

Translational research on exhaled volatile organic compounds from bedside to bench

Citation for published version (APA):

Fijten, R. R. R. (2017). *Translational research on exhaled volatile organic compounds from bedside to bench*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20171211rf>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171211rf](https://doi.org/10.26481/dis.20171211rf)

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.

Nederlandse Samenvatting

Vluchtige organische verbindingen (VOCs) worden gedefinieerd als koolstofverbindingen die gemakkelijk verdampen bij kamertemperatuur. Ze kunnen verdeeld worden in verschillende groepen op basis van hun chemische eigenschappen. VOCs worden geproduceerd door bronnen van exogene (buiten het lichaam) of endogene (binnen het lichaam) oorsprong. Exogene VOCs worden onder andere geproduceerd door vervuiling, planten, voedsel en schimmels. Endogene VOCs worden geproduceerd door het menselijk lichaam zelf of door bacteriën die zich in het lichaam bevinden.

Uitademingslucht bevat naast stikstof, zuurstof en andere gassen ook VOCs. Deze uitademende VOCs kunnen zowel van endogene als exogene bronnen komen. Endogene VOCs worden geproduceerd in een weefsel of bacterie in het lichaam en worden getransporteerd naar de longen, waarna ze worden uitgedemd. Exogene VOCs komen binnen via de longen, huid, of ingewanden en worden na eventueel gebruik ook getransporteerd naar de longen, waarna ze worden uitgedemd.

Wanneer de concentraties van VOCs in de uitademingslucht worden vergeleken tussen een ziek en gezond persoon kunnen verschillen worden ontdekt die een indicatie geven over de aan- of afwezigheid van ziekte. Het doel van dit proefschrift was om de verschillende aspecten van het meten van VOCs in de uitademingslucht te onderzoeken. Ten behoeve van dit doel zijn zeven studies beschreven in dit proefschrift om de volgende doelen te behalen: (i) het beoordelen van de huidige literatuur over het verwerken en analyseren van de verkregen data in het onderzoek naar uitademingslucht, (ii) het onderzoeken van de potentie van de analyse van uitademingslucht ter diagnose van verschillende longziekten, (iii) het testen van de kwaliteit en betrouwbaarheid van de onderscheidende VOCs, (iv) het onderzoeken van de bruikbaarheid van VOCs analyse in vitro in cellen en bacteriën, en (v) het identificeren van aanemelijke endogene bronnen van VOCs in vitro.

Belangrijkste bevindingen

De analyse van uitademingslucht kan onderscheid maken tussen ernstig zieke patiënten met en zonder ventilator geassocieerde pneumonie

Ventilator geassocieerde pneumonie (VAP) is een infectieziekte die voorkomt in de Intensive Care (IC). Om de ziekte vast te stellen moeten patiënten een zeer invasieve en risicovolle procedure genaamd bronchoalveolaire lavage ondergaan. In **hoofdstuk 3** werd onderzocht of het mogelijk was om de aanwezigheid van de ziekte vast te stellen met behulp van uitademingslucht. Hiervoor is de uitademingslucht van 100 patiënten opgevangen en geanalyseerd. Uit de resultaten is gebleken dat het mogelijk was om een onderscheid te maken tussen patiënten die VAP ontwikkelden en patiënten waarbij dat niet gebeurde. Dit onderscheid was vast te stellen met een nauwkeurigheid van 74.2% en was gebaseerd op basis van een profiel van 12 VOCs. Door middel van eerder vergaarde kennis werd voor een aantal van deze onderscheidende VOCs een potentiële endogene bron vastgesteld.

Op basis van deze bevindingen kon worden geconcludeerd dat uitademingslucht

potentieel een belangrijke rol kan gaan spelen in de diagnose van VAP. Het heeft veel voordelen ten opzichte van de huidige gouden standaard, bronchoalveolaire lavage, vanwege het snelle en non-invasieve karakter van de methode. Daarnaast kan het de opmars van antibiotica resistentie remmen door snellere diagnose, waardoor eerder gehandeld kan worden wanneer een longontsteking wordt vastgesteld.

Met behulp van uitademingslucht kan een onderscheid gemaakt worden tussen drie verwante chronische longziekten, maar de resultaten zijn mogelijk niet reproduceerbaar

De term Interstitiële longaandoeningen (ILD) betreft een groep longaandoeningen met onder andere longfibrose (IPF) en bindweefselziekte-geassocieerde interstitiële longziekte (CTD-ILD). De combinatie van de generieke symptomen en de lage incidentie en prevalentie van deze ziektes bemoeilijkt het vinden van de juiste diagnose. Voor de patiënt resulteert dit in een lange periode van onzekerheid voor een diagnose gesteld kan worden. In **hoofdstuk 4** is onderzocht of het onderscheid gemaakt kon worden tussen 51 IPF en 53 CTD-ILD patiënten. Een profiel van 16 VOCs werd ontdekt dat kon voorspellen welke ziekte een patiënt had met een nauwkeurigheid van 76.9%. Dit resultaat suggereert deze uitgedemde VOCs samenhangen met de onderliggende pathofysiologische mechanismen van die specifieke ziekte. Daarnaast was het mogelijk om beide groepen patiënten te onderscheiden van een groep gezonde vrijwilligers. Hoewel deze bevindingen veelbelovend waren, was het niet mogelijk om de studie te valideren, vermoedelijk vanwege de heterogene aard van ILD in combinatie met het relatief lage aantal patiënten in deze studie.

Op basis van de bevindingen in deze studie kan worden vastgesteld dat patiënten met ILD een ander VOC-profiel uitademen dan gezonde personen, maar ook dat verschillende vormen van ILD te onderscheiden zijn van elkaar. Toch is gebleken dat het aantal patiënten in deze studie niet toereikend was, waardoor een grotere studie nodig is om de waarde van de onderscheidende VOCs te kunnen bepalen.

Externe studie validatie is essentieel om de reproduceerbaarheid van een klinische studie te waarborgen

Gedurende het laatste decennium is een grote hoeveelheid klinische studies gepubliceerd waarbij VOCs in uitademingslucht zijn gebruikt om een ziekte te diagnosticeren. Wanneer deze studies worden vergeleken is duidelijk te zien dat er weinig overlap is tussen de onderscheidende VOCs in de verschillende studies. Er zijn een aantal oorzaken voor dit probleem, waarvan de voornaamste het gebrek aan validatie van de studie is. Het doel van **hoofdstuk 5** was om het effect van verschillende vormen van validatie te testen op data van een klinische studie. In deze studie werd een profiel van negen VOCs gevonden dat onderscheid kon maken tussen patiënten met sarcoïdose, een vorm van ILD, met een nauwkeurigheid van 79.4%. Wanneer verschillende vormen van validatie werden vergeleken bleek dat de leave-k-out validatie de meest optimistische voorspelling deed, terwijl de onafhankelijke externe validatie de meest realistische voorspelling gaf.

Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat onafhankelijke externe validatie van groot belang is om de betrouwbaarheid van een klinische studie vast te stellen. We raden daarom aan om deze vorm van validatie altijd toe te passen in een klinische studie waarin de analyse van uitademingslucht wordt toegepast.

Het is mogelijk VOCs te detecteren die zijn uitgescheiden door bacteriën in vitro

Naast het gebrek aan validatie in klinische studies is de kennis over de biologische oorsprong van VOCs zeer summier. Toch is het cruciaal deze kennis te vergroten om niet alleen te begrijpen waarom bepaalde VOCs uitgedemd worden in een bepaalde ziekte, maar ook om uitademingslucht te kunnen toepassen voor ziektebewaking. **Hoofdstuk 6** trachtte te achterhalen welke VOCs werden uitgescheiden door verschillende soorten bacteriën die vaak infecties veroorzaken in de longen. In deze studie werden 6 soorten bacteriën gekweekt, waarna de lucht boven de bacteriën werd geanalyseerd om veranderingen in de productie van VOCs op te sporen. Vier soorten bacteriën konden worden onderscheiden met behulp van een profiel van 25 VOCs. Vijftien van deze VOCs waren specifiek voor n soort bacterie, terwijl de overige tien werden geproduceerd door meerdere soorten. Naast deze resultaten kon een onderscheid gemaakt worden tussen Meticilline Resistente Staphylococcus aureus (MRSA) en Meticilline Gevoelige Staphylococcus aureus (MSSA) op basis van 8 VOCs. Verscheidene VOCs konden terug geleid worden naar een specifiek onderliggend proces, zoals de koolwaterstoffen die voortkomen uit lipide peroxidatie. Een groot aandeel van de overige VOCs kon niet gekoppeld worden aan een specifiek proces, maar werd gevonden in andere studies waarin dezelfde bacteriën werden onderzocht.

Uit deze bevindingen kon geconcludeerd worden dat verschillende soorten bacteriën een ander patroon aan VOCs uitscheiden. Hieruit kan worden afgeleid welke processen specifieke VOCs uitscheiden. Daarnaast was het mogelijk MRSA van MSSA te onderscheiden. Deze resultaten kunnen in de toekomst vertaald worden naar een klinische toepassing waar het mogelijk is bij de diagnose van een longinfectie vast te stellen welke bacterie het veroorzaakt. Wanneer dit mogelijk is kan de juiste antibiotica gekozen worden, waardoor genezing sneller plaatsvindt en verdere antibiotica resistentie bestreden kan worden.

Blootstelling aan een giftige stof resulteert in verandering in de uitscheiding van VOCs door longcellen in vitro

Niet alleen bacteriën, maar ook menselijke cellen kunnen VOCs produceren. Ook op dit vlak is er een gebrek aan kennis over de biologische oorsprong. Daarnaast is het identificeren van ziekte een belangrijke doelstelling voor de analyse van uitademingslucht. In **hoofdstuk 7** zijn cellen in vitro blootgesteld aan twee giftige stoffen om te achterhalen of cellen andere VOC profielen produceren wanneer er schade ontstaat door deze giftige stoffen. In beide gevallen was het mogelijk de beschadigde cellen te onderscheiden van de gezonde cellen. Omdat het werkingsmechanisme van beide giftige stoffen bekend is, was het mogelijk om een link te leggen tussen specifieke processen en de onderscheidende VOCs. Toch was er, ondanks dat beide stoffen een

soortgelijk werkingsmechanisme hadden, maar n VOC die werd gevonden in beide experimenten. Dit kan veroorzaakt worden door verschillende factoren, maar het is aannemelijk dat de voornaamste oorzaak het verschil in blootstellingstijd is.

Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat ook menselijke cellen andere VOCs uitscheiden, in dit geval na blootstelling aan giftige stoffen. Deze resultaten kunnen mogelijk in de toekomst vertaald worden naar een klinische studie waarbij bijvoorbeeld gekeken wordt naar de relatie tussen blootstelling aan sigaretten en de samenstelling van VOCs in de uitademingslucht. Daarnaast zijn relaties ontdekt tussen de uitgescheiden VOCs en de werkingsmechanismen van de giftige stoffen. Deze relaties moeten gevalideerd worden met meer onderzoek, maar geven een duidelijk eerste inzicht in de biologische oorsprong van endogene VOCs.

Door het combineren van VOCs en ander biologische bronnen van data kunnen aannemelijke relaties worden vastgesteld tussen VOCs en de onderliggende biologische processen

Uit een cel kunnen verschillende lagen van informatie verzameld worden. Ten eerste is informatie opgeslagen in het DNA in de celkern, genaamd genen. Om de cel in leven te houden worden op basis van deze informatie bouwstoffen gemaakt, genaamd eiwitten en enzymen. Daarna worden deze bouwstoffen gebruikt om energie te produceren of de samenstelling van de cel te onderhouden. Tijdens deze processen worden metabolieten geproduceerd, die daarna omgezet kunnen worden in VOCs. Om daadwerkelijk vast te stellen welke onderliggende biologische processen VOCs produceren zal informatie verzameld moeten worden van deze verschillende informatielagen. In **hoofdstuk 8** is deze strategie gebruikt om informatie te verzamelen van de genen, metabolieten en VOCs. Deze informatie is samengevoegd en gebruikt om relaties te ontdekken tussen uitgescheiden VOCs en de onderliggende genen en metabolieten. Een voorbeeld hiervan is de VOC nonanal, die correleert met de metaboliet myoinositol. Dit metaboliet is gelinkt aan genen die betrokken zijn bij celdood-, DNA herstel- en kanker-gerelateerde processen. Het is daarom plausibel dat nonanal wordt geproduceerd door deze celdood-, DNA herstel- en kanker-gerelateerde processen.

Op basis van deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat verschillende relaties zijn ontdekt tussen uitgescheiden VOCs en de onderliggende biologische processen, met nonanal als voorbeeld. Toch is het belangrijk te noemen dat associatie niet gelijk is aan causaliteit. Er is een grote behoefte aan in vitro onderzoek dat de causaliteit van deze associaties aantoont.

Algemene conclusie

Dit proefschrift heeft aangetoond dat, hoewel uitademingslucht veelvuldig is toegepast in de vorm van klinische studie, twee problemen moeten worden opgelost voor een klinische toepassing mogelijk is. Ten eerste heeft dit proefschrift het belang van geschikte (bij voorkeur externe) validatie aangetoond die nodig is om de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van een klinische studie te waarborgen. Ten tweede, het vergaren en uitbreiden van de biologische kennis onderliggend aan de endogene productie van

VOCs is van groot belang. Dit proefschrift heeft de eerste stap gezet in het achterhalen waar specifieke VOCs vandaan komen, maar heeft voornamelijk associaties gevonden. Het is van belang om causaliteit vast te stellen in toekomstige in vitro experimenten. In het algemeen is een collectieve inspanning nodig vanuit de gemeenschap die betrokken is bij het onderzoek naar uitademingslucht om deze twee problemen op te lossen, zodat deze non-invasieve methode in de toekomst geïmplementeerd wordt in de kliniek.