

From infant wheeze to childhood asthma : aetiological factors and early diagnostic techniques

Citation for published version (APA):

Klaassen, E. M. M. (2013). *From infant wheeze to childhood asthma : aetiological factors and early diagnostic techniques*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2013

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

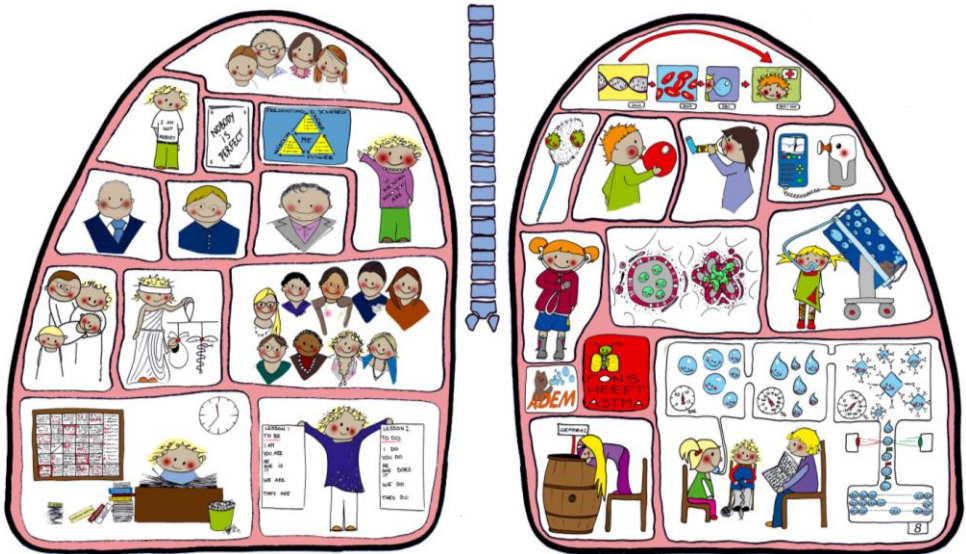
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

From Infant wheeze to childhood asthma

Aetiological factors and early diagnostic techniques



Ester Klaassen

Samenvatting

In dit proefschrift wordt de genetische achtergrond, invloed van bacteriële kolonisatie en regulatoire T-cellen (T_{reg} cellen) in de etiologie van astma bij kinderen op peuterleeftijd geëvalueerd. Daarnaast wordt de waarde van uitgeademde ontstekingsmarkers, expressie van ontstekingsgenen, vroege longfunctiemetingen en reactie op behandeling voor het vaststellen van astma op de peuterleeftijd onderzocht. Dit proefschrift beschrijft de resultaten van de ADEM studie (in het Engels: Asthma DEtection and Monitoring study).

In **hoofdstuk 1** worden de klinische uitdagingen van astma bij kinderen geïntroduceerd. Ondanks het feit, dat astma de meest voorkomende chronische ziekte op kinderleeftijd is, blijft het vaststellen van een astmadiagnose op peuterleeftijd moeilijk. Daardoor hebben artsen een dagelijks dilemma hoe om te gaan met kinderen met luchtwegklachten. Een betrouwbaar diagnostisch instrument dat op peuterleeftijd kan differentiëren tussen kinderen die astma zullen ontwikkelen en kinderen met voorbijgaande klachten, is dus noodzakelijk. Mogelijke niet-invasieve diagnostische middelen zijn de beoordeling van (uitgeademde) ontstekingsmarkers en vroege longfunctiemetingen. Naast het diagnostisch probleem is het onderliggende mechanisme van astma bij kinderen nog steeds grotendeels onbekend. Inzicht in dit mechanisme zou kunnen leiden tot identificatie van kinderen met een verhoogd risico. Het onderliggende mechanisme van astma bij kinderen kan worden bestudeerd door genetische aanleg en invloed van omgevingsfactoren te bestuderen. Als kinderen met een verhoogd risico kunnen worden geïdentificeerd, zouden eventueel preventieve maatregelen kunnen worden toegepast, die mogelijk de ontwikkeling van astma voorkomen.

In **hoofdstuk 2** wordt het protocol van de ADEM studie beschreven. De ADEM studie is een prospectieve studie, die in 2006 op de afdeling kinderlongziekten van het Maastricht Universitair Medisch Centrum (MUMC+) is gestart. In totaal zijn er 202 kinderen op twee tot vierjarige leeftijd met recidiverende episodes van piepen/zagen op de borst en 50 kinderen zonder piepen/zagen op de borst geïncludeerd. Vervolgens zijn deze kinderen tot zesjarige leeftijd gevolgd. Het primaire doel van de ADEM studie is om een vroege astmadiagnose te stellen door gebruik te maken van ontstekingsstoffen en vroege longfunctiemetingen. Daarnaast zijn mogelijke etiologische factoren onderzocht in relatie tot de vroege ontwikkeling van astma zoals genetische polymorfismen, bacteriële kolonisatie in de luchtwegen en T_{reg} cellen op peuterleeftijd.

Ondanks het feit dat het algemeen geaccepteerd is, dat interactie tussen genetische aanleg en omgevingsinvloeden belangrijk is voor de ontwikkeling van astma bij

kinderen, zijn de exacte mechanismen nog grotendeels onbekend. Om meer inzicht in dit complexe proces te verkrijgen, wordt in **hoofdstuk 3** de rol van CD14 en toll-like receptoren (TLRs) in relatie tot de ontwikkeling van astma bij blanke kinderen systematisch onderzocht. Er wordt geen duidelijk rol voor CD14 en TLRs in relatie tot astma bij kinderen vastgesteld. Echter dit betekent niet per se dat er geen rol is. Onbekende onderliggende omgevingsfactoren, die de relatie tussen CD14 en/of TLRs en bij kinderen met astma beïnvloeden, kunnen bestaande associaties vertroebelen. Dit effect is in een aantal studies aangetoond. Daarnaast beperken de verschillen in studieopzet een juiste interpretatie van de data. Dit probleem kan mogelijk worden opgelost door gebruik te maken van een richtlijn voor het rapporteren van genetische associatiestudies, die momenteel steeds vaker wordt gebruikt. Tenslotte is de bijdrage gebaseerd op individuele genetische varianten klein en daardoor moeilijk vast te stellen. Het gebruik van haplotypering (het effect van meerdere genetische varianten in combinatie bestuderen) geeft ons meer mogelijkheden om relaties met astma bij kinderen vast te stellen.

In **hoofdstuk 4** bestuderen we de invloed van genetische varianten in *CD14* en *TLRs* (*TLR2*, *TLR4*, *TLR5* en *TLR9*) in combinatie met bacteriële kolonisatie en T_{reg} cellen in relatie tot de ontwikkeling van astma bij kinderen. We kunnen geen directe associatie vaststellen tussen genetische varianten in *CD14* en *TLRs* en de ontwikkeling van astma bij kinderen. Ook wordt geen relatie gevonden tussen positieve kweken voor verschillende typische (*Haemophilus (para)influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* en *Staphylococcus aureus*) en atypische (*Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*) bacteriën of voor het percentage T_{reg} cellen op peuterleeftijd en de ontwikkeling van astma. We tonen wel een significante interactie aan tussen genetische varianten in *CD14* en *TLRs* en bacteriële kolonisatie op peuterleeftijd in relatie tot de vroege ontwikkeling van astma bij kinderen. Deze interactie wijst op een verhoogd risico op de ontwikkeling van astma in aanwezigheid van bepaalde genotypes in combinatie met bacteriële kolonisatie. Daarnaast worden significante interacties gevonden tussen bepaalde genotypes in *TLRs* en het percentage van T_{reg} cellen op peuterleeftijd. De interacties wijzen in de richting van een associatie tussen een hoger percentage van T_{reg} cellen op peuterleeftijd, gepaard gaande met een verhoogd risico op astma in aanwezigheid van bepaalde genotypen. Op basis van deze gegevens denken wij dat de combinatie tussen genetische aanleg en bacteriële blootstelling op peuterleeftijd leidt tot een veranderde immunreactie, hetgeen gedemonstreerd wordt door de reactie van T_{reg} cellen, wat vervolgens het risico op astma op zesjarige leeftijd verhoogt.

Om de rol van luchtwegontsteking in relatie tot de ontwikkeling van astma verder te bestuderen, werden verschillende ontstekingsmarkers (interleukine (IL)4, IL8, IL10, IL13, Tumour-Necrosis-Factor alfa (TNF α) en Intercellulair Adhesie Molecuul 1

(ICAM1)) onderzocht in een integrale genetische analyse in **hoofdstuk 5**. In deze analyse werden genetische varianten, genexpressie in witte bloedcellen en eiwitniveau in uitademingslucht bekeken. Een associatie van *ICAM1* rs5498 A-allel met de ontwikkeling van astma werd vastgesteld. Het A-allel is ook geassocieerd met een verhoogde expressie van *ICAM1* mRNA hetgeen vervolgens geassocieerd is met een verhoogde niveau van oplosbaar (s)ICAM1 in uitademingsluchtcondensaat. Daarnaast worden verhoogde sICAM1 en IL4, IL8, IL10 and IL13 niveaus in condensaat geassocieerd met de ontwikkeling van astma. Het onderliggende mechanisme tussen de associatie van het rs5498 polymorfisme in *ICAM1* met de ontwikkeling van astma bij kinderen, is waarschijnlijk gebaseerd op een verhoogde bindingscapaciteit van witte bloedcellen in aanwezigheid van het A-allel. Dit leidt tot een verhoogde hoeveelheid lokale witte bloedcellen, die een verhoogde totale productie van ontstekingsmarkers tot gevolg heeft. Concluderend wijst onze studie naar het belang van *ICAM1* als een marker van en mogelijk de betrokkenheid van *ICAM1* in de ontwikkeling van astma.

Vastgesteld is, dat voorbijgaande luchtwegklachten en astma geassocieerd zijn met verschillende genen. In **hoofdstuk 6** bestuderen we daarom meerdere genetische varianten in astmagenen bij kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma op zesjarige leeftijd. De gevonden associaties in de ADEM studie hebben we geprobeerd te herhalen in een onafhankelijk geboortecohort, genaamd de KOALA studie (Kind, Ouders en gezondheid: Aandacht voor Leefstijl en Aanleg). We hebben kunnen vaststellen in de ADEM studie dat genetische varianten in *ADAM33* (rs511898 en rs528557), *IL4* (rs2070874 en rs2244350) en *ORMDL3* (rs7216389) geassocieerd zijn met de ontwikkeling van astma. De gevonden negatieve associatie voor het CG/GG-genotype van *ADAM33* in relatie tot astma bij kinderen werd door ons ook aangetoond in het KOALA geboortecohort. Concluderend bevestigt onze studie de relatie van *ADAM33* met astma bij kinderen bij kinderen met recidiverend piepen/zagen op de borst.

Het is bekend dat inhalatiecorticosteroiden (ICS) effectief zijn bij kinderen met astma en minder effectief bij kinderen met voorbijgaande luchtwegklachten. De reactie op de behandeling met ICS op peuterleeftijd kan daarom mogelijk worden gebruikt als middel om astma vast te stellen. In **hoofdstuk 7** hebben we deze reactie op ontstekingsmarkers in condensaat, stikstofmonoxide, luchtwegweerstand en symptomen bekeken. Geen van deze parameters demonstreert verschillen in reactie op ICS op peuterleeftijd tussen kinderen met astma en kinderen met voorbijgaande klachten vastgesteld op zesjarige leeftijd. Echter kinderen met astma hebben wel significant meer klachten op peuterleeftijd vergeleken met kinderen met voorbijgaande klachten.

Vluchtige Organische Componenten (VOCs) worden toenemend bestudeerd om ziekten van de luchtwegen en andere ziekten te diagnosticeren. In **hoofdstuk 8** hebben we bekeken of er verschillen zijn tussen VOCs in uitademingslucht op peuterleeftijd bij gezonde kinderen, kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma vastgesteld op zesjarige leeftijd. Daarnaast hebben we bekeken of onderscheid mogelijk te vinden is tussen kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma op de peuterleeftijd. Verschillen tussen deze twee groepen en gezonde kinderen zijn aanwezig en gebaseerd op een beperkt aantal componenten. Daarnaast waren 17 VOCs op peuterleeftijd onderscheidend tussen kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma waarbij er een algehele correcte classificatie was van 80%. De onderscheidende componenten waren over het algemeen hydrocarbonen en lange keten alkanen. De onderscheidende VOCs zijn dus gerelateerd aan oxidatieve stress en de daaropvolgend vetperoxidatie. De ADEM studie duidt erop dat VOCs in uitademingslucht mogelijk kunnen worden gebruikt om astma op vroege leeftijd te voorspellen.

Informatie over astma in de familie zou helpen bij de voorspelling voor de ontwikkeling van astma, aangezien astma in de familie consequent als risicofactor voor astma bij kinderen wordt aangewezen. Daarnaast verbetert -naar verwachting- expressie van ontstekingsgenen de voorspelling van een vroege astma diagnose. In **hoofdstuk 9** evalueren we op peuterleeftijd de toegevoegde waarde van genexpressie naast het familiair voorkomen van astma in de voorspelling van astma op zesjarige leeftijd. In deze studie laten we zien dat genexpressie van TLR4, catalase (CAT) en TNF α , naast gegevens van het familiair voorkomen van astma, differentiatie op peuterleeftijd tussen kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma verbeteren. Als deze bevinding wordt bevestigd in een nieuwe studie, kunnen we concluderen dat informatie over expressie van ontstekingsgenen de risicoinfschatting van kinderen met piepen/zagen op de borst op peuterleeftijd kan verbeteren. Dit zal resulteren in een betere kwaliteit van zorg en meer kosteneffectieve behandeling van deze kinderen.

Er zijn verschillende klinische voorspellingsmodellen gebaseerd op gemakkelijk verkrijgbare klinische variabelen, om te helpen bij het vroeg vaststellen van astma zoals de Astma Predictie Index (API). De voorspellende kracht van deze klinische modellen is echter beperkt. Verbetering is daarom noodzakelijk en dit kan mogelijk worden bereikt door het toevoegen van informatie over biomarkers. In **hoofdstuk 10** bekijken we de waarde van markers in condensaat, VOCs, expressie van ontstekingsgenen en vroege longfunctiemetingen, toegevoegd op de API (gebaseerd op eczeem, hooikoorts, piepen/zagen op de borst zonder verkoudheid, atopie en astma bij ouders) op peuterleeftijd wat betreft de voorspelling van astma op zesjarige leeftijd bij kinderen met piepen/zagen op de borst. Een selectie van negen VOCs uit

hoofdstuk 8 toegevoegd aan de API is geassocieerd met een betere discriminatie tussen kinderen met voorbijgaande klachten en kinderen met astma op zesjarige leeftijd. Dit resultaat werd bevestigd door middel van externe validatie. Daarnaast is informatie over genexpressie van TLR4, CAT en TNF α op peuterleeftijd toegevoegd aan de API geassocieerd met een betere voorspelling voor de ontwikkeling van astma. Dit resultaat kon niet worden bevestigd door middel van externe validatie. Informatie over ontstekingsmarkers in condensaat en luchtwegweerstand op peuterleeftijd konden het onderscheid toegevoegd aan de API niet verbeteren. Onze bevindingen impliceren dat informatie over VOCs en mogelijk expressie van ontstekingsgenen naast klinische variabelen een toegevoegde waarde hebben in het diagnosticeren van astma op peuterleeftijd. Onze studie is de eerste belangrijke stap voor de introductie van ademanalyse en genexpressie in de kliniek van kinderen met astma op peuterleeftijd.

Hoofdstuk 11 omvat de algemene discussie van het proefschrift. In dit hoofdstuk bespreken we wat een aantal genetische varianten in ontstekingsgenen, bacteriële kolonisatie en T_{reg} cellen toevoegen aan onze onderliggende kennis over het ontstaan van astma. Daarnaast bespreken we de waarde van de reactie op ICS, ontstekingsmarkers in condensaat, VOCs, expressie van ontstekingsgenen en vroege longfunctiemetingen bij de voorspelling van de ontwikkeling van astma op peuterleeftijd. Als we onze bevindingen en die van anderen vergelijken, kunnen we de conclusie trekken dat het, om inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen van astma, belangrijk is zowel genetische als omgevingsinvloeden te bestuderen. Daarnaast kan, naast klinische variabelen, informatie over VOCs en expressie van ontstekingsgenen ons helpen bij een betrouwbare astmadiagnose op de peuterleeftijd. Alvorens implementatie in de kliniek mogelijk is, zijn aanvullende studies nodig om onze bevindingen te bevestigen en richting te geven aan klinische relevante drempels omtrent sensitiviteit en specificiteit. Daarnaast kunnen toekomstige studies profiteren van het indelen van astma in verschillende endotypen en het toepassen van systeembioïologie.