

University of Groningen

## Clinical and molecular phenotyping of asthma and COPD

Boudewijn, Ilse Maria

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Boudewijn, I. M. (2019). *Clinical and molecular phenotyping of asthma and COPD*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Chapter 12

## **Nederlandse samenvatting**



Astma en COPD zijn veelvoorkomende, chronische longziekten. Astma komt voor bij 300 miljoen mensen wereldwijd en kenmerkt zich door klachten van kortademigheid, hoesten en piepen. Daarnaast is er sprake van bronchiale hyperreactiviteit (BHR), waarbij luchtwegvernauwing optreedt als reactie op een externe prikkel zoals rook, parfum of koude lucht wat leidt tot plots optredende kortademigheid of hoesten. Het belangrijkste mechanisme dat de basis vormt van het ontstaan van astma is ontsteking van de luchtwegen. Deze chronische ontsteking leidt tot overproductie van slijm en vernauwing van de luchtwegen door verdikking van de luchtwegwand en door samentrekking van de (verdikte) spieren rondom de luchtwegen. De belangrijkste medicijnen bij de behandeling van astma zijn inhalatiecorticosteroiden (ICS). ICS remmen de onderliggende ontsteking van de luchtwegen; dit leidt tot afname van kortademigheid, astma-aanvallen, BHR en een verbeterde kwaliteit van leven.

COPD is een chronische, obstructieve longziekte die zich kenmerkt door progressieve kortademigheid en afgenomen inspanningstolerantie. Op dit moment is COPD de derde belangrijkste doodsoorzaak ter wereld volgens de World Health Organisation (WHO). De belangrijkste oorzaak van COPD is roken, maar ook andere schadelijke stoffen zoals luchtvervuiling en verbranding van biomassa zijn belangrijke oorzaken. Deze schadelijke stoffen leiden tot ontsteking van de luchtwegen, vernauwing van kleine luchtwegen en verlies van longweefsel. Tot op heden zijn deze processen onomkeerbaar.

Zowel astma als COPD zijn heterogene ziekten, wat betekent dat de ernst van de ziekte en het klinische uitingspatroon erg verschilt van patiënt tot patiënt, de onderliggende ziektemechanismen verschillen en de reactie op medicijnen varieert. Ondanks het feit dat we weten dat zowel patiënten met COPD alsook patiënten met astma onderling kunnen verschillen, worden deze patiënten met vergelijkbare soorten medicijnen behandeld. Het ontrafelen van deze verschillen is een belangrijk focus van onderzoek met als doel in de toekomst iedere individuele patiënt een passende behandeling aan te kunnen bieden. In dit proefschrift proberen wij een tipje van deze sluier op te lichten, waarbij we ons richten op klinische en moleculaire kenmerken van patiënten met astma en patiënten met COPD.

## KLINISCHE KENMERKEN

In **hoofdstuk 2** vergelijken we de mate van kleine luchtwegdysfunctie tussen personen met asymptomatische BHR (BHR zoals gemeten met een longfunctietest maar zonder luchtwegklachten), astmapatiënten en gezonde controles. Alle proefpersonen ondergingen een methacholine provocatietest, een longfunctie-onderzoek om BHR vast te stellen. De functie van de kleine luchtwegen werd gemeten op baseline en tijdens de provocatietest. In dit onderzoek vonden we dat op baseline zowel personen

met asymptomatische BHR als gezonde controles minder kleine luchtwegdysfunctie hadden vergeleken met astmapatiënten. Tijdens de methacholine provocatie hadden personen met asymptomatische BHR en astmapatiënten een sterkere toename in kleine luchtwegdysfunctie dan gezonde controles. Ten tijde van een 20% daling van de forced expiratory volume in 1 second ( $FEV_1$ ), een maat voor luchtwegvernauwing, tijdens de provocatietest, hadden astmapatiënten meer kleine luchtwegdysfunctie dan personen met asymptomatische BHR. Deze resultaten impliceren dat personen met asymptomatische BHR geen luchtwegklachten ervaren omdat ze minder kleine luchtwegdysfunctie hebben, zowel op baseline als na een provocatietest.

**Hoofdstuk 3** beschrijft onze resultaten van een studie onder rokers en niet-rokers zonder luchtwegklachten en met een normale longfunctie. We onderzochten het effect van leeftijd en roken op de mate van kleine luchtwegdysfunctie, emfyseem en parenchymziekte middels CT-scans van de longen. De CT-scans werden geanalyseerd met behulp van een nieuwe techniek genaamd parametric response mapping (PRM), wat als voordeel heeft dat kleine luchtweg ziekte ( $PRM^{fSAD}$ ) kan worden onderscheiden van emfyseem ( $PRM^{Emph}$ ) en parenchymziekte ( $PRM^{PD}$ ). We vonden dat  $PRM^{fSAD}$ ,  $PRM^{Emph}$  en  $PRM^{PD}$  significant toenamen met een hogere leeftijd, en dat rokers meer  $PRM^{PD}$  hadden dan niet-rokers. Een interessante bevinding was dat  $PRM^{fSAD}$ , onafhankelijk van  $PRM^{Emph}$ , geassocieerd was met een verminderde longfunctie. We speculeren derhalve dat vroege veranderingen in longfunctie het gevolg zijn van toename in kleine luchtwegdysfunctie, onafhankelijk van de mate van emfyseem.

Rokers met astma ervaren meer luchtwegklachten, hebben meer kleine luchtwegdysfunctie en reageren minder goed op ICS, vergeleken met niet-rokers die astma hebben. In **hoofdstuk 4** rapporteren wij resultaten van de OLIVIA-studie: een gerandomiseerde, cross-over, open-label studie waarin we de effecten van 2 weken behandeling met drie soorten ICS onderzochten. We vergeleken ICS die geïnhaled werd als extrafijne deeltjes beclomethason (Qvar), wat inhoudt dat de deeltjes kleiner zijn en daarmee dieper in de luchtwegen komen, met niet-extrafijne deeltjes beclomethason (Clenil) en niet-extrafijne deeltjes fluticason (Flixotide) onder rokers en ex-rokers met astma. We includeerden 22 rokers en 21 ex-rokers, waarvan 38 de studie volbrachten. We vonden geen significant verschil in onze primaire uitkomstmaat, d.w.z. verbetering in BHR, tussen de 3 behandelingen. We concludeerden derhalve dat behandeling met extrafijne ICS niet beter is dan behandeling met niet-extrafijne ICS in rokers en ex-rokers met astma. Een mogelijke verklaring voor dit negatieve resultaat is dat de aanwezigheid van kleine luchtwegdysfunctie geen inclusie criterium was voor de OLIVIA studie. Daarom hebben we in een post-hoc analyse, beschreven in **hoofdstuk 5**, geanalyseerd

of OLIVIA-deelnemers met kleine luchtwegdysfunctie ten tijde van inclusie, een betere klinische respons hebben na behandeling met extrafijne ICS (Qvar) vergeleken met niet-extrafijne ICS (Clenil en Flixotide). Kleine luchtwegdysfunctie werd gedefinieerd als een abnormale  $R_{5-R_{20'}}$ ,  $FEF_{25-75'}$ ,  $RV/TLC$ ,  $S_{acin}$  of  $S_{cond'}$  waarbij al deze parameters weerspiegelen dat er ergens in de longen afwijkingen zijn van de kleine luchtwegen. De resultaten lieten zien dat personen met kleine luchtwegdysfunctie gebaseerd op  $R_{5-R_{20'}}$ ,  $FEF_{25-75'}$ ,  $RV/TLC$  of  $S_{acin'}$  een vergelijkbare verbetering in BHR hadden na behandeling met extrafijne ICS en niet-extrafijne ICS. Personen met kleine luchtwegdysfunctie gebaseerd op  $S_{cond}$  hadden een sterkere verbetering in BHR na behandeling met niet-extrafijne ICS (Clenil) vergeleken met extrafijne ICS (Qvar). Voorspellers voor verbetering in BHR in de complete groep waren een lager aantal neutrofielen in serum (Qvar, Clenil en Flixotide), een hoger aantal eosinofielen in serum (Clenil en Flixotide), jongere leeftijd (Clenil) en ex-roken (Clenil en Flixotide). Onze resultaten suggereren dat met name het toepassen van neutrofielen en eosinofielen in serum als biomarker artsen kan helpen ICS therapie in rokers en ex-rokers te begeleiden.

Bronchiale hyperreactiviteitstesten met adenosine, een indirecte prikkel om luchtwegvernauwing te induceren, is mogelijk een niet-invasieve biomarker om eosinofiele luchtweginflammatie bij astma aan te tonen. In **hoofdstuk 6** rapporteren we de resultaten van een studie waarin we een nieuwe adenosine-formulering, d.w.z. droge poeder adenosine, vergeleken met de standaard adenosine 5' monofosfaat (AMP)-verneveling. Een nadeel van AMP-verneveling is dat niet alle astmapatiënten een 20% daling in  $FEV_1$  bereiken na de hoogst mogelijke concentratie AMP die verneveld kan worden. Onze hypothese was dat droge poeder adenosine, dat toegediend kan worden in hogere doses, een sensitievere test is om BHR aan te tonen. Onze studie laat zien dat 40 van de 60 onderzochte rokers en ex-rokers met astma BHR hadden (d.w.z. 20% daling in  $FEV_1$ ) na toediening van zowel adenosine als AMP. Tien personen hadden BHR na adenosine, maar niet na AMP. Twee personen hadden BHR na AMP, maar niet na adenosine. Zeven personen bereikten geen 20% daling in  $FEV_1$  na zowel adenosine als AMP. De correlatie tussen de dosering adenosine en concentratie AMP die een 20% daling in  $FEV_1$  veroorzaakte ( $PD_{20}$  en  $PC_{20'}$  respectievelijk) was hoog. Een hogere leeftijd (AMP en adenosine) en een hogere  $FEV_1$  (adenosine) waren onafhankelijk geassocieerd met een hogere  $PD_{20}$  en  $PC_{20'}$  dus minder ernstige BHR. Deze resultaten suggereren dat provocatietesten met droge poeder adenosine sensitiever zijn dan AMP-vernevelingen om BHR bij astmapatiënten te detecteren.

## MOLECULAIRE KENMERKEN

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we onderzocht welke moleculaire mechanismen betrokken zijn bij astma en COPD door middel van het bestuderen van gen-expressie profielen op materiaal dat we verkregen middels het inbrengen van een borsteltje in de neus en in de lagere luchtwegen.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we onze bevindingen van een studie waarin we gen-expressie profielen in de neus bij 31 COPD-patiënten vergeleken met de profielen van 22 controles. Alle deelnemers waren rokers. We ontdekten dat 135 genen significant anders tot expressie kwamen bij COPD-patiënten in vergelijking met controles (21 opgereguleerd en 114 neerwaarts gereguleerd). We ontdekten tevens dat dit COPD-geassocieerde gen-expressieprofiel in de neus significant overeenkwam met het COPD-geassocieerde gen-expressie profiel in de lagere luchtwegen in 2 onafhankelijke cohorten met COPD-patiënten en controles. Hierna voerden we aanvullende 'pathway-analyses' uit, wat betekent dat we de gezamenlijke functie van de totale groep genen die anders tot expressie komt in COPD onderzochten. Dat betekende in dit geval 21 opgereguleerde genen en 114 neerwaarts gereguleerde genen. Pathway-analyses voor opgereguleerde genen bij COPD toonden pathways betrokken bij 'O-glycan biosynthese' en 'glycosphingolipid biosynthese'. Pathway-analyses voor neerwaarts gereguleerde genen bij COPD toonden 'RNA degradatie', 'DNA replicatie', 'propanoaat metabolisme' en 'tight junction'. Onze resultaten laten zien dat veranderingen in gen-expressie die geassocieerd zijn met COPD gedetecteerd kunnen worden in de neus, en dat vergelijkbare veranderingen in gen-expressie ook in de lagere luchtwegen gevonden worden. Concluderend dient deze studie als een startpunt voor verder onderzoek naar het gebruik van gen-expressie in de neus als niet-invasieve biomarker bij COPD.

In **hoofdstuk 8** onderzochten we de effecten van ICS op gen-expressie in de neus bij astmapatiënten. We voerden een meta-analyse uit op 2 cohorten met astmapatiënten die behandeld werden met ICS; de OLiVIA-studie uit Groningen (n=39, 2 weken behandeling met HFA-beclomethason 2x daags 200µg) en de NZRHS-studie uit Nieuw Zeeland (n=28, 12 weken behandeling met budesonide 2x daags 400µg). Behandeling met ICS induceerde verandering in expressie van 135 genen (76 opgereguleerd en 59 neerwaarts gereguleerd). Vervolgens onderzochten we een subpopulatie van OLiVIA waarin patiënten stopten met ICS, om zo te onderzoeken of veranderingen in gen-expressie door het starten met ICS omgekeerd worden na het stoppen met ICS. We vonden dat neerwaarts gereguleerde genen na ICS-behandeling overeenkwamen met opgereguleerde genen na het stoppen van ICS. We vergeleken de 135 genen die veranderden in expressie in de neus na ICS-behandeling met veranderingen in expressie in de lagere luchtwegen na ICS-behandeling in 2 onafhankelijke astma-cohorten (cohort 1: n=12; 8 weken behandeling met budesonide 2x daags 180µg en cohort 2: n=20; 1

week behandeling met fluticason 2x daags 500µg). Daarnaast vergeleken we deze 135 genen in menselijke epitheelcellen uit de luchtwegen in 'air-liquid-interface' kweken na behandeling met corticosteroiden. In beide analyses vonden we dat veranderingen in gen-expressie in de neus na behandeling met ICS aanzienlijk overeenkwamen met veranderingen in gen-expressie in de lagere luchtwegen na behandeling met corticosteroiden. Dit impliceert dat de het gen-expressie profiel in de neus gebruikt kan worden om de effecten van ICS te bestuderen en mogelijk een rol kan spelen in het begeleiden van ICS behandeling bij astma.

Astmapatiënten kunnen over hun ziekte heen groeien en helemaal geen benauwdheid, hoesten of piepen meer hebben; dit wordt klinische remissie genoemd. Klinische remissie wordt gedefinieerd door de afwezigheid van astmasymptomen zonder dat er astmamedicatie wordt gebruikt. Als er tevens sprake is van een genormaliseerde longfunctie (afwezigheid van BHR en een normale FEV<sub>1</sub>) wordt dit complete remissie genoemd. In **hoofdstuk 9** exploreerden we welke moleculaire mechanismen ten grondslag liggen aan complete remissie van astma. Hiertoe onderzochten we microRNA's (RNA met een lengte van 20-25 nucleotiden dat niet voor eiwitten codeert), eiwit-coderende RNA's (RNA dat codeert voor eiwitten) en lange niet-coderende RNA's (lncRNA's; RNA met een lengte > 200 nucleotiden dat niet voor eiwitten codeert) in luchtwegbiopten van astmapatiënten, personen in complete remissie en gezonde controles. We vonden 10 microRNA's die verschillend tot expressie kwamen tussen astma en complete remissie, en 77 microRNA's die verschillend tot expressie kwamen tussen complete remissie en controles. Om de interactie tussen deze microRNA's en andere gen-types te begrijpen, creëerden we een Bayesian netwerk dat complete remissie voorspelde. Dit netwerk bestond uit 24 microRNA's, 35 lncRNA's en 20 eiwit-coderende RNA's. Een interessante bevinding was dat alleen microRNA's en lncRNA's (en geen enkel eiwit-coderend RNA) direct verbonden waren met complete remissie. Aanvullende analyses lieten zien dat dit netwerk een significant lagere proportie eiwit-coderende RNA's bevatte dan wat op basis van kans verwacht zou worden. Dit impliceert dat niet-coderende RNA's (d.w.z. microRNA's en lncRNA's) belangrijk lijken te zijn in complete remissie aangezien 1) microRNA's verschillend tot expressie komen tussen complete remissie en controles en 2) in een Bayesian netwerk dat complete remissie voorspelt microRNA's en lncRNA's uitgebreid aanwezig zijn. Deze resultaten impliceren dat toekomstig onderzoek zich zal moeten richten op de rol van niet-coderend RNA bij complete remissie van astma.

Concluderend dragen de onderzoeken in dit proefschrift bij aan het beter begrijpen van astma en COPD op klinisch en moleculair niveau. Ten eerste benadrukken we de relevantie van kleine luchtweg (dys)functie bij gezonde personen in relatie tot



luchtwegklachten en longfunctie. Ook tonen we aan dat provocatietesten met adenosine verbeterd kunnen worden door het toepassen van een droge poeder formulering en dat extrafijne ICS niet superieur lijken te zijn in vergelijking met niet-extrafijne ICS bij de behandeling van rokers met astma. Hierna focusten we ons op moleculaire kenmerken en onderzochten we gen-expressie profielen in de neus en in de lagere luchtwegen van astma- en COPD-patiënten. We lieten zien dat zowel COPD-gerelateerde als ICS-gerelateerde veranderingen in gen-expressie in de neus grote overeenkomsten vertoonden met gen-expressie in de lagere luchtwegen. Bovendien toonden we aan dat veranderingen in gen-expressieprofielen na starten van ICS, grotendeels omkeren na het stoppen van ICS. We concluderen dat deze bevindingen suggereren dat we neusborsteltjes kunnen gebruiken om de lagere luchtwegen te bestuderen. Ten slotte onderzochten we moleculaire veranderingen bij remissie van astma en toonden aan dat microRNA's en andere niet-coderende RNA's hier mogelijk een rol in spelen. Dit suggereert dat toekomstig onderzoek zich op deze groep, nog weinig onderzochte, RNA's zal moeten richten.

Vanzelfsprekend zijn er op basis van de onderzoeken beschreven in dit proefschrift volop mogelijkheden voor toekomstig onderzoek. Ik noem hieronder een aantal voorbeelden:

- 1) Het is van belang personen te kunnen identificeren die op termijn astma en COPD zullen ontwikkelen. Hierdoor kunnen ziekteprocessen in een vroeg stadium onderzocht worden wat mogelijkheden biedt om therapieën te ontwikkelen die astma en COPD kunnen voorkomen, danwel het ziekteproces kunnen remmen. In ons onderzoek onder gezonde personen zagen we dat kleine luchtweg (dys)functie een belangrijke rol speelt in het hebben van luchtwegklachten en op de longfunctie. Daarnaast weten we dat genetische factoren, omgevingsfactoren en psychische factoren een rol spelen voor het ontstaan van longziekten zoals astma en COPD, zelfs al voor de geboorte. Een groot prospectief geboortecohort waarin informatie over ouders en nageslacht verzameld wordt, biedt de mogelijkheid om gedetailleerd de risicofactoren en vroege mechanismen van astma en COPD te onderzoeken.
- 2) De rol van extrafijne deeltjes ICS bij de behandeling van astma en COPD is op dit moment onduidelijk. Een groot gerandomiseerd onderzoek waarin extrafijne ICS wordt vergeleken met niet-extrafijne ICS is nodig bij beide ziektebeelden. Hierin zijn een aantal aspecten van belang: 1) de middelen moeten in dezelfde inhalator worden aangeboden op een dubbel-blinde manier en 2) bij voorkeur worden patiënten vooraf ingedeeld in groepen (gestratificeerd) op basis van de aan- of

afwezigheid van kleine luchtweg (dys)functie. Dit zal duidelijkheid verschaffen over de effectiviteit van extrafijne ICS bij de behandeling van astma, en met name bij astmapatiënten mét en zonder kleine luchtweg (dys)functie. Ditzelfde geldt ook voor COPD patiënten met een vroege fase van de ziekte.

- 3) In dit proefschrift lieten we zien dat neus geschikt is om gen-expressie veranderingen in de lagere luchtwegen aan te tonen. Het is erg interessant om dit onderzoek uit te breiden, door bijvoorbeeld te onderzoeken of gen-expressieprofielen in de neus de respons op een bepaalde behandeling kunnen voorspellen. Ook kan er meer inzicht verworven worden in de mechanismen die leiden tot astma en COPD door in grote cohorten gen-expressie analyses toe te passen.

13