

SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**BINNENHUIS RISICO FACTOREN VOOR RESPIRATOIRE
AANDOENINGEN BIJ KINDEREN: ONTWIKKELING EN
TOEPASSING VAN NIET-INVASIEVE BIOMARKERS**

“ANIMO”

G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen G. Koppen,
E. Goelen, E. Govarts, A. Bernard, C. Voisin, K. Desager, V. Nelen



ENERGY 

TRANSPORT AND MOBILITY 

AGRO-FOOD 

HEALTH AND ENVIRONMENT 

CLIMATE 

BIODIVERSITY 

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS 

TRANSVERSAL ACTIONS 



Gezondheid & Milieu



EINDVERSLAG FASE 1
SAMENVATTING

**BINNENHUIS RISICO FACTOREN VOOR RESPIRATOIRE
AANDOENINGEN BIJ KINDEREN: ONTWIKKELING EN TOEPASSING
VAN NIET-INVASIEVE BIOMARKERS
“ANIMO”**

SD/ HE/05A

Promotoren

Greet Schoeters

Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO)
Environmental Risk & Health
Mol



Alfred Bernard

Université Catholique de Louvain (UCL)
Unité de toxicologie industrielle et de médecine du travail
Bruxelles



Kristine Desager

Universiteit Antwerpen (UA)
Pediatrics and Respiratory Medicine
Antwerp



Auteurs

**G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen
G. Koppen, E. Goelen, E. Govarts - VITO**

A. Bernard, C. Voisin - UCL

K. Desager - UA

V. Nelen - Provincial Institute of Hygiene – Antwerp

Januari 2009





Rue de la Science 8
Wetenschapsstraat 8
B-1000 Brussels
Belgium
Tel: + 32 (0)2 238 34 11 – Fax: + 32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Emmanuèle Bourgeois
+ 32 (0)2 238 34 94

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen G. Koppen, E. Goelen, E. Govarts, A. Bernard, C. Voisin, K. Desager, V. Nelen ***“Binnenhuis risico factoren voor respiratoire aandoeningen bij kinderen: ontwikkeling en toepassing van niet-invasieve biomarkers “ANIMO”*** Eindverslag Fase 1 Samenvatting. Brussel : Federaal Wetenschapsbeleid 2009 – 6 p. (Onderzoeksprogramma “Wetenschap voor een Duurzame Ontwikkeling”)

De laatste decennia is er een toename vastgesteld in het voorkomen van respiratoire aandoeningen zoals astma en allergie in kinderen. Omgevingsfactoren (buitenshuis en binnenshuis) kunnen bijdragen aan deze stijging. Er zijn tal van aanwijzingen dat kinderen gevoeliger zijn aan stressfactoren uit de omgeving.

Binnen Europa is er ruime belangstelling voor humane biomonitoring als instrument om de volksgezondheid op te volgen waarbij kinderen als gevoelige populatie speciale aandacht krijgen. Respiratoire aandoeningen in kinderen behoren tot de onderzoeksprioriteiten in milieu en gezondheidsprogramma's. Biomonitoring in kinderen stelt een aantal specifieke problemen zoals verzamelen van biologische stalen, onderzoek van blootstelling en gezondheidseffecten en ethische aspecten. Er werden reeds pogingen ondernomen om minder of niet-invasieve biomarkers te ontwikkelen die gebruikt kunnen worden in milieu en gezondheidsonderzoek in kinderen.

In het ANIMO project willen we niet-invasieve biomarkers ontwikkelen die toegepast kunnen worden in kinderen en die toelaten om schadelijke effecten aan de luchtwegen in een vroege fase op te sporen, zodat preventieve maatregelen kunnen worden genomen vooraleer er een duidelijk ziektebeeld ontstaat.

De eerste activiteiten in de eerste fase van het project, waren gericht op de **ontwikkeling**, **optimalisatie**, en **standaardisatie** van vier niet-invasieve methoden, om deze toepasbaar te maken bij kinderen: uitgedemde gassen, inclusief NO (stikstofmonoxide) en andere vluchtige organische componenten (VOCs), uitgedemde lucht condensaat (EBC), en nasaal lavage.

NO in uitgedemde lucht (eNO) is een goed gekende merker van luchtweginflammatie. De procedures voor het gebruik van het mobiele toestel (NIOX MINO, Aerocrine, Sweden) en het statische toestel (CLD 88 SP analyser, EcoMedics, Switzerland) bij kinderen, werden gefinaliseerd.

De methode om *uitgedemde gassen* te analyseren, werd geoptimaliseerd. De uitgedemde lucht stalen werden gecollecteerd in Teflon zakken. Deze staalname, alsook de analysemethode bestaande uit thermische desorptie gaschromatografie en massaspectrometrie werden ontwikkeld, wat het meten van C₅-C₁₂ VOCs in de uitgedemde lucht toeliet. Herhaalde experimenten toonden aan dat de methode betrouwbaar is voor minstens 56 VOCs die aanwezig zijn in de uitgedemde lucht. 89 % van de variatiecoëfficiënten was kleiner dan 30 % (waarvan 85 % ≤ 20 %).

Uit een beperkte intra-individuele variabiliteitsstudie kan besloten worden dat het tijdstip van staalname op één dag, alsook dag tot dag variatie, verwaarloosbaar (3 %) zijn, vergeleken met de totale variatie die voor deze VOCs waargenomen wordt. 35 % van de overblijvende 97% variatie kan niet verklaard worden door factoren die in deze studie meegenomen werden. Daarom is het aanbevolen om de verschillende factoren die kunnen bijdragen aan fluctuaties in uitgedemde VOCs (zoals concentraties VOC in omgevingslucht, voeding, gezondheidsstatus, genetische polymorfismen, omstandigheden bij staalname, enz.) meer in detail te bestuderen.

Twee preconcentratie methoden, die de chemische analyse (GC-MS) van de uitgedemde VOCs vooraf gaan, werden met elkaar vergeleken: de thermische desorptie GC-MS methode en de Entech 7100A preconcentratie GC-MS. Ze verschillen in gevoeligheid en in de meetbare VOC range.

De techniek om *nasale lavage* te collecteren, werd succesvol getest bij kinderen. De procedure werd nog een weinig aangepast om het nog minder invasief te maken (suggestie van Partner 3). Na deze aanpassing werd de opbrengst van CC16-eiwit en albumine in deze stalen nagegaan.

Uitgeademde lucht condensaat (EBC) werd geïncubated tijdens een rustige ademhaling door een RTube. Determinanten van variabiliteit in totale eiwitconcentratie, EBC volume en pH werden onderzocht bij volwassenen. Er werden geen significante verschillen waargenomen tussen staalnames op verschillende tijdstippen van de dag of op verschillende dagen, op voorwaarde dat de individuen reeds ervaring hadden met de collectiemethode. Er werd geen amylase activiteit (merker voor speekselcontaminatie) waargenomen in de EBC stalen. Een protocol om de eiwitten in deze stalen te concentreren, werd geselecteerd op basis van eiwit-recuperatie en reproduceerbaarheid. De methode die gebruik maakt van concentratie van eiwitten op beads, werd weerhouden. Na deze concentratie gebeurt een eiwitdigestie, en werden de resulterende peptiden gescheiden op basis van nano-vloeistofchromatografie. Detectie gebeurde met behulp van een MALDI-TOF/TOF massaspectrometer.

Om de niet-invasieve biomarkers te evalueren, werd een **pilotstudie** georganiseerd, met astmatische en gezonde kinderen. Kinderen met astma (n = 40) werden gerekruteerd in het Universitair Ziekenhuis van Antwerpen. Gezonde kinderen (n = 30) werden gerekruteerd bij personeel van de Universiteit Antwerpen en bij een basisschool in Antwerpen. De kinderen waren tussen 6 en 12 jaar oud. De volgende selectiecriteria werden toegepast: 5 kinderen per schooljaar, evenveel jongens als meisjes (astma: 20/20; controles: 17/13, ratio buitenlanders/autochtoon: 20/80 (gebaseerd op selectie op basis van naam). Het onderzoek omvatte NO metingen (zowel met NIOX MINO als met het EcoMedics toestel), EBC (RTube; 15 minuten met een niet-gecoate RTube, 10 minuten met een gecooate RTube), uitgeademde gassen (Tedlar zak), nasale lavage (links en rechts neusgat), en spirometrie (enkel bij de astmapatiënten). De pilotstudie laat toe de haalbaarheid van de verschillende metingen in deze leeftijdsgroep na te gaan, en help bij het identificeren van determinanten van variabiliteit voor de biomerkermetingen.

In de pilotstudie werden resultaten van het NIOX MINO en het EcoMedics toestel met elkaar vergeleken. De verkregen waarden van de twee toestellen waren goed met elkaar gecorreleerd ($r = 0.81$, $p < 0.001$). NO waarden verkregen met de NIOX MINO waren een weinig hoger vergeleken met de EcoMedics, maar ze kwamen goed met elkaar overeen. Omwille van de variabiliteit tussen de twee toestellen, is het aanbevolen om resultaten van beide toestellen niet samen te gebruiken in eenzelfde analyse. In de toekomst zullen we, onafhankelijk van het gebruikte toestel, steeds minstens twee metingen uitvoeren, waarvan het resultaat minder dan 10 % van elkaar afwijkt.

Er werden geen significante correlaties gevonden in deze groep tussen uitgeademd NO en leeftijd, lichaamslengte en -gewicht, en geslacht. Een significant verschil werd waargenomen tussen astmapatiënten en gezonde personen ($p = 0.004$ voor de EcoMedics, en $p = 0.027$ voor de NIOX MINO).

Nasale lavage vloeistof werd zowel in het linkse als in het rechtse neusgat geïncubated. Een goede correlatie in albumine/ureum ratio (log) ($r = 0.748$; $p < 0.0001$) en in CC16/ureum ratio (log) ($r = 0.556$; $p < 0.0001$) werd waargenomen tussen beide neusgaten. In de pilotstudie was de gemiddelde ratio albumine/ureum (\pm SD) $0.424 (\pm 0.566)$. De gemiddelde ratio CC16/ureum (\pm SD) was $3.39 \times 10^{-4} (\pm 6.07 \times 10^{-4})$. Er werden geen correlaties gevonden tussen deze ratio (log) en leeftijd, geslacht, lengte, gewicht of astma/gezonde controle.

pH van uitgeademde lucht condensaat werd gemeten in 500 µl van. Dit gebeurde exact 5 minuten na de collectie, zonder ontgassen van de stalen. De gemiddelde waarde (\pm SD) was 6.17 (\pm 0.29). De pH was significant lager in de astmagroep (6.07 ± 0.28) vergeleken met de gezonde controles (6.23 ± 0.29 ; Mann-Whitney U test: 0.047). LTB4 werd gemeten in de EBC stalen gecollecteerd met de gecoate RTube. De gemiddelde LTB4 concentratie was 60.05 (\pm 10.61) pg/ml in de pilootstudie. In de gezonde kinderen werden iets hogere waarden gemeten dan bij de astmapatiënten, maar het verschil was niet significant. Een positieve correlatie tussen LTB4 in EBC en CC16/ureum ratio in nasaal lavage werd waargenomen.

EBC werd gebruikt voor proteoomanalyse. Eiwitten werden geconcentreerd op beads, enzymatisch gedigereerd, en de resulterende peptiden werden gescheiden met behulp van nanoLC (vloeistofchromatografie). Peptiden in de verschillende fracties werden gedetecteerd in een MALDI-TOF massaspectrometer. MSMS analyses werden uitgevoerd om de verschillende eiwitten te identificeren. De meest abundante eiwitten werden geïdentificeerd als cytokeratines. Ook werden reeds enkele andere eiwitten geïdentificeerd, hoewel de identiteit van de meesten op dit moment nog onderzocht wordt. Om het eiwitpatroon tussen twee groepen te vergelijken, werd het gebied onder de curve (area) van de peptiden gecorrigeerd voor de area van de interne standaard in diezelfde fractie. Voor verdere statistische analyse werd gebruik gemaakt van Support Vector Machine analyse. Hoewel de astmagroep uit 4 groepen bestond (geen astma, gecontroleerd astma, matig gecontroleerd astma en niet gecontroleerd astma), werden enkel de individuen met matig en niet gecontroleerd astma meegenomen in de analyse, en vergeleken met de volledige controlegroep. Preliminare analyse van het peptidenpatroon resulteerde in een classificatiemodel dat alle individuen correct (100%) classificeert op basis van hun astma status.

De uitgeademde gassen die in de Tedlar zakken gecollecteerd werden, werden overgebracht in de thermodesorptie tubes, en nadat een referentie component (2-fluorotolueen) was toegevoegd, werd een GC/MS analyse uitgevoerd. Een a-polaire kolom werd gebruikt en de detectie gebeurde in full scan modus (m/z van 25 tot 250). De respons van de verschillende signalen van alle stalen werd gecombineerd in één databank. Enkele stalen werden uitgesloten uit de databank doordat de retentietijd van de referentiestof te veel afweek van de verwachte tijd.

Ook hier werd Support Vector Machine analyse gebruikt voor statistische analyse. Opnieuw werden enkel astmapatiënten met matig en niet gecontroleerd astma vergeleken met de controlegroep. Het meest optimale classificatiemodel klasseert alle individuen juist (100%) op basis van hun astma status.

In deze studie zullen een bestaande en een nieuwe **cohorte van kinderen** gebruikt worden om omgevingsfactoren voor respiratoire ziekten bij kinderen te bestuderen door gebruik te maken van niet-invasieve methoden. De geoptimaliseerde niet-invasieve biomarkers zullen toegepast worden in

- 1) een opvolging van de bestaande cohorte van kinderen van de Vlaamse Milieu en Gezondheid studie, op de leeftijd van 6 jaar.
- 2) een nieuwe cohorte van schoolkinderen blootgesteld aan specifieke risicofactoren (gechloreerde producten).

De nieuwe biomarkers zullen bestudeerd worden in combinatie met klassieke klinische eindpunten (bv. astma gediagnosticeerd door een dokter, respiratoire symptomen, longfunctie, inspanningsastma). De cohortes van kinderen zullen gebruikt worden om de hypothese te testen dat de niet-invasieve effect biomarkers gerelateerd zijn aan respiratoire gezondheid.

Een vragenlijst gefocust op respiratoire gezondheid en binnenhuis omgeving werd samengesteld, gebaseerd op de ervaring uit eerdere studies en op data uit relevante literatuur. De vragenlijst geeft een idee van binnenhuis chemische blootstelling, andere risicofactoren voor astma en allergie (bv familiale geschiedenis) en respiratoire klachten bij kinderen. Deze vragenlijst zal gebruikt worden in de opvolging van de bestaande cohorte en in de nieuwe cohorte. Een statistisch analyseplan werd opgesteld.

De nieuwe cohorte werd reeds opgestart in september 2007. In totaal werden 425 kinderen in 30 scholen in Brussel, Luik en Louvain-la-Neuve gerekruteerd. De vragenlijst die door de ouders werd ingevuld bevatte 60 vragen over de gezondheid van het kind, doorgemaakte ziekte, astma bij de ouders en allergische ziekten, de algemene omgeving, binnenhuisomgeving (huisdieren, sigarettenrook, gebruik van luchtverfrissers en poetsmiddelen...) en sportactiviteiten. De onderzoeken bevatten NO metingen, spirometrie, EBC collectie, urinestaal, collectie van nasale lavage, en een Rhinostick test. De biomerker analyses zijn momenteel aan de gang.

Als besluit kunnen we stellen dat er 4 procedures voor niet-invasieve biomerkers ontwikkeld en geoptimaliseerd werden. De proteoom en metaboom analyses op de uitgeademde lucht dienen verder geoptimaliseerd te worden. De methodes werden met succes toegepast in jonge kinderen. De gunstige resultaten van de methode ontwikkeling en de succesvolle rekrutering van een nieuwe kindcohorte pleiten voor een verder zetting van fase II van het ANIMO project. In deze fase worden de nieuwe niet-invasieve methodes toegepast in de Vlaamse cohort van het Steunpunt Milieu en gezondheid en in de nieuwe kindcohorte.