



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Non-invasive sampling methods of inflammatory biomarkers in asthma and allergic rhinitis

Boot, J.D.

Citation

Boot, J. D. (2009, September 10). *Non-invasive sampling methods of inflammatory biomarkers in asthma and allergic rhinitis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13967>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13967>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

CHAPTER 11

Samenvatting

Allergisch astma en allergische rhinitis (AR) zijn verwante chronische ontstekingsziekten van respectievelijk de onderste en bovenste luchtwegen met wereldwijd een hoge prevalentie (astma 1-18% en AR 10-25%). Hoewel zelden levensbedreigend, hebben beide aandoeningen een grote invloed op de kwaliteit van leven en kunnen veel patiënten niet adequaat behandeld worden met de beschikbare medicatie. De klachten die patiënten met astma en/of allergische rhinitis uren, zijn verschillend per patiënt, en kunnen gepaard gaan met de volgende symptomen: kortademigheid, piepende ademhaling, drukkend gevoel op de borst, hoesten, en ‘overgevoelige luchtwegen voor allerlei stoffen’, dan wel nasale congestie, jeuk, niezen en oogsymptomen. Beide aandoeningen komen vaak gezamenlijk voor en hebben hun oorsprong in de interactie van genetische constitutie met bepaalde omgevingsfactoren.

Het allergische ontstekingsproces kenmerkt zich door een immunoglobuline E (IgE) gemiddelde reactie op specifieke, externe prikkels (‘allergenen’), zoals huisstofmijten, pollen of huidschilfers van dieren. De hierop volgende ontstekingscascade wordt getypeerd door een complex netwerk van effectorcellen (voornamelijk mestcellen en eosinofiele granulocyten), ontstekingsmediatoren, cytokinen, chemokinen, neuropeptiden en signaal-moleculen met onderlinge interacties. Dit leidt enerzijds tot migratie van ontstekingscellen naar de mucosa in de longen en de neus, en anderzijds tot een reactie met verschillende targetcellen (zoals gladde spiercellen, vaatwandcellen en mucusproducerende cellen) met als gevolg nasale cq. bronchiale obstructie en hyperreactiviteit. Onderzoek bij patiënten heeft aangetoond dat symptomen en longfunctieparameters, die veelal als leidraad voor de behandeling van astma worden gebruikt, niet de beste indicatoren zijn voor de mate van de onderliggende luchtwegontsteking. Om die reden staan huidige richtlijnen astmamanagement op geleide van astmacontrole voor - hetgeen een ‘multi-dimensionale’ parameter is.

Een biomarker is een te meten variabele die gebruikt kan worden als een indicator voor normale biologische processen, pathologische processen en/of het effect van een behandeling. Een goede biomarker is klinisch relevant, gevoelig voor veranderingen in het ziekteproces, betrouwbaar, reproduceerbaar, en eenvoudig uitvoerbaar. Het ontstekingsproces bij astma en AR biedt verschillende potentiële biomarkers. Eosinofiele granulocyten, verkregen via niet-invasieve samplings van de onderste of bovenste luchtwegen, zijn een goed voorbeeld van een ontstekingsbiomarker. Het percentage eosinofielen kan enerzijds een indicator zijn voor het type en de activiteit van het onderliggende ziekteproces en als graadmeter dienen voor het monitoren van anti-inflammatoire therapie. Eosinofielen-tellingen kunnen worden gedaan op gekleurde cytopins uit het sputum (slijm uit de onderste luchtwegen). Sputum kan op een niet-invasieve manier worden geïnduceerd

middels inhalaties van o.a. hypertone zoutoplossingen, waarna de patiënten worden aangemoedigd om op te hoesten. Naast eosinofielen, kunnen uit het sputum diverse andere ontstekingsbiomarkers worden bepaald, waarvan er verscheidene gevalideerd zijn. Sputum is dus een geschikt medium om het ziekteproces bij astma te onderzoeken. Een andere sampling-techniek voor ontstekingsbiomarkers uit de longen bestaat uit het verzamelen en analyseren van gekoeld uitgedemd luchtcondensaat (EBC). Hierbij ademt de patiënt gedurende een tiental minuten in een collector die de uitgedemde lucht koelt. Met behulp van gevoelige detectietechnieken kunnen vervolgens ontstekingsproducten in de EBC gemeten worden.

Een derde manier om de luchtwegontsteking bij astma te vervolgen is het meten van stikstofdioxide (NO) in uitgedemde lucht. Dit kan op een betrekkelijk eenvoudige wijze met behulp van moderne apparatuur. Uit diverse studies is gebleken dat de concentratie uitgedemd NO de ernst van de luchtwegontsteking bij astma reflecteert en dat de NO waarde daalt na adequate behandeling met anti-inflammatoire therapie.

Ook in de neus kunnen verschillende niet- of semi-invasieve sampling-technieken toegepast worden om ontstekingsbiomarkers te bemonsteren en analyseren. Zo kan op vergelijkbare wijze als uitgedemd NO bij astma, nasale NO (nNO) worden gemeten bij patiënten met allergische rhinitis. Twee andere technieken, waarbij men op 'semi'-invasieve wijze meerdere biomarkers in één keer verzamelt, bestaan respectievelijk uit neuslavage (NAL), waarbij de neus wordt gespoeld met een isotone zoutoplossing, en neusbrush (NAB), waarbij het neusslijmvlies lokaal wordt geborsteld met een klein borsteltje. Middels beide methoden kunnen verschillende biomarkers (respectievelijk ontstekingsmediatoren en ontstekingscellen) worden bepaald die deel uitmaken van het ontstekingsproces bij AR.

Dit proefschrift omvat een aantal klinische studies waarin de beschreven technieken werden toegepast om componenten van de luchtwegontsteking bij patiënten met allergisch astma en AR, al dan niet in een interventie setting, te meten. Het doel van dit proefschrift was om deze samplingtechnieken te optimaliseren als ook om de reproduceerbaarheid van biomarkers en toepasbaarheid van nieuwe detectiemethoden te onderzoeken.

Het eerste deel van dit proefschrift betreft biomarkeronderzoek bij allergisch astma. Hoofdstuk 3 beschrijft het onderzoek naar de farmacologische en klinische effectiviteit van een gecombineerde Neurokinine1/Neurokinine2 (NK1/NK2) receptor antagonist (AVE5883) in twee aparte studies. In de eerste studie bood geïnhaled AVE5883 bescherming tegen Neurokinine A-geïnduceerde luchtwegvernauwing bij patiënten met allergisch astma. Echter, bij toepassing in een exacerbatie model van astma, bleek dezelfde dosis AVE5883 niet effectief tegen allergen-geïnduceerde

luchtwegvernauwing en hyperreactiviteit. Bovendien was de toename in luchtwegontstekingscomponenten (cq biomarkers), namelijk sputum eosinofielen en uitgeademd NO, niet verminderd door behandeling met AVE5883. In een volgende studie (hoofdstuk 4) werd uitgeademd NO tijdens een allergeen-geïnduceerde late reactie voor en na recuperatie met salbutamol bepaald. Er was een sterke stijging van uitgeademd NO na opheffing van de allergeen-geïnduceerde luchtwegvernauwing na salbutamol-inhalatie. Hierbij correleerde de toename in uitgeademd NO met de toename in longfunctie (FEV₁). Uit onderzoek bij patiënten met klinisch stabiel astma, bleek eerder dat luchtwegvernauwing gepaard gaat met lagere NO waarden. Gezien de relatie tussen uitgeademd NO en luchtwegdiameter, concluderen wij dat voor een juiste vergelijking en interpretatie van deze biomarker in de klinische setting, NO gemeten dient te worden na een adequate luchtwegverwijding. In het volgende hoofdstuk werd de betrouwbaarheid van een draagbare NO meter (NIOX MINO®) in vergelijking met de ‘gouden standaard’ onderzocht (hoofdstuk 5). De NO waarden gemeten met de NIOX MINO bij gezonde vrijwilligers, rokers en patiënten met onbehandeld allergisch astma waren reproduceerbaar en kwamen overeen met metingen met behulp van een gevalideerde uitgeademd NO analyser (Ecomedics). De vergelijking tussen NIOX MINO met ‘zijn grote broer’, NIOX stationary, toonde destijds vergelijkbare resultaten. De NIOX MINO is draagbaar, goedkoper, eenvoudiger in gebruik en onderhoud en daardoor potentieel beter inzetbaar in de kliniek dan de traditionele (stationary) analysers, de NIOX en de Ecomedics. Het meten van biomarkers in sputum en EBC wordt vaak bemoeilijkt door te kleine hoeveelheden materiaal, gevoeligheid van biomarkers voor voorbehandeling en beperkt meetbereik van de meeste traditionele detectie-technieken. In hoofdstuk 6, werden nieuwe voorbehandelings- en detectietechnieken in sputum en EBC van patiënten met allergisch astma getest. In deze exploratieve studie, bleek ultracentrifugatie van sputum hogere spiegels aan diverse biomarkers op te leveren dan de traditionele voorbehandeling met dithiotrietol (DTT). Dit laatste ondanks toepassing van een (eveneens nieuwe) dialyse techniek, waarmee het voor biomarkers schadelijke DTT na de homogenisatie uit het monster werd gezuiverd. In het ultragecentrifugeerde sputum konden met twee gevoelige analyse technieken, i.e. Mesoscale en Luminex, biomarkers worden gemeten, die normaliter niet detecteerbaar zijn na voorbehandeling met DTT. Daarnaast was het mogelijk om RNA te isoleren uit de sputumcellen en het expressie niveau te bepalen. In EBC bleven de meeste biomarkers onder de detectielimiet, ondanks toepassing van Luminex.

Het tweede deel van dit proefschrift beschrijft biomarkerstudies bij patiënten met AR. Hierin bleken de veelvuldig gebruikte allergiemarkers, serum IgE waarden en huidpriktesten, een goede reproduceerbaarheid te

vertonen (hoofdstuk 7). Daarentegen waren biomarkers in NAL en NAB vaak niet meetbaar of vertoonden over een periode van 3 weken een aanzienlijke variabiliteit ondanks de stabiele klinische status van deelnemers. Mogelijk dat een andere sampling-procedure, met behulp van filtreerpapier dat vloeistof in de neus absorbeert, een oplossing kan bieden voor dit probleem dat deels samenhangt met een te sterke verdunning van de biomarkers vooral in de NAL. Ondanks dit minpunt, bleek in tegenstelling tot de placebo challenge, een nasale provocatietest met een relevant allergeen een duidelijk effect te hebben op verschillende ontstekingsmarkers in de neus. Hierbij waren met name $\alpha 2$ macroglobuline, eosinofiel cationisch proteïne (ECP) en tryptase verhoogd in de NAL, en de eosinofielen in de NAB. In dezelfde patiëntengroep werd eveneens de reproduceerbaarheid van de 'baseline' nasale NO waarden getest als ook het effect van een nasale allergeen provocatietest hierop (hoofdstuk 8). Uit onze bevindingen bleek dat bij patiënten met klinisch stabiele AR, nNO metingen gedurende korte observatie-perioden (<1 week) reproduceerbaar zijn, maar dat reproduceerbaarheid afneemt over langere perioden (al vanaf 2-3 weken). Mogelijk kunnen a-symptomatische seizoens- of weersinvloeden de nNO schommelingen verklaren. Interessant genoeg induceerde nasaal allergeen enerzijds wel een toename van symptoomscores en ontstekingsmarkers in de NAL, maar anderzijds een daling van nNO waarden tijdens de vroege allergische reactie. Deze daling werd waarschijnlijk veroorzaakt door een mechanische blokkade van de sinus maxillares door massieve slijmsecretie en slijmvlieszwellen en was vermoedelijk niet het gevolg van een biologische reactie. Vergelijkbare bevindingen werden eerder gedaan bij patiënten met neuspoliepen. Hierbij waren de nNO concentraties initieel omgekeerd evenredig aan de poliepomvang en stegen na behandeling van de poliepen. Vierentwintig uur na de allergeenprovocatie, toen de nasale obstructie grotendeels was geweken, bleken de nNO waarden significant verhoogd.

Het onderliggende ontstekingsproces bij astma en AR heeft vergelijkbare ontstekingskenmerken. In de laatste jaren wordt wederom veel aandacht besteed aan de mestcel als belangrijke effectorcel in beide aandoeningen. In hoofdstuk 9 werd exploratief onderzoek verricht naar een mogelijke rol van chymase (een protease afkomstig uit mestcellen) en diens afbraakproduct (cleaved secretory leukocyte protease (CSLPI)) bij beide aandoeningen. CSLPI geeft een indicatie van chymase activiteit (hetgeen een relevanter parameter is dan de concentratie) en is stabiel en betrouwbaarder biomarker. In deze studie vonden wij hogere chymase- en CSLPI concentraties in het sputum van patiënten met onbehandeld allergisch astma in vergelijking met monsters van astmapatiënten die met anti-inflammatoire therapie werden behandeld en gezonde vrijwilligers. Bij patiënten

met AR induceerde intranasaal allergeen (in tegenstelling tot placebo) een significante stijging van chymase en CSLPI in de NAL. Tevens was er een positieve correlatie tussen de chymase concentraties en de ratio SLPI/CSLPI (maat voor chymase activiteit).

Conclusies en aanbevelingen:

IS SPUTUM EEN GESCHIKTE TECHNIEK OM BIOMARKERS TE BEPALEN?

Een belangrijk voordeel van sputumbepalingen is dat een groot aantal biomarkers, afkomstig uit het ontstekingsproces in de luchtwegen, tegelijk kan worden bepaald. Moderne detectiemethoden maken bepalingen van een steeds toenemend aantal ontstekingsmarkers mogelijk uit zowel het supernatant als uit sputumcellen. Echter, naast de belasting van de patiënt, houden factoren als het ingewikkelde opwerkproces, de geavanceerde detectietechnieken als ook de celdifferentiatiebepalingen, het gebruik van deze techniek beperkt tot specialistische centra en klinisch onderzoek

IS UITGEADEMD NO EEN GOEDE BIOMARKER VOOR ASTMA?

Uitgeademd NO is niet-invasief, eenvoudig meetbaar en reproduceerbaar. Daarnaast kan een verhoogde NO waarde ondersteuning bieden bij het stellen van de diagnose 'astma'. Andere voordelen zijn diens gevoeligheid voor veranderingen in de ontstekingsgraad van de onderste luchtwegen (zowel voor als tijdens behandeling met anti-inflammatoire geneesmiddelen) en de voorspellende waarde voor een verminderde astmacontrole/exacerbatie. Minpunten zijn diverse storende factoren die de uitkomsten kunnen beïnvloeden, zoals de luchtwegdiameter, sigarettenrook en bepaalde voedingsmiddelen. Het is vooralsnog onduidelijk welke rol uitgeademd NO zal spelen bij het helpen optimaliseren van de lange-termijn behandeling van astma.

KAN EBC GEBRUIKT WORDEN BIJ KLINISCH ONDERZOEK EN IN DE KLINIEK?

Vooralsnog biedt EBC als enige samplingmethode de mogelijkheid om op volledig niet-invasieve en eenvoudige wijze biomarkers uit uitgeademde lucht te verzamelen. Echter, de thans beschikbare apparatuur en techniek zijn nog niet volledig gestandaardiseerd hetgeen aanzienlijke verschillen in studieresultaten heeft opgeleverd tussen de verschillende onderzoekcentra. Bovendien grenzen de concentraties van verschillende biomarkers aan de detectielimieten van de meest gangbare assays. Ter verdere ontwikkeling en optimalisatie, dient deze veelbelovende techniek te worden gecombineerd met gestandaardiseerde methoden en gespiegeld aan meer gevestigde biomarkers.

ZIJN NAL EN NAB BRUIKBARE SAMPLINGTECHNIEKEN VOOR BIOMARKERS?

NAL en NAB zijn gestandaardiseerde, relatief patiëntvriendelijke en eenvoudige, semi-invasieve technieken die herhaaldelijk kunnen worden aangewend om meerdere biomarkers te monstern. Belangrijkste nadelen vormen de lage concentraties en grote variabiliteit van de meeste biomarkers in de verkregen monsters. Grote(re) patiëntpopulaties, langere 'dwelltime' in de neus (NAL) en het gebruik van gevoelige detectietechnieken kunnen mogelijk uitkomst bieden.

IS NNO NET ZO BRUIKBAAR VOOR AR ALS UITGEAEMD NO VOOR ASTMA?

Nasale NO kan op een eenvoudige en niet-invasieve manier gemeten worden en de concentraties zijn over het algemeen hoger bij patiënten met onbehandelde AR vergeleken met patiënten die anti-inflammatoire therapie gebruiken en gezonde controles. Echter, andere studies rapporteerden een behoorlijke overlap in nNO waarden tussen gezonde vrijwilligers en patiënten met AR. Wellicht worden de nNO waarden in belangrijke mate beïnvloed door de variabele slijmvlieszwelling. Mogelijk is dit - naast weers- en seizoensinvloeden - een belangrijke reden, waarom nNO metingen over langere perioden variabel zijn en dus minder geschikt voor klinische monitoring bij patiënten met AR. Nasale NO metingen kunnen misschien wel gebruikt worden in 'korte termijn studies', bijvoorbeeld als biomarker van (allergeen geïnduceerde) acute nasale inflammatie als gecontroleerd wordt voor interfererende factoren, zoals nasale congestie.

IS CSLPI DE TOEKOMSTIGE BIOMARKER VOOR ZIEKTEACTIVITEIT BIJ ALLERGISCHE ASTMA EN ALLERGISCHE RHINITIS?

Cleaved SLPI bleek *in vitro* een marker te zijn voor chymase activiteit. Deze observaties worden bevestigd door onze *in vivo* data, waarbij hoge concentraties CSLPI werden gemeten bij patiënten met onbehandeld astma en bij AR patiënten met allergeen geïnduceerde nasale ontsteking. Gelet op de centrale rol die de chymase-bevattende mest-cellen mogelijk spelen bij allergische luchtweginflammatie en hyperreactiviteit, dient de rol van CSLPI verder te worden onderzocht in grote prospectieve studies.

