om luchtwegontsteking te meten, zoals de broncho-alveolaire lavage, geïnduceerd sputum en de longbiopsie, zijn dusdanig invasief voor kinderen dat ze niet voor routinematig gebruik geschikt zijn. Zodoende kan er niet gericht behandeld worden op geleide van ontstekingsactiviteit maar slechts op de gevolgen ervan. Het afgelopen decennium is er toenemend belangstelling ontstaan voor het meten van luchtwegontsteking op een niet-invasieve wijze. Luchtwegcondensaat (EBC) wordt verkregen door uitademingslucht af te koelen. Hierin zijn voornamelijk niet-vluchtige stoffen aanwezig. Door uitademingslucht op te vangen kunnen vluchtige stoffen (vluchtige organische componenten, VOCs) gemeten worden. Het meten van chronische luchtwegontsteking door middel van ontstekingsmarkers in uitademingslucht (condensaat), is niet-invasief, heeft een hoge succes percentage bij kinderen vanaf 6 jaar, is snel uit te voeren en heeft het voordeel dat meerdere parameters simultaan verkregen worden.

De hypothese van dit proefschrift is dat het meten van ontstekingsstoffen in uitademingslucht bij kinderen met astma en CF leidt tot een betere diagnostiek en monitoring van deze ziektebeelden wat op termijn zal leiden tot een toename van de kwaliteit van leven bij kinderen met astma en CF.

Het eerste deel van dit proefschrift (sectie 1) richt zich op de methodologie van niet-invasieve inflammometrie.

In **hoofdstuk 2** wordt de methodologie van bronchiaal en alveolair stikstofmonoxide (NO) metingen bij kinderen bestudeerd. Deze parameters kunnen van klinische betekenis zijn

bij de behandeling van astma aangezien luchtwegontsteking zich met name presenteert in de distale luchtwegen. Om onderscheid te maken tussen alveolair en bronchiaal NO is het noodzakelijk om metingen bij verschillende uitademingssnelheden uit te voeren. De toepasbaarheid, lineariteit en de lange termijn reproduceerbaarheid van NO metingen bij kinderen zijn bij vier verschillende uitademingssnelheden onderzocht. In deze studie zijn 21 kinderen met matig ernstig astma tussen de 6 en 12 jaar oud geïnccludeerd. Drie en zes maanden na de eerste NO metingen werden de testen herhaald. Er werd een significant leereffect gezien. De toepasbaarheid van NO metingen met verschillende uitademingssnelheden (20mL/sec, 50mL/sec, 100mL/sec, 200mL/sec) verbeterde van 67% naar 91% en 95% bij respectievelijk het eerste, tweede en derde bezoek. Deze studie laat een goede toepasbaarheid en lineariteit van NO metingen zien bij kinderen met astma vanaf de leeftijd van 6 jaar bij verschillende uitademingssnelheden. De lange termijn reproduceerbaarheid van alveolair en bronchiaal NO gedurende 6 maanden was redelijk.

De hoofdstukken 3 en 4 richten zich op de verbetering van de methodologie van EBC. Een gestandaardiseerde verzamelmethode en analyse methode van EBC zijn essentieel voor een goede reproduceerbaarheid. In **hoofdstuk 3** was het doel te onderzoeken of toepassing van een geoptimaliseerde glazen condensor gepaard ging met een groter condensaat volume en hogere concentraties van waterstofperoxide, 8-isoprostaan en cytokines in EBC, en een betere reproduceerbaarheid van biomarkers in vergelijking met andere condensoren. Bij 30 gezonde vrijwilligers is op vier tijdstippen met vier verschillende condensoren EBC verzameld in willekeurige volgorde: glas, silicone, EcoScreen® (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Duitsland) en met een nieuwe geoptimaliseerde glazen condensor. De resultaten lieten zien dat met de geoptimaliseerde condensor een significant hoger EBC volume werd verzameld. De reproduceerbaarheid van het EBC volume van de nieuwe glazen condensor was vergelijkbaar met die van de EcoScreen® maar was significant beter dan de reproduceerbaarheid van de siliconen en glazen condensoren. Daarnaast was met de nieuwe condensor het percentage EBC samples waarin waterstofperoxide, 8-isoprostaan en cytokines gedetecteerd werd hoger. De reproduceerbaarheid van verschillende biomarkers in condensaat was vergelijkbaar tussen alle gebruikte condensoren. Concluderend, met de nieuwe geoptimaliseerde glazen condensor werden significant hogere volumes EBC verzameld en was er een hoger percentage detecties van biomarkers. Er was geen invloed van de condensor op de reproduceerbaarheid van EBC biomarkers.

EBC is een veelbelovende niet-invasieve methode om luchtwegontsteking bij kinderen en volwassenen met een longziekte te kunnen meten. Echter, met name bij jonge kinderen (<4 jaar), is het moeilijk condensaat te verzamelen in verband met de verzamelduur met open systemen waarbij uitademingslucht kan ontsnappen. In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar de toepasbaarheid van EBC verzameling bij kinderen onder de 4 jaar met een geoptimaliseerde glazen condensor in combinatie met een gesloten recirculatie systeem. Met deze nieuwe toepassing wordt de waterdamp in de uitademingslucht nagenoeg volledig gecondenseerd. Hierdoor wordt sneller een bepaalde hoeveelheid condensaat volume verkregen waardoor de tijd van verzamelen/verzamelduur aanzienlijk bekort kan worden. Condensaat werd verzameld voor en na recirculatie bij 70 jonge kinderen met en zonder luchtwegklachten van piepen. De concentratie van cytokines werden gemeten met behulp van ultragevoelige 'multiplexed liquid bead array' methode. Het succes-percentage van condensaatverzameling nam door de recirculatie significant toe van 64% (zonder re-

circulatie) naar 83% (met recirculatie). Het gemiddelde EBC volume nam door recirculatie toe van 214 μ L naar 465 μ L. Detectie van cytokines was succesvol in 95-100% van de EBC samples. De concentraties van cytokines waren niet significant verschillend voor en na recirculatie ($p > 0.232$). Bij kinderen met piepen waren tumor necrosis factor (TNF)- α concentraties significant lager in vergelijking met kinderen zonder klachten. Concluderend is de verzameling van EBC bij jonge kinderen toepasbaar door gebruikt te maken van de aangepaste glazen condensor met een gesloten systeem en recirculatie. Deze nieuwe methode maakt het mogelijk om niet-invasief verkregen cytokine profielen te bepalen bij jonge kinderen (< 4 jaar) met en zonder luchtwegklachten.

Het tweede deel van dit proefschrift (sectie 2) richt zich op de diagnostiek van astma en CF met behulp van niet-invasieve inflammometrie.

De hypothese van dit deel van het proefschrift was dat ontstekingsmarkers in EBC de aanwezige luchtweginflammatie weergeven en kunnen differentiëren tussen astma en CF. Het doel van **hoofdstuk 5** was om de aanwezigheid, concentratie en de korte termijn reproducteerbaarheid van Th-1 en Th-2 gemedieerde cytokines (interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukine-10, -5, -4, -2) in EBC van kinderen met astma, CF en van gezonde kinderen, te bestuderen. Daarnaast hebben we de discriminerende waarde van deze cytokines bij kinderen met astma, CF en gezonden geanalyseerd. In 33 kinderen met astma, 12 kinderen met CF, en in 35 gezonde kinderen is EBC verzameld tijdens rustademhaling met een glazen condensor. De cytokines werden gemeten met behulp van flow cytometry. De detectie van cytokines in EBC was erg laag. Interleukine-2, -4, interferon- γ en interleukine-10 zijn gedetecteerd in respectievelijk 16%, 16%, 11% en 9% van de condensaat samples. In de gezonde populatie werden interferon- γ , tumor necrosis factor- α en interleukine-10 gedetecteerd in respectievelijk 9%, 14% en 3% van de samples. Interleukine-5 en tumor necrosis factor- α werden niet gevonden bij kinderen met CF, en interleukine-2, -4 en -5 werden niet gedetecteerd in de gezonde populatie. Ook was er geen verschil in cytokine concentraties tussen kinderen met astma en CF. Op basis van deze resultaten kunnen we concluderen dat cytokines gedetecteerd kunnen worden in EBC van kinderen met astma en CF. Echter, concentraties zijn dicht bij de detectielimieten van de gebruikte analyse techniek. Deze resultaten bevestigen het belang van meer gevoelige analyse technieken van EBC..

Om de betrouwbaarheid van metingen van cytokines, chemokines en oplosbare adhesie moleculen in EBC bij kinderen met astma en bij gezonde kinderen te optimaliseren hebben we in **hoofdstuk 6** een combinatie gebruikt van een glazen condensor systeem en een zeer gevoelige analyse techniek (multiplex immunoassay technologie). Markers die werden bepaald zijn: 1) cytokines: interleukine-1 α , -1 β , -2, -4, -5, -6, -10, -12p70, -13, -18, interferon- γ , tumor necrosis factor- α , 2) chemokines: MIP1 α (CCL3), MIF, eotaxin (CCL11), RANTES (CCL5), IP10 (CXCL10), IL8 (CXCL8), MCP1, en 3) oplosbare adhesie moleculen (sICAM, sVCAM).

Zestig kinderen werden in de studie geïncludeerd: 31 met astma (71% atopisch), en 29 gezonde controles. Het percentage positieve detecties van de biomarkers varieerde van 94-100%, met uitzondering van eotaxin (CCL11) en RANTES (CCL5) (10% en 45% bij gezonden respectievelijk). De variatie van biomarkers binnen personen bedroeg 5,2% tot 35.0%. Bij kinderen met astma, waren de concentraties van cytokines [interleukine-2, -4, -5, -6, -13, interferon- γ], chemokines [MIP1 α (CCL3), MIF, RANTES (CCL5), IP10 (CXCL10), IL8 (CXCL8),

MCP1], en adhesie moleculen [sICAM, sVCAM] significant hoger in vergelijking met de gezonde populatie. Deze studie laat zien dat in EBC, verzameld met een glazen condensor, cytokines, chemokines en adhesie moleculen gedetecteerd kunnen worden met behulp van multiplex immunoassay technologie. Daarnaast werden ook hogere concentraties van ontstekingsstoffen gevonden bij kinderen met astma ten opzichte van gezonde controles.

Gefractioneerd uitgeademde stikstofmonoxide (FeNO) en verschillende markers in EBC zijn significant verschillend tussen patiënten met astma, CF en gezonde controles. Desondanks, is het onduidelijk welke plaats deze markers hebben bij diagnose stelling van astma en CF en bij de bepaling van de ernst en de mate van controle van deze ziekten. In **hoofdstuk 7.1** is de waarde van combinaties van niet-invasieve makers geanalyseerd om onderscheid te kunnen maken tussen kinderen met astma en gezonde controles, en tussen patiënten met wisselende mate van ernst en ziekte controle. In EBC werden nitriet, nitraat, waterstofperoxide, 8-isopropaan, interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukine-2,-4,-5,-10, en de zuurgraad(pH) gemeten. 114 Kinderen werden geïncludeerd: 64 astma en 50 gezonde controles. FeNO, en interferon- γ en interleukine-4 in condensaat waren significant verschillend tussen astma en controles. Multivariate 'backward' logistische regressie modellen lieten zien dat interleukine-4 de enige significante marker was voor een astma diagnose. De mate van astmacontrole werd voorspeld door FeNO, 8-isopropaan, interferon- γ en interleukine-4 (sensitiviteit 82%, specificiteit 80%). Voorspelers voor de ernst van astma waren FeNO, 8-isopropaan, nitraat en nitriet (sensitiviteit 89%, specificiteit 72%).

Een vergelijkbare studie werd uitgevoerd bij 48 patiënten met CF en 50 gezonde controles (**hoofdstuk 7.2**). Concentraties van interferon- γ en nitriet in EBC waren significant hoger terwijl FeNO waarden significant verlaagd waren bij kinderen met CF in vergelijking met de gezonden. Multivariaat logistische regressie analyse liet zien dat een CF diagnose significant werd weergegeven door 8-isopropaan, nitriet en interferon- γ in EBC (sensitiviteit 78%, specificiteit 83%). Een exacerbatie van CF longziekte werd significant weergegeven door 8-isopropaan en nitriet (sensitiviteit 40%, specificiteit 97%), en ernst van CF longziekte door FeNO en EBC zuurgraad (sensitiviteit 96%, specificiteit 67%). In deze cross-sectionele studies hebben we aangetoond dat verschillende combinaties van biomarkers astma, CF, en de mate van ziekte controle en ziekte ernst kunnen weergeven.

Structurele longafwijkingen bij CF kunnen goed gezien worden op hoog resolutie computer tomografie (HRCT) scans. Er kan onder andere onderscheid worden gemaakt tussen bronchiectasiën, mucus plugging, peribronchiale verdikking, parenchym afwijkingen en air trapping. Deze afwijkingen zijn in een vroege fase al zichtbaar. Longfunctie parameters kunnen in die fase nog normaal zijn en de patiënt kan nog symptoomvrij zijn. De relatie tussen longfunctie, structurele longafwijkingen en niet-invasieve markers in CF is nog niet bekend. **Hoofdstuk 8** had als hypothese dat structurele longafwijkingen (als gevolg van chronisch inflammatie en infecties) en luchtweginflammatie (vastgesteld met niet-invasieve biomarkers) belangrijke voorspellende factoren zijn voor de longfunctie in CF. In 34 patiënten met CF zijn HRCT scans, niet-invasieve markers (FeNO, en EBC-pH, nitraat, nitriet, 8-isopropaan, waterstofperoxide, interferon- γ), en statistische en dynamische longfunctiewaarden geanalyseerd. HRCT scans zijn op een gestandaardiseerde en gevalideerde wijze bekeken. Over het algemeen waren correlaties tussen niet-invasieve mar-

kers, structurele longschade en biomarkers laag. Patiënten met *Pseudomonas* in het sputum hadden hogere nitriet waarden en meer parenchym afwijkingen in vergelijking met CF patiënten zonder positieve sputumkweek met *Pseudomonas*. Multiële lineaire regressie modellen lieten zien dat de geforceerde vitale capaciteit (FVC), significant voorspeld werd door waterstofperoxide in EBC, en de mate van bronchiectasiën en mosaïc perfusie op de CT scan. De totale long capaciteit werd significant voorspeld door 8-isopropaan, nitraat, waterstofperoxide in EBC en mucus pluggen op de CT scan. Concluderend, laat deze studie zien dat longfunctie waarden werden voorspeld door een combinatie van (niet-invasieve) onstekingsmarkers en structurele longafwijkingen op de HRCT scans.

Bij inflammatie bestaat er een dysbalans tussen oxidanten en anti-oxidanten (oxidatieve stress). Dit leidt tot meer lipide peroxidatie. Dit proces kan de membraanfunctie verstoren, membraan gebonden receptoren en enzymen inactiveren, en de permeabiliteit verhogen. Ook kan het reageren met antioxidanten of decomposeren na een reactie met metaal ionen (zoals ijzer en koper). De hierbij vrijkomende (bij)producten kunnen als VOCs in de uitademings lucht worden gedetecteerd.

Het analyseren van deze VOCs is een nieuwe veelbelovende techniek waarmee mogelijk verschillende inflammatoire longziekten kunnen worden gediscrimineerd. In **hoofdstukken 9.1 en 9.2** zijn de mogelijkheden van deze techniek geanalyseerd om kinderen met, respectievelijk, astma en CF te onderscheiden van gezonde kinderen. In **hoofdstuk 9.1**, werden VOC profielen van 63 kinderen met astma en 57 gezonde controles bestudeerd. Analyse van uitgeademde lucht werd verricht met behulp van een gas chromatograaf - time of flight- massa spectrometer (GC-TOF-MS). In totaal zijn 945 VOCs gebruikt in een discriminant analyse. Deze analyse liet zien dat op basis van 8 VOCs kinderen met astma en gezonde controles konden worden onderscheiden met een correcte classificatie van 92%, een sensitiviteit van 89% en een specificiteit van 95%. In **hoofdstuk 9.2** hebben we onderzocht of 'metabolomics' van VOCs kon discrimineren tussen CF en gezonden, en tussen CF patiënten met en zonder positieve sputumkweek met *Pseudomonas*. Er werden 105 kinderen (48 CF, 57 controles) geïncubeerd. Met 22 VOCs kon een 100% correcte classificatie worden gemaakt. Met 10 VOCs, was dit in 92% van de kinderen het geval. De reproduceerbaarheid van VOCs in uitgeademde lucht na een uur was goed (gemiddelde match factor tussen de profielen van 0.9). Samenvattend laten hoofdstukken 9.1 en 9.2 zien dat 'metabolomics' van VOCs in uitgeademde lucht mogelijk is en een goede reproduceerbaarheid heeft. Deze nieuwe techniek kan kinderen met astma of CF onderscheiden van gezonden. Daarnaast kan met deze techniek ook een scheiding gemaakt worden tussen CF patiënten met en zonder positieve sputum kweek met *Pseudomonas*.

Deel 3 van dit proefschrift richt zich op het niet-invasief monitoren van luchtweginflammatie bij astma en CF.

Extrafijn hydrofluoroalkaan (HFA) beclomethason verschilt van andere inhalatie corticosteroiden door de kleine aerosol deeltjes welke diep in de perifere luchtwegen kunnen doordringen. Daarom wordt extrafijn HFA-beclomethason met name gebruikt om perifere luchtweginflammatie bij astma te behandelen. Het doel van **hoofdstuk 10** was om het anti-inflammatoire effect van extrafijn HFA-beclomethason te vergelijken met fluticason-DPI (wat een minder gunstige deeltjes grootte heeft maar wel 2,2 maal zo potent is) bij kinderen met astma aan de hand van bronchiaal en alveolair NO en inflammatoire mar-

kers in EBC. In een prospectieve, longitudinale cross-over studie werden 33 kinderen in de leeftijd van 6 tot 12 jaar met matig ernstig astma afwisselend gedurende 3 maanden behandeld met extrafijn HFA-beclomethason (200 µg dagelijks, autohaler) en 3 maanden met fluticason-DPI (200 µg dagelijks, diskus). De primaire uitkomstparameters waren: alveolaire NO concentratie en bronchiale NO-flux. De secundaire uitkomstparameters waren inflammatoire markers in EBC, longfunctiewaarden, symptomen, exacerbaties en bijwerkingen. Alle parameters werden gemeten bij aanvang van de studie en na elke behandelperiode. De resultaten lieten zien dat alveolair en bronchiaal NO vergelijkbaar waren na de verschillende behandelingen. Ook was er geen verschil in inflammatoire markers in EBC, longfunctiewaarden en symptomen. Tijdens de laatste 2 weken van de behandeling met extrafijn HFA-beclomethason gebruikten patiënten minder β_2 -agonisten. Gebaseerd op deze studie concluderen we dat het anti-inflammatoire effect van extrafijn HFA-beclomethason en fluticason-DPI in bovengenoemde doseringen vergelijkbaar is bij kinderen met matig ernstig astma.

In de **hoofdstukken 11.1 en 11.2** werd de waarde onderzocht van niet-invasieve inflammetrie om exacerbaties van respectievelijk astma en CF te voorspellen. Ook is er gekeken naar het tijdsverloop van inflammatoire markers tijdens exacerbaties. Tijdens deze prospectieve, longitudinale studies gedurende 1 jaar, waren er twee maandelijkse reguliere controles op de polikliniek. Daarnaast werden er 4 extra bezoeken gepland tijdens een exacerbatie. Bij astma werd dit gepland op dag 1, 3, 5 en aan het eind van de exacerbatie. Bij CF werden deze afspraken gepland op dag 1, 5, 10 en na klinische stabilisatie. De primaire uitkomstparameter was het vóórkomen van een exacerbatie. Met behulp van een thuismonitor, werden driemaal per week de aanwezigheid, de ernst van luchtweg klachten, het medicatiegebruik en een flow-volume curve vastgelegd om een exacerbatie vroegtijdig en betrouwbaar vast te stellen. De volgende onafhankelijke parameters werden gemeten tijdens bezoeken op de polikliniek: FeNO, EBC-pH, nitriet, waterstofperoxide, interleukine-1 α , -5, -13, interferon- γ , longfuncties en vragenlijsten. **Hoofdstuk 11.1** beschrijft de resultaten van deze studie bij 40 kinderen met astma (6-16 jaar) In totaal hebben 38 van de 40 kinderen de studie afgerond. Er waren 16 kinderen die een exacerbatie doormaakten. Inflammatoire markers in EBC werden gedetecteerd in 85-100% van de samples. Univariate Cox regressie analyse liet zien dat EBC pH, interleukine-5 en de astma controle-score significante voorspellers waren voor een astma exacerbatie. Een multivariate Cox regressie analyse toonde aan dat de tijd tot het voorkomen van een exacerbatie significant voorspeld werd door de astma control score en het EBC interleukine-5. De Kaplan-Meier overlevingscurve van dit multivariate model liet zien dat kinderen met de 10% meest optimale waarden van IL-5 en astma control score, een meer dan twee keer zo laag risico hebben op het ontwikkelen van een exacerbatie in het volgende jaar.

In **hoofdstuk 11.2** werden 26 patiënten met CF (6-30 jaar) geïncludeerd. 17 Patiënten ontwikkelden een exacerbatie. Hiervan kregen 8 patiënten tevens een tweede exacerbatie. In deze studie zijn CF controle (cystic fibrosis clinical score) en ernst (Shwachman-Kulczycki score) scorelijsten gebruikt. In verband met het frequent voorkomen van herhaalde exacerbaties werd survival-analyse voor recurrent events (Anderson-Gill models) toegepast. De univariate analyses toonden aan dat macrophage inhibiting factor (MIF), tumor necrosis factor- α , interleukine-6, -8 en -10 significante voorspellers waren van een CF exacerbatie. Uit de multivariate analyse bleek dat MIF de sterkste voorspeller was. Het

risico op het krijgen van een exacerbatie liep op tot 100% bij patiënten met lage MIF concentraties. Symptomen en longfunctie waren geen significante voorspellers. Samenvattend tonen deze studies dat met behulp van niet-invasieve inflammatoire markers in EBC een astma en CF exacerbatie kunnen worden voorspeld, gemiddeld een maand voordat een exacerbatie klinisch manifest werd.

In vergelijkbare studies hebben we in **hoofdstukken 12.1 en 12.2** de voorspellende waarde van VOCs in uitademingslucht onderzocht. In deze studies werd ook de chemische achtergrond van de meest voorspellende VOCs geanalyseerd. In **hoofdstuk 12.1** hadden 16 patiënten van de 40 geïncludeerde kinderen met astma een exacerbatie. Drie van deze kinderen maakten een tweede exacerbatie door. Op basis van 6 VOCs konden exacerbaties van stabiele ziekten correct worden geclassificeerd in 96% van de gevallen. Met support vector machine analyse, bestond het meest optimale model, bij de vergelijking tussen metingen tijdens een stabiele fase versus metingen voorafgaande aan een exacerbatie, uit 6 VOCs (correcte classificatie 96%, sensitiviteit 100%, specificiteit 93%). Het model op basis van metingen van patiënten zonder een exacerbatie en metingen voorafgaande aan een exacerbatie, bestond uit VOCs (correcte classificatie 91%, sensitiviteit 79%, specificiteit 100%). Alle VOCs werden geïdentificeerd als koolwaterstoffen. In **hoofdstuk 12.2** maakten 17 van de 26 geïncludeerde CF patiënten een exacerbatie door. Hiervan hadden 8 patiënten een 2e exacerbatie tijdens de studie. Het voorkomen van 18 VOCs waren significant verschillend tussen samples van 3-8 weken voor het ontstaan van de exacerbatie ten opzichte van tijdens de exacerbatie (binnen personen vergelijk). Met behulp van support vector machine analyse was er op basis van 6 VOCs een correcte classificatie van deze binnen patiënt vergelijking mogelijk in 94% (sensitiviteit 94%, specificiteit 95%). Daarnaast waren er 15 VOCs significant verschillend tussen patiënten die geen exacerbatie hebben gehad tijdens de studie en patiënten met een exacerbatie (tussen personen vergelijk). Analyse van deze dataset liet zien dat met 8 VOCs 92% van de exacerbaties goed kon worden geclassificeerd (sensitiviteit 100%, specificiteit 84%). De VOCs met een voorspellende waarde voor een CF exacerbatie waren met name lange keten koolwaterstoffen. Samenvattend laat deze studie zien dat VOCs in uitgeademde lucht een CF exacerbatie enkele weken voordat deze klinisch manifest is voorspeld.

Hoofdstuk 13 bevat een algemene discussie inclusief mogelijkheden voor toekomstig onderzoek. De paradox in de dagelijkse praktijk is, dat hoewel chronische luchtweginflammatie in de pathofysiologie van astma en CF centraal staat, deze ontsteking niet routinematig gemeten wordt. In het laatste decennium is het aantal publicaties betreffende niet-invasieve inflammometrie exponentieel gestegen. Verschillende methoden van uitgeademde lucht analyse zijn mogelijk: 1) metingen van FeNO, 2) analyse van biomarkers in EBC, 3) metingen van VOCs in uitgeademde lucht. Dit proefschrift laat zien dat uitgeademde luchtweganalyse een goede aanvulling kan zijn op conventionele parameters zoals symptomen, lichamelijk onderzoek en longfunctie bij de diagnostiek en monitoring van kinderen met astma en CF. Toekomstige studies zijn nodig om te onderzoeken welke (combinatie van) markers van uitgeademde lucht het meest waardevol zijn in de dagelijkse praktijk bij een specifieke ziekte en vraagstelling (b.v. diagnostiek versus monitoring).