

Heinrich-Heine-Universität

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Klinik für Kinderkardiologie und Pneumologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Klaus G. Schmidt

Atemwegsinfektion und -remodeling bei Kindern mit

Asthma bronchiale:

Methodik und Wertigkeit noninvasiver Messverfahren

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Kinderheilkunde der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Christiane Lex

Düsseldorf 2007

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung	3
1.1	Bedeutung von Atemwegsinfektion und –remodeling bei Kindern mit Asthma bronchiale: Bewertung anhand von Untersuchungen an Bronchial-Biopsaten	3
1.2	Noninvasive Untersuchungsverfahren zur Evaluierung von Atemwegsinfektion und -remodeling	9
1.2.1	Messung des exhalieren Stickstoffmonoxids	9
1.2.2	Analyse des induzierten Sputums	13
1.2.3	Analyse des Atemkondensats	17
1.3.	Fragestellungen	18
2.	Eigene Untersuchungen	20
2.1	Exhalieren Stickstoffmonoxid und andere Surrogat-Tests als Prädiktoren für die belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bei Kindern mit intermittierendem bis mittelschwer persistierendem atopischen Asthma bronchiale	20
2.2	Klinischer Nutzen verschiedener noninvasiver Untersuchungsmethoden zur Messung der Atemwegsinfektion im Rahmen der Reduktion der inhalativen Steroide bei Kindern mit stabilem Asthma bronchiale	22
2.3	Sputuminduktion bei Kindern mit schwerem Asthma: Sicherheit, Machbarkeit und inflammatorische Zellprofile	24
2.4	Vergleich noninvasiver und invasiver Untersuchungsmethoden zur Messung der Atemwegsinfektion bei Kindern mit mittelschwerem bis schwerem Asthma bronchiale	26
2.5	Vorhersagewert der prozentualen Eosinophilenzahl im induzierten Sputum für das Ansprechen auf eine orale Kortikosteroidtherapie bei Kindern mit schwerem Asthma bronchiale	28
2.6	Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat als noninvasiver Marker des Atemwegsremodelings	30
3.	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und Diskussion	32
4.	Zusammenfassung	41
5.	Literatur	44

	Seite
6. Danksagungen	59
7. Lebenslauf	61
8. Publikationsliste	63
9. Anlagen	66

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Atemwegsinfektion und –remodeling bei Kindern mit Asthma bronchiale: Bewertung anhand von Untersuchungen an Bronchialbiopsaten

Das Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter, von der in Deutschland rd. 10 Prozent aller Kinder betroffen sind. Die Prävalenz ist wie bei anderen allergischen Erkrankungen des Kindesalters in den letzten Jahrzehnten in den Industrienationen deutlich steigend; in den letzten 20 Jahren hat mehr als eine Verdoppelung stattgefunden. Die mit der Erkrankung verbundenen Arztbesuche, Medikamente und Krankenhausaufenthalte haben für das Gesundheitssystem hohe Kosten zur Folge. Nur durch eine adäquate Langzeittherapie, verbunden mit einem entsprechenden Therapiemonitoring, lässt sich eine gute Lebensqualität für die betroffenen Kinder erreichen. Zusätzlich können Komplikationen der Erkrankung vermieden und Kosten eingespart werden. Das schwere Asthma bronchiale stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar. Definitionsgemäß haben die Patienten mit schwerem Asthma, darunter auch Kinder und Jugendliche, täglich Symptome trotz einer Behandlung mit hohen Dosen an inhalativen und teilweise auch systemischen Kortikosteroiden und anderen Pharmaka (ERS Task Force, 1999). Zwar sind nur 5% der Asthmatiker von einem solchen Schweregrad der Erkrankung betroffen, sie verursachen jedoch einen hohen Anteil der Gesundheitskosten für die Krankheitsgruppe.

Pathophysiologisches Hauptcharakteristikum des Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Bronchien; dies ist aus Bronchialschleimhautbiopsien von erwachsenen Asthmatikern seit den 80er Jahren bekannt (Lundgren et al., 1988; Bousquet et al., 1990; Bousquet et al., 1991). Die chronische Entzündung entsteht dadurch, dass nach Allergenkontakt bei spezifischer Sensibilisierung oder anderen Auslösern inflammatorische Mediatoren durch die in die Lunge eingewanderten Entzündungszellen ausgeschüttet werden. In der Folge kommt es hierbei zu komplexen Interaktionen, die zu einer reversiblen Verengung der bronchialen Lumina führen. Als wahrscheinliche Haupteffektorzellen der allergischen asthmatischen Atemwegsentzündung wurden die Eosinophilen und Mastzellen identifiziert. Diese werden durch Th2-Helferzellen unterstützt. (Robinson et al., 1993; Kon und Kay, 1999). In endobronchialen Biopsiepräparaten von Erwachsenen mit mildem

allergischen Asthma wurde gezeigt, dass die Zahl der aktivierten CD4-positiven Th2-Zellen erhöht ist, gleichzeitig die Th2-regulatorischen Zytokine Il-4 und Il-5 dominieren und die Eosinophilen-Chemokine wie Eotaxin und RANTES gesteigert nachweisbar sind (Jeffery, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Asthmatikern die Anzahl der Mastzellen in der Atemwegsmuskulatur und in der Mukosa erhöht ist (Carroll et al., 2002; Brightling et al., 2002). Übereinstimmend wird jedoch eine Erhöhung der Eosinophilenzahl in endobronchialen Biopsiepräparaten als das bedeutendste histologische Merkmal beim allergischen Asthma bronchiale angesehen (Wenzel, 2006). So wurde auch der Begriff des „eosinophilen Asthma bronchiale“ geprägt. Während in den meisten Biopsiestudien mit erwachsenen Asthmatikern eine solche eosinophile Atemwegsentzündung bei einem Grossteil der Patienten nachgewiesen wurde, sind die Ergebnisse der wenigen Biopsiestudien mit asthmatischen Kindern nicht eindeutig. Barbato et al. (2003 und 2006) konnten in endobronchialen Biopsiepräparaten bei Kindern mit Asthma eine signifikant höhere Anzahl an Eosinophilen als bei nichtatopischen Kontrollkindern nachweisen. Der Vergleich zu atopischen Kontrollkindern ohne Asthma ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. In der Studie von Payne et al. (2004b) war die Eosinophilendichte der an Asthma erkrankten Kinder in den endobronchialen Biopsien nicht höher als die der Kontrollpersonen. Einschränkend muss hier allerdings angemerkt werden, dass die Asthma-Patienten in dieser Studie alle mit hochdosierten inhalativen und gleichzeitig auch mit systemischen Steroiden behandelt waren. Auch waren die Kontrollpersonen pulmonal nicht gesund: Sie hatten zwar kein Asthma, aber andere pulmonale Erkrankungen als klinische Indikation für die durchgeführte Bronchoskopie. Die Studie stellt somit auch die ethischen Schwierigkeiten dar, die im Kindesalter bei Biopsiestudien auftreten, insbesondere bei der Rekrutierung von Kontrollpersonen. Darüber hinaus sind die kindlichen Asthmatiker, die aus klinischer Indikation bronchoskopiert werden, meist Kinder mit schwerem Asthma. Diese erhalten wegen der Schwere ihrer Erkrankung fast immer hochdosierte inhalative und ggf. systemische Steroide, so dass die Aussagekraft aus der Biopsie bezüglich charakteristischer biochemischer oder zellulärer Veränderungen immer mit Einschränkungen belastet sein wird. Trotz dieser Einschränkungen, die es in gleicher Weise bei erwachsenen Patienten kaum gibt, ließen sich innerhalb der Gruppe der Kinder mit schwerem Asthma jedoch charakteristische Subgruppen identifizieren. So fand sich in der o.g. Studie von Payne et al. (2004b) bei Kindern mit einer persistierenden obstruktiven Ventilationsstörung eine signifikant höhere Dichte an CD4-positiven T-Lymphozyten im Vergleich zu Kindern ohne eine solche Veränderung.

Auf der Suche nach Pathomechanismen für das schwer verlaufende Asthma bronchiale wurde vor einigen Jahren neben dem „eosinophilen Asthma bronchiale“ in endobronchialen Biopsiepräparaten noch ein zweiter Phänotyp charakterisiert, und zwar das „nicht-eosinophile Asthma bronchiale“ (Wenzel et al., 1999). Zu diesem 2. Phänotyp gehört auch das „neutrophile Asthma bronchiale“, das insbesondere beim schweren Asthma eine bedeutende Rolle spielen soll (Jatakanon et al., 1999). Zum „nicht-eosinophilen Asthma bronchiale“ wird darüber hinaus auch das „pauci-granulozytäre Asthma bronchiale“ gezählt, bei dem durch Analyse der Sputumzellprofile weder eine eosinophile noch eine neutrophile Atemwegsentzündung identifiziert werden kann (Simpson et al., 2005; Wenzel, 2006). Detaillierte Untersuchungen zu den unterschiedlichen inflammatorischen Phänotypen beim Asthma bronchiale wurden insbesondere mittels Sputumuntersuchungen für erwachsene Patienten durchgeführt und werden näher in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Im Kindesalter wurden die hier beschriebenen, durch unterschiedliche zelluläre Profile charakterisierte Asthma-Phänotypen bisher noch nicht unterschieden.

Die Atemwegsentzündung ist nicht nur pathophysiologisches Hauptcharakteristikum des Asthma bronchiale, sondern spielt höchstwahrscheinlich auch eine wesentliche Rolle für den Langzeitverlauf der Erkrankung (Sears, 2002). Der Praktikabilität halber orientiert man sich jedoch weiterhin gemäß den aktuellen Richtlinien zum klinischen Monitoring des Asthmas primär an Symptom-Berichten und Lungenfunktions-Messungen (Leitlinie „Asthma bronchiale im Kindesalter und Jugendalter“ der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, 2006; Nationale Versorgungsleitlinien, 2006; „British guideline on the management of asthma“, British Thoracic Society, 2003). Die Symptome werden jedoch oft von Patienten nicht objektivierbar geschildert oder sie werden nach langer Krankheitsdauer vom Asthmatiker subjektiv gar nicht mehr wahrgenommen (Panditi et al., 2003). Auch in Phasen scheinbarer klinischer Remission wurden chronische Entzündungsreaktionen der Bronchialschleimhaut nachgewiesen (van den Toorn et al., 2001). Lungenfunktionsbefunde sind von der Kooperation der Patienten abhängig, die sich oft - insbesondere im Kindesalter - als schwierig erweist. Auch sind Ruhelungenfunktionsbefunde im Kindesalter auch bei persistierenden Symptomen nach gängigen Kriterien sehr häufig als normal zu werten (Bacharier et al., 2004). Es wäre unbedingt sinnvoll, die individuelle Diagnostik und Therapiesteuerung durch einen Marker der Atemwegsentzündung zu ergänzen.

Traditionell wird das Ausmaß der Atemwegsentzündung beim Asthma mittels Untersuchung endobronchialer Biopsien bestimmt. Alternativ erfolgt oft eine Zellprofilanalyse der bronchoalveolären Lavage (BAL). Ob die beiden Methoden in ihrer Aussagekraft

gleichwertig sind, oder ob die endobronchiale Biopsie grundsätzlich den Goldstandard darstellt, ist noch unklar. Beide Methoden werden mittels Bronchoskopie durchgeführt, sind invasiv und können insbesondere im Kindesalter zur langfristigen Verlaufskontrolle nicht regelmäßig angewandt werden.

Aktuell werden im Rahmen des Asthmonitorings oft Provokationsmethoden zur Untersuchung der bronchialen Hyperreagibilität angewandt, die auch zur Diagnosestellung des Asthma bronchiale dienen. Hierzu stehen zeitaufwendige Methoden wie z.B. pharmakologische Provokationen, die Laufbelastung oder die Kaltfluthyperventilation zur Verfügung. In einer klinischen Studie zum Langzeit-Therapie-Management mit erwachsenen Asthmatikern wurde von Sont et al. (1999) festgestellt, dass in der Gruppe der Patienten, die nach einer Strategie behandelt wurden, die das Ausmaß der Hyperreagibilität zu reduzieren versuchte, weniger Asthmaexazerbationen auftraten als in der Gruppe der Patienten, die wie üblich nach ihrer berichteten Symptomatik und ihren Lungenfunktionsbefunden behandelt wurden. Die Hyperreagibilität der Atemwege wird zwar als klinisches Korrelat der bronchialen Inflammation gesehen, spiegelt jedoch nur zu einem Teil das Ausmaß der Atemwegsinfektion wieder. Bei der trotz Therapie mit Kortikosteroiden persistierenden Hyperreagibilität scheinen nämlich über die bronchiale Inflammation hinaus eher strukturelle Veränderungen der Atemwege ursächlich eine Rolle zu spielen (Cockcroft and Davis, 2006). Seit einigen Jahren werden daher andere noninvasive Methoden zur Evaluierung der Atemwegsinfektion erforscht, die besser das Ausmaß der Atemwegsinfektion widerspiegeln und teilweise auch weniger zeitaufwendig sind (siehe Kapitel 1.2).

Neben der chronischen Atemwegsinfektion spielt das so genannte „Atemwegsremodeling“ ebenfalls eine große Rolle in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale. Diesbezüglich gibt es auch für das Kindesalter seit einigen Jahren erste Erkenntnisse. Beim Atemwegsremodeling handelt es sich um strukturelle Veränderungen im Bereich der Bronchien, die letztendlich zum „Umbau“ mit „Wandverdickung“ der Atemwege führen. Typische morphologische Parameter, wie sie bei erwachsenen Asthmatikern beschrieben wurden, sind das Abschilfern des Bronchialepithels, die subepitheliale Kollagendeposition, die als Verdickung der retikulären Basalmembran zu erkennen ist, die Hyperplasie der Schleimdrüsen, Zeichen der Angiogenese und die Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur (Jeffery, 2001). Aktuell wird diskutiert, ob diese strukturellen Veränderungen irreversibel sind und eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und der klinischen Symptomatik bewirken (Pohunek, 2006), wenn auch der

Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der strukturellen Veränderungen und dem Schweregrad des Asthmas noch nicht eindeutig geklärt ist (Wenzel, 2003). Das Fehlen von eindeutig Erfolg versprechenden therapeutischen Optionen zur Verbesserung dieser Veränderungen ist vor allem im immer noch unzureichenden Wissen über die Pathogenese des Remodelings begründet. Lange Zeit galt die Auffassung, dass die strukturellen Veränderungen der Bronchien als Folge einer langjährigen chronischen Entzündung zu werten sind. Diese Auffassung begründete das therapeutische Konzept, möglichst frühzeitig bei Asthmatikern eine antientzündliche Therapie zu initiieren (z.B. durch inhalative Kortikosteroide), um dadurch konsekutive strukturelle Veränderungen des Bronchialsystems und damit eine Verschlechterung der klinischen Situation zu verhindern. Kürzlich konnte jedoch eine klinische Studie von Payne et al. (2003) zeigen, daß strukturelle Veränderungen im Sinne eines Remodelings bei Kindern bereits im gleichen Ausmaß wie bei Erwachsenen vorliegen. Diese Aussage ergab sich aus dem Vergleich der jeweiligen Dicke der retikulären Basalmembran in den Biopsien der bronchialen Schleimhaut von 19 Kindern mit schwerem Asthma, 10 Erwachsenen mit mildem Asthma und 9 Erwachsenen, die aufgrund eines lebensbedrohlichen Asthmaanfalls intubiert wurden. Die Ergebnisse von Payne et al. (2003) wurden in einer unabhängigen italienischen Studie bestätigt: Barbato et al. (2003) ermittelten bei 9 asthmatischen Kindern mit mildem bis mittelschwerem Asthma ein ähnliches Ausmaß der Dicke der retikulären bronchialen Basalmembran wie Payne et al. (2003) bei ihren Studienteilnehmern. In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit von Barbato et al. (2006) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Abschilfern des Bronchialepithels, ein bei Erwachsenen typisches Merkmal des Atemwegsremodelings, bei Kindern mit Asthma ebenfalls nachgewiesen werden kann. Der überraschende Befund dieser Studien, dass nämlich bereits Kinder mit Asthma deutliche histopathologische Zeichen des Atemwegsumbaus, des „Remodelings“, aufweisen, die sich von den bei erwachsenen Asthmatikern gefundenen Veränderungen kaum unterscheiden, führte zu der Arbeitshypothese, dass das Remodeling weniger eine Folge der chronischen Entzündung ist, sondern dass sich beide Pathomechanismen parallel entwickeln, evtl. sogar unabhängig voneinander. Mit der Frage, ob Kleinkinder bereits Zeichen eines Atemwegsremodelings aufweisen, wurde von Saglani et al. (2005) eine Studie an Kindern durchgeführt, die jünger als 27 Lebensmonate waren und eine asthmatische Symptomatik mit rezidivierend auftretendem Giemen und objektiv gemessener reversibler Atemwegsobstruktion hatten. Es zeigte sich bei diesen jungen Kindern noch keine Basalmembranverdickung im Sinne eines Atemwegsremodelings, so dass derzeit

davon ausgegangen wird, dass sich typische Merkmale des Atemwegsremodelings höchstwahrscheinlich nicht vor dem 3. Lebensjahr manifestieren.

Aktuell wird postuliert, dass dem Atemwegsremodeling wahrscheinlich andere Induktionsmechanismen zugrunde liegen als der Entzündungsreaktion. In einigen Studien konnten bereits Hinweise auf einen Einfluß von verschiedenen Zytokinen und Mediatoren wie z.B. IL-11, IL-13, Cysteinyl-Leukotrienen (cysLTs) und Wachstumsfaktoren wie z.B. Transforming Growth Faktor Beta 1 auf die Pathogenese des Atemwegsremodelings gefunden werden (Sagara et al., 2002; Zhu et al., 2001, Henderson et al., 2002). Diese Mediatoren wirken zwar teilweise auch proinflammatorisch, sie scheinen aber auch direkt strukturelle Veränderungen der Atemwege zu bewirken. Da diese in vitro und im Mausmodell erhobenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf Kinder übertragbar sind, erscheinen entsprechende Studien im Kindesalter, also der Lebensphase, in der sich das Remodeling wahrscheinlich entwickelt, essentiell, um die Pathophysiologie weiter entschlüsseln und damit letztendlich den strukturellen Umbauvorgängen an den Bronchien frühzeitig vor irreversibler Schädigung entgegenwirken zu können.

Der Goldstandard zur Untersuchung des Atemwegsremodelings ist die histologische Untersuchung der endobronchialen Biopsie. Hierbei gilt die Dicke der retikulären Basalmembran als einer der wichtigsten morphologischen Parameter mit dem Vorteil, dass sie auch in kleineren Biopsieproben meist repräsentativ und relativ einfach zu messen ist. Auch konnte in Gewebeproben von verstorbenen erwachsenen Patienten mit und ohne Asthma gezeigt werden, dass im Bereich der zentralen Atemwege die Dicke der retikulären Basalmembran mit anderen charakteristischen Befunden des Remodelings, nämlich den prozentualen Anteilen an glatter Atemwegsmuskulatur und submukösen Schleimdrüsen korreliert (James et al., 2002). Als noninvasives Verfahren zur Erfassung des Atemwegsremodelings wurde bei erwachsenen Asthmatikern die Messung der Dicke der Bronchialwand in der hochauflösenden Computertomographie beschrieben (Kasahara et al., 2002). Im Kindesalter zeigen ähnliche Studien unterschiedliche Ergebnisse (Saglani et al., 2006, de Blic et al., 2005). Aufgrund der Strahlenbelastung kann die Computertomographie jedoch sicherlich nicht regelmäßig im Asthmonitoring angewandt werden, so dass hier nach anderen Untersuchungsmethoden gesucht werden muss.

1.2 Noninvasive Untersuchungsverfahren zur Evaluierung von Atemwegs-inflammation und -remodeling

Die Untersuchung der Ausatemluft und des Sputums bietet bei Patienten mit Asthma bronchiale eine Fülle von Möglichkeiten, weitere Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung zu bekommen, potentielle Marker der Atemwegsentszündung und des – remodeling zu identifizieren und ggf. später in der klinischen Routine anzuwenden.

Verschiedene Marker können in der Ausatemluft entweder im Gaszustand (z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenmonoxid (CO), Ethan und Methan) oder in der flüssigen Zustandsform, im Atemkondensat (z.B. Hydrogenperoxid) gemessen werden. Im induzierten Sputum können sowohl typische Zellprofile identifiziert als auch zusätzlich verschiedene Mediatoren im Überstand gemessen werden.

1.2.1 Messung des exhalieren Stickstoffmonoxids

Hintergrund

Unter den noninvasiven Untersuchungsverfahren zur Messung der Atemwegsinfektion nimmt die Messung des Stickstoffmonoxids im Exhalat (eNO) derzeit eine herausragende Stellung ein. Dies liegt vor allem daran, dass einige Studien in den letzten Jahren hinsichtlich des klinischen Nutzens der eNO-Messung recht viel versprechende Ergebnisse lieferten. Mittlerweile ist eNO recht einfach und unkompliziert zu messen.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebige Molekül, das eine broncho- und vasodilatatorische Wirkung ausübt und auch an der Keimabwehr und der Immunregulation beteiligt ist. 1991 wiesen Gustafsson et al. erstmals NO in menschlicher Ausatemluft nach, 1993 beschrieben Alving et al. dann eine erhöhte Konzentration in der Ausatemluft bei Asthmatikern. Dieses Phänomen erklärt sich so: Im Falle einer Atemwegsinfektion tragen proinflammatorische Zytokine zu einer vermehrten Expression der NO-Synthase in Epithelzellen bei, was zu einer Freisetzung von NO im Atemwegsepithel führt (Ricciardolo et al., 2004; Kharitonov und Barnes, 2001). Ein Teil des gebildeten NO diffundiert ins Atemwegslumen und kann dann in der Ausatemluft vermehrt gemessen werden.

Messmethode

NO kann in der Ausatemluft mithilfe der Chemilumineszenztechnik gemessen werden. Aktuell werden verschiedene NO-Analysatoren kommerziell angeboten, und es liegen eine gemeinsame Empfehlung der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) zum praktischen Messablauf sowie eine Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen zu dieser Methode vor (ATS/ERS, 2005). Da der eNO-Wert durch Atemmanöver und Messablauf erheblich beeinflusst wird, müssen die Standard-Empfehlungen genau beachtet werden (ATS/ERS, 2005). Dabei ist der eNO-Wert umgekehrt proportional zum Atemfluss, und die Beimengung von nasaler Luft muss wegen der 50- bis 100fach höheren NO-Konzentrationen in den oberen Atemwegen verhindert werden.

Es gibt zwei unterschiedliche Messverfahren: Bei der so genannten *Online-NO-Messung* nach der „Single-Breath-Methode“ wird NO aus dem Ausatemstrom abgesaugt und direkt analysiert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man den Atemfluss anhand eines visuellen Feedbacks direkt kontrollieren kann, so dass während der Messung die Aufrechterhaltung eines konstanten definierten Atemflusses überprüft werden kann. Bei der zweiten Methode, der so genannten *Offline-NO-Messung* wird die Ausatemluft in impermeablen Ballons aufgefangen und später analysiert. Grundsätzlich gilt, dass bei kooperativen Kindern ab 4 bis 5 Jahren die *Online-NO-Messung* wegen der besseren Standardisierung der Methodik durchgeführt werden sollte. Bei diesem Verfahren soll das Kind nach einer 5-minütigen Ruhephase durch den Mund zunächst tief einatmen. Wir konnten nachweisen, dass die Inspirationszeit für die Messung keine Rolle spielt (Zacharasiewicz et al., 2004). Das eingeatmete Gas sollte immer einen NO-Gehalt von unter 5 ppb aufweisen. Falls die Raumluft-NO-Konzentration darüber liegt, muss NO-freie Luft aus einem speziellen Reservoir eingeatmet werden. Die Ausatmung erfolgt dann mit einem konstanten Atemfluss von 50 ml/sec gegen einen Widerstand mit einem Munddruck zwischen 5 und 20 cm H₂O. Durch diesen Widerstand wird eine Schließung des weichen Gaumens bewirkt, wodurch die Kontamination der Atemluft durch nasales NO verhindert wird. Die Ausatmung muss für mindestens vier Sekunden aufrechterhalten werden, wobei sich ein stabiles NO-Plateau von mindestens zwei Sekunden Dauer einstellt und die Variabilität der NO-Werte unter 10% oder unter 1ppb liegt. Das Plateau repräsentiert das NO, das aus den unteren Atemwegen freigesetzt wird, und wird zur Messung herangezogen. Das Manöver wird in Intervallen von mindestens 30 Sekunden mehrfach wiederholt. Wenn 2 Plateau-Konzentrationen um weniger als 5% oder 3 Werte um weniger als 10% voneinander abweichen, kann die Messung beendet und eNO als Mittelwert angegeben werden. Für die Online-Methode müssen die Probanden in

der Lage sein, ihren Atemfluss entsprechend kontrollieren zu können. Daher ist dieses Verfahren erst für Kinder ab 4 bis 5 Jahren geeignet.

Bei der *Offline-NO-Messung* wird das Atemmanöver analog zur oben beschriebenen Online-Methode durchgeführt und die NO-Konzentration innerhalb weniger Stunden im Ballon gemessen werden. Dieses Verfahren kann auch bei jüngeren Kindern eingesetzt werden, die ihren Atemfluss noch nicht kontrollieren können. Der eindeutige Nachteil besteht jedoch darin, dass es nicht möglich ist, einen kontrollierten Flow und ein zeitlich definiertes NO-Plateau zu erreichen. Zur eNO-Messung bei nicht-kooperativen Säuglingen und Kleinkindern mit der Offline-Methode existieren erste Erfahrungen, aber bislang keine validen Normalwerte oder Empfehlungen für den Einsatz in der klinischen Routine.

Für die Beurteilung des individuellen eNO-Messergebnisses, das mit der häufiger durchgeführten Online-Methode bestimmt wurde, können kürzlich publizierte alters- bzw. körperlängenbezogene Normalwerte von Buchvald et al. (2005) und Malmberg et al. (2006) herangezogen werden. Der obere Normwert liegt bei Kindern von 4 bis 17 Jahren bei 15 bis 25 ppb mit einer mittleren Zunahme von 1 ppb pro Lebensjahr (Buchvald et al., 2005). Bei der Interpretation der Resultate muss jedoch beachtet werden, dass verschiedene Einflussfaktoren eine Rolle spielen: Eine signifikante Erhöhung der eNO-Werte findet man z.B. bei atopischen Kindern im Vergleich zu nichtatopischen Kontrollpersonen (Frank et al., 1998). Bei Patienten mit akuten Infekten der Atemwege ist die eNO-Konzentration ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu infektfreien Patienten (Kharitonov et al., 1995a; Murphy et al., 1999). Auch Umweltfaktoren wie z.B. der Ozongehalt der Luft sowie die Aufnahme nitrat- oder nitrithaltiger Nahrungsmittel wie z.B. Salat können eine Erhöhung der eNO-Werte bewirken (Nightingale et al., 1999; van Amsterdam et al., 1999; Zetterquist et al., 1999). Eine signifikante Verminderung der eNO-Werte kann dagegen durch Rauchen oder Alkoholkonsum hervorgerufen werden (Persson und Gustafsson, 1992; Kharitonov et al. 1995b; Yates et al. 1996). Des Weiteren können auch einige routinemäßig eingesetzte Tests zu einer vorübergehenden Reduzierung des exhalieren Stickstoffmonoxids führen wie z. B. wiederholte Spirometrien (Silkoff et al., 1999; Deykin et al., 2000). Nach körperlicher Belastung wurden sowohl erniedrigte Werte als auch unveränderte eNO-Konzentrationen gemessen (Persson et al., 1993; Phillips et al., 1996; Scollo et al., 2000). Die eNO-Messung soll jedenfalls immer vor der Lungenfunktionsmessung und vor einer eventuell geplanten Provokation erfolgen.

Klinische Anwendung

Bald nach der Mitteilung, dass Asthmatiker im Vergleich zu Normalpersonen erhöhte eNO-Werte haben (Alving et al., 1993), wurde berichtet, dass die gemessenen eNO-Werte bei Asthmatikern im Verlauf einer inhalativen oder oralen Steroidtherapie sinken (Kharitonov et al., 1996; Baraldi et al., 1997). Dadurch entstand erstmalig die Hoffnung, dass eNO im Therapiemonitoring des Asthma bronchiale eingesetzt werden könnte.

Später wurden Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen den gemessenen eNO-Werten und dem Ausmaß der Atemwegsinfektion, wie sie mittels endobronchialer Biopsie, Sputum- und BAL-Analyse gemessen wird, durchgeführt (Piacentini et al., 1999; Lim et al., 1999; Lim et al., 2000, Warke et al., 2002, van den Toorn et al., 2001, Payne et al., 2001; Silkoff et al., 2005). Generell korrelieren die eNO-Messwerte positiv mit der Prozentzahl der Eosinophilen im induzierten Sputum oder in der BAL (Piacentini et al., 1999; Warke et al., 2002). Die Studienergebnisse zur Korrelation von eNO-Werten und den Eosinophilenzahlen in der endobronchialen Biopsie sind jedoch kontrovers. Payne et al. (2001a) konnten bei Kindern mit schwerem Asthma eine signifikante Korrelation zwischen eNO-Werten und den Eosinophilenzahlen in der endobronchialen Biopsie erheben. Van den Toorn et al. (2001) berichteten von ähnlichen Ergebnissen in einer Gruppe von jungen Erwachsenen mit Asthma in klinischer Remission. Silkoff et al. (2005) stellten nur bei Erwachsenen mit schwerem Asthma und nicht bei Erwachsenen mit leichtem bis mittelschwerem Asthma eine signifikante Korrelation zwischen den beiden genannten Parametern fest. Lim et al. (2000) konnten bei erwachsenen Patienten gar keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den gleichen Parametern erheben. In ihrer Studiengruppe hatten alle Patienten ein leichtes bis mittelschweres Asthma bronchiale. Aktuell geht man jedoch davon aus, dass die gemessenen eNO-Werte zumindest grob das Ausmaß der eosinophilen Atemwegsentzündung widerspiegeln. Man weiss aber auch, dass einige asymptomatische Asthma-Patienten unklar hohe eNO-Werte haben und diese auch nach Intensivierung einer inhalativen Steroidtherapie und Optimierung der Inhalationstechnik nicht rückläufig sind (Pijnenburg et al., 2005b). Hier stellt sich die Frage, ob bei diesen Patienten wirklich eine eosinophile Atemwegsentzündung, wie sie z.B. in der endobronchialen Biopsie erfasst werden könnte, vorliegt.

Einige Studien untersuchten auch den Nutzen der eNO-Messung zur Diagnosestellung eines Asthma bronchiale. Dabei sind u.a. die Sensitivität und Spezifität der eNO-Bestimmung in Abhängigkeit vom gewählten Grenzwert untersucht worden. So hatte bei erwachsenen Asthma-Patienten mit Atemwegssymptomen ein eNO-Wert über 16 ppb eine Spezifität für die

spätere Asthma-Diagnose von 90%. Der positive prädiktive Wert lag bei über 90% (Dupont et al., 2003). In einer anderen Arbeit wurde die diagnostische Genauigkeit von eNO mit einer Sensitivität von 88% als deutlich überlegen gegenüber der von konventionellen Methoden wie Peak-Flow-Messungen, Spirometrie und dem Ansprechen auf einen Therapieversuch beschrieben, die eine maximale Sensitivität von 47% hatten (Smith et al., 2004). Bei jungen Kindern hatte das mit der Offline-Methode gemessene eNO bei einem Wert von 2.9 bis 3.8 ppb bereits eine Sensitivität von 77% zur Differenzierung zwischen Asthma und idiopathischem chronischen Husten bzw. 88% zur Differenzierung zwischen Kindern mit Asthma und gesunden Kindern (Avital et al., 2001). Auch im Vorschulalter ist die Online-Messung von eNO in ihrer diagnostischen Aussagekraft der Basislungenfunktion und der Lungenfunktion nach Bronchospasmolysetest mit einer Sensitivität von 86% und einer Spezifität von 92% überlegen (Malmberg et al., 2003).

Mit der Frage, ob die eNO-Messung auch im Therapiemonitoring sinnvoll sein kann, führten Jatakanon et al. (2000) erstmalig eine prospektive Langzeitstudie an einer kleinen Anzahl von erwachsenen Asthmatikern durch, die unter ihrer Dauertherapie eine gut kontrollierte Symptomatik hatten. Bei 15 Patienten wurde vor und 8 Wochen nach einer Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Steroiden u.a. regelmäßig eNO gemessen. Das Ergebnis war hinsichtlich der Wertigkeit der eNO-Messung enttäuschend: eNO-Werte, die vor der Dosisreduktion gemessen wurden, konnten nicht eventuell im Verlauf auftretende Asthmaexazerbationen vorhersagen. Jones et al. (2001b) untersuchten 87 erwachsene Asthmatiker unter einer ähnlichen Fragestellung, nämlich ob eNO-Werte eine signifikante Symptomverschlechterung nach Absetzen der inhalativen Kortikosteroide vorhersagen können. Es zeigte sich diesmal, dass ein eNO-Wert von > 15 ppb vor Absetzen der Steroide einen positiven prädiktiven Wert von 88% hatte, eine signifikante Verschlechterung der Asthmasymptomatik vorherzusagen. Diese erstmalig an einer größeren Patientenzahl durchgeführte Langzeitstudie unterstützt somit die Auffassung, dass eNO-Messungen im Asthamonitoring sinnvoll sein können.

1.2.2 Analyse des induzierten Sputums

Hintergrund

Die Untersuchung des Sputums von Patienten mit Asthma bronchiale war bereits Ende des 19. Jahrhunderts für Zytopathologen von Interesse, als Curschmann Spiralen und Charcot-Leydensche Kristalle (auskristallisierte eosinophile Granula) erstmalig in Zusammenhang mit

Asthma bronchiale gebracht wurden. Problematisch war jedoch zu diesem Zeitpunkt, die Sputumanalyse aufgrund mangelnder Standardisierung als Untersuchungsmethode zu etablieren. Auch konnte von den meisten Patienten keine Sputumprobe gewonnen werden, bis Pin et al. 1992 erstmalig die Induktion von Sputum mittels Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung beschrieben. Seitdem arbeiten verschiedene Forschergruppen an der Standardisierung des Verfahrens. Die European Respiratory Society veröffentlichte 2002 zu verschiedenen Themen der Sputuminduktion und -analyse eine offizielle Empfehlung. Hier wurde die Reproduzierbarkeit der Methode in Hinblick auf prozentuale Zellzahlen als gut eingeschätzt (Djukanovic et al., ERS Task Force, 2002).

Methodik

Es existieren verschiedene Protokolle zur Sputuminduktion, die sich in der Konzentration der zu inhalierenden NaCl-Lösung, der Dauer der Inhalationszeit und der Intervalle, nach denen jeweils eine Kontrolle der Lungenfunktion erfolgt, unterscheiden. Meist wird beim leichten bis mittelschweren Asthma eine 4,5%ige NaCl-Lösung zur Inhalation verwendet, beim schweren Asthma eine 3.5%ige NaCl-Lösung und bei Patienten, die eine $FEV_1 < 65\%$ haben, eine 0.9%ige Lösung. Im Rahmen der Sputuminduktion mit hypertonen Kochsalzlösung kann auch die bronchiale Hyperreagibilität gemessen werden, vorausgesetzt, es findet keine Bronchodilatator-Anwendung vorher statt. Dann sind Lungenfunktionsmessungen häufiger und in kürzeren Abständen durchzuführen, als wenn nur eine Sputumprobe gewonnen werden soll. Auf jeden Fall sollte aufgrund der Gefahr eines Bronchospasmus durch Inhalation hypertoner Kochsalzlösung mindestens alle 5 min eine Kontrolle der FEV_1 erfolgen. Vorher wird der Patient aufgefordert, Sputum abzuhusten. Die Induktion könnte beendet werden, wenn eine für die Analyse ausreichende Sputummenge gewonnen wurde. Holz et al. (1998) stellten jedoch fest, dass das Sputummaterial, das in den letzten 10 min eines 20 min andauernden Protokolls gewonnen wurde, eine andere Qualität hat als die Probe, die in den ersten 10 min gewonnen wurde. Es spiegelt vorzugsweise das Material der tieferen Atemwege dar. Von daher sollte die Inhalation möglichst über volle 20 min erfolgen.

Die Sputuminduktion durch Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung kann auch im Kindesalter zumindest beim leichten bis mittelschweren Asthma als sicher eingestuft werden (Gibson et al., 2000). Die Erfolgsrate, ein adäquates Sputum zu produzieren, liegt in dieser Patientengruppe zwischen 76 und 100% (Sorva et al., 1997; Gibson et al., 1998; Oh et al., 1999). Bekannte Nebenwirkungen sind Unwohlsein aufgrund des speziellen Geschmacks der

Salzlösung, Husten und ein Bronchospasmus. Wenn die FEV_1 um mehr als 20% vom Ausgangswert abfällt, muss die Induktion abgebrochen werden und es sollte zügig ein Bronchodilatator inhaliert werden. Beim schweren Asthma sollte bereits vor der Sputuminduktion eine Bronchodilatator-Inhalation erfolgen, um die bronchokonstriktorische Nebenwirkung der Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung möglichst gering zu halten. Unter einem solchen Procedere wird die Zahl der Patienten mit schwerem Asthma, die unter der Sputuminduktion eine signifikante Bronchokonstriktion haben, mit 22% angegeben (hier mit einem Abfall der FEV_1 von $> 15\%$ gegenüber dem Ausgangswert definiert, ten Brinke et al., 2001). Sicherheitsdaten und Erfolgsquoten zur Sputuminduktion bei Kindern mit schwerem Asthma bronchiale lagen zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen für eine größere Patientengruppe noch nicht vor.

Die Sputumprobe muss auf 4°C kühl gehalten und innerhalb von 2 Stunden im Labor weiterbearbeitet werden. Außerdem sollte das Sputum von der Speichelflüssigkeit getrennt werden. Ein Sputum-Zytopräparat gilt nur dann als repräsentativ auswertbar, wenn der Prozentsatz der vitalen Zellen mindestens 40% beträgt, alveoläre Makrophagen sichtbar sind und der Anteil an Plattenepithelzellen (typische Zellen der Speichelflüssigkeit) $< 50\%$ beträgt (Efthimiadis et al., 2002). Zur Homogenisierung wird das Sputum mit Dithiothreitol (DTT) versehen, das die Disulfidbrücken im Sputum spaltet. Will man neben den Entzündungszellen auch die Zytokine im Überstand messen, beeinflusst DTT jedoch die Messmethode und muss später ggf. entfernt werden (Erin et al., 2005). Weitere Details zur Sputumanalyse sind in der Anlage 9.3 beschrieben.

Klinische Anwendung

Die Sputumanalyse erlaubt sowohl die Bestimmung von unterschiedlichen Zelltypen als auch die Messung von Proteinen und Zytokinen in der flüssigen Phase des Sputums. Unter all den Markern ist die Prozentzahl der Eosinophilen am besten untersucht und wird derzeit als aussagekräftigster Parameter zur Beurteilung der Atemwegsentzündung angesehen. Cai et al. (1998) haben für das Kindesalter Normwerte etabliert und festgestellt, dass die obere Norm der Prozentzahl der Eosinophilen bei 2.5% liegt. Bei asthmatischen Kindern korreliert die Prozentzahl der Sputumeosinophilen sehr gut mit der Symptomatik und dem Schweregrad der Erkrankung (Gibson et al., 2003). Auch sinkt die Prozentzahl der Eosinophilen im Sputum im Laufe einer inhalativen oder oralen Kortikosteroidtherapie (Claman et al., 1994; van Rensen et al., 1999). Bei Erwachsenen wurden die Zellprofile des Sputums auch mit denen der

bronchoalveolären Lavage und der endobronchialen Biopsie verglichen. Es zeigte sich, dass die Eosinophilenzahlen im induzierten Sputum mit denen in der bronchoalveolären Lavage, aber nicht eindeutig mit denen der endobronchialen Biopsie korrelieren (Grootendorst et al., 1997; Maestrelli et al., 1995).

In der Studie von Jatakanon et al. (2000) wurden vor und über 8 Wochen nach einer Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden bei Erwachsenen mit Asthma nicht nur eNO gemessen, sondern es wurden auch die Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum bestimmt. Es zeigte sich, dass die Gruppe der Patienten, die im Verlauf eine Asthmaexazerbation erlitten, signifikant höhere prozentuale Eosinophilenzahlen im Sputum hatten als die Patienten, die im weiteren Verlauf stabil blieben. Im Jahre 2002 wurde durch Green et al. (2002a) die erste Studie veröffentlicht, in der die prozentuale Anzahl an Eosinophilen im Sputum aktiv in die Steuerung des Therapieregimes von erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale miteinbezogen wurde. Die Autoren randomisierten die Patienten in zwei Gruppen: In der ersten Gruppe titrierten sie die Tagesdosen an inhalativen Kortikosteroiden nach der Prozentzahl der Eosinophilen im Sputum, und in der zweiten Gruppe verordneten sie die Therapie traditionell nach Symptom-Berichten und Lungenfunktionswerten. Nach einem Zeitraum von 12 Monaten zeigte sich, dass in der ersten Gruppe weniger Asthmaexazerbationen auftraten als in der zweiten Gruppe, ohne dass für die erste Gruppe die mittlere Tagesdosis der verordneten inhalativen Kortikosteroide höher ausgefallen wäre. Diese Langzeitstudie war der erste starke Hinweis darauf, dass ein Monitoring der eosinophilen Atemwegsinflammation für erwachsene Patienten mit Asthma vorteilhaft sein kann.

Aber auch die Berücksichtigung der anderen inflammatorischen Zellen im Sputum kann im Asthmamonitoring zur Hilfestellung bezüglich des therapeutischen Managements sinnvoll sein. Green et al. (2002b) konnten zeigen, dass erwachsene Asthmatiker mit einem neutrophilen Phänotyp seltener auf eine inhalative Kortikoidtherapie ansprechen als Patienten mit einer eosinophilen Atemwegsentzündung. Pavord et al. (1999) stellten fest, dass generell Patienten mit einem „nicht-eosinophilem Asthma bronchiale“ schlechter auf eine Kortikoidtherapie ansprechen als Patienten mit einem „eosinophilen Asthma bronchiale“. Die Kenntnis dieser Befunde wird in entsprechenden Fällen frustrane Therapieversuche verkürzen.

1.2.3 Analyse des Atemkondensats

Hintergrund

Die Methode der Atemkondensatgewinnung mit anschließender Analyse von Mediatoren wurde bereits 1975 beschrieben, jedoch erst Mitte der 90er Jahre in Studien häufiger eingesetzt (Kharitonov und Barnes, 2001). Mittlerweile gibt es mehr als 350 Publikationen zu diesem Thema, hauptsächlich mit Studien zum Problem des Asthma bronchiale, aber auch zu Fragen der Arbeitsmedizin. Bei dieser Methode werden nichtgasförmige Bestandteile der Ausatemluft (Aerosole, Wasserdampf) gesammelt und auf ca. -10°C heruntergekühlt. Gemessen werden später in erster Linie Stoffwechselprodukte aus Zellen der Atemwege. Die Methode ist auch bei Kindern einfach und sicher in der Durchführung (Baraldi et al., 2003b) und wird zunehmend häufiger eingesetzt, um insbesondere für das Kindesalter Einblicke in die Pathophysiologie der Entzündungsprozesse der Atemwege zu erhalten (Rosias et al., 2004). Bisher konnte eine ganze Reihe von verschiedenen Mediatoren im Atemkondensat nachgewiesen werden. H_2O_2 , Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiol, 3-Nitrotyrosine, Glutathion, Malondialdehyd gelten insbesondere als Marker für oxidativen Stress (Paredi et al., 2002). Eicosanoide stammen aus dem Arachidonsäurestoffwechsel und gehören mit zu den wichtigsten inflammatorischen Mediatoren, die bei Entzündungsvorgängen beim Asthma bronchiale eine Rolle spielen. Sie konnten vor einigen Jahren erstmals auch im Atemkondensat bei Kindern gemessen werden (Csoma et al., 2002). Zu ihnen gehören die Isoprostane (u.a. 8-Isoprostan), die Prostaglandine sowie die Leukotriene (Cysteinyl-Leukotriene (CysLTs), Leukotrien B_4 (LTB_4)).

Messmethode

Atemkondensat wurde in den frühen Studien mit Hilfe von selbstgebauten Apparaturen gesammelt. Hierbei wurde die Ausatemluft der Patienten in ein Glasrohr oder einen Plastikschlauch geleitet, die sich in einem mit Eis gefüllten Behälter befand. Durch die kalte Umgebung fand sofort eine Kondensierung statt. Mittlerweile ist ein elektrisch betriebener Kondensator kommerziell erhältlich und wird in vielen Forschungseinrichtungen verwendet (EcoScreen, Jaeger-Toennies, Höchberg). Einige Parameter können sofort gemessen werden wie der pH-Wert oder H_2O_2 mit dem EcoCheck (Jaeger-Toennies, Höchberg). Für andere Mediatoren müssen die Proben bis zur abschliessenden Analyse sofort auf -80°C eingefroren werden. Mittlerweile existieren offizielle Standardempfehlungen der ATS und ERS zum detaillierten Untersuchungsverfahren (Horvath et al., 2005). Man hat sich auf das standardisierte Vorgehen geeinigt, dass die Ausatemluft des Patienten 10 min lang in

Ruheatmung gesammelt wird und dass diese auf -10° Celsius gekühlt und somit kondensiert wird. Die Messung der meisten Mediatoren wie auch die der Leukotriene erfolgt mittels spezifischer Immunoassays. Allerdings sind hierbei die unteren Nachweisgrenzen der Assays recht hoch. Alternative Labormethoden wie z.B. die Massenspektroskopie könnten evtl. auch niedrigere Konzentrationen der Mediatoren akkurat messen. Diese Methoden sind jedoch sehr aufwendig und stehen nur selten zur Verfügung.

Klinische Studien

Unter den verschiedenen Mediatoren, die bisher im Atemkondensat gemessen werden konnten, sind die Leukotriene im Kindesalter am besten untersucht (Csoma et al., 2002; Baraldi et al., 2003a; Bodini et al., 2004; Zanconata et al., 2004). Csoma et al. wiesen 2002 als erste in einer Studie mit 48 Kindern nach, dass die CysLTs- und LTB₄-Konzentrationen im Atemkondensat bei Kindern mit Asthma bronchiale im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht waren. Baraldi et al. (2003a) konnten zeigen, dass die Konzentrationen an CysLTs und 8-Isoprostan im Atemkondensat bei Kindern mit einer akuten Asthmaexazerbation am Ende der oralen Kortikoidtherapie im Vergleich zum Ausgangswert signifikant niedriger waren. Langzeitstudien zum Wert der Atemkondensatmessungen im Verlauf des Asthmonitorings liegen bisher nicht vor. Insgesamt ist der Einsatz der Atemkondensatmethode in der klinischen Routine beim Asthma bronchiale bislang nicht ausreichend validiert (Horvath et al., 2005).

1.3 Fragestellungen

Die o.g. Erörterungen zeigen, dass in den letzten Jahren etliche Autoren Fragen zur Methodik der unterschiedlichen noninvasiven Untersuchungsverfahren nachgegangen sind. Ferner sind einzelne klinische Studien zur Frage des möglichen Einsatzes dieser Verfahren im Asthmonitoring veröffentlicht worden. Allerdings beschränken sich hier die meisten Untersuchungen auf Erwachsene. Longitudinale Daten für das Kindesalter fehlen bis 2005, dem Jahr, in dem die ersten unserer hier beschriebenen Studien veröffentlicht wurden. Auch über den Einsatz der verschiedenen Methoden bei Kindern mit schwerem Asthma ist nur wenig bekannt. Doch diese Gruppe profitiert möglicherweise am meisten von einem

sorgfältigen Therapiemonitoring. Daraus ergibt sich für das Kindesalter eine Reihe von Fragen:

- Ersetzen einzelne noninvasive Messverfahren zur Erfassung der Atemwegsentzündung bereits übliche Provokationsverfahren in der Kinderpneumologie?
- Gibt es Hinweise darauf, dass ein noninvasives Monitoring der Atemwegsentzündung bei Kindern mit Asthma im Verlauf sinnvoll ist oder ist es in diesem Alter noch nicht praktikabel oder nicht aussagekräftig?
- Gibt es auch im Kindesalter zwei unterschiedliche Asthma-Phänotypen, gekennzeichnet einerseits durch die eosinophile und andererseits durch die nicht-eosinophile Atemwegsentzündung? Kann abhängig von einem solchen Phänotyp das Ansprechen auf eine Kortikosteroidtherapie vorhergesagt werden?
- Können noninvasive Untersuchungsverfahren wie z.B. die Sputuminduktion auch sicher bei Kindern mit einem schweren Asthma eingesetzt werden?
- Korrelieren noninvasiv gemessene Marker der Atemwegsinflammation überhaupt mit denen, die traditionell invasiv gemessen werden?
- Können herkömmliche Methoden zur Erfassung der Atemwegsinflammation in modifizierter Form beim Monitoring des Atemwegsremodelings Anwendung finden?

Die im nächsten Kapitel vorgestellten eigenen Untersuchungen versuchen, zur Beantwortung dieser Fragen beizutragen.

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Exhalierendes Stickstoffmonoxid und andere Surrogat-Tests als Prädiktoren für die belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bei Kindern mit intermittierendem bis mittelschwer persistierendem atopischem Asthma bronchiale

(Anlage 9.1; Lex C, Dymek S, Heying R, Kovacevic A, Kramm CM, Schuster A. Value of surrogate tests to predict exercise-induced bronchoconstriction in atopic childhood asthma. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:225-230.)

Im Rahmen der Diagnosestellung und des Therapiemonitoring beim Asthma bronchiale kommen oft aufwendige Provokationsverfahren zur Messung der bronchialen Hyperreagibilität zum Einsatz. Im Kindesalter wird hierzu insbesondere auch die Laufbelastung angewandt, da diese Art der Provokation im Vergleich zu anderen Verfahren physiologischer ist und auch gezeigt werden konnte, dass das Ausmaß der belastungsinduzierten Bronchokonstriktion recht gut mit dem Ausmaß der eosinophilen Entzündung korreliert (Yoshikawa et al., 1998). Für den Klinikalltag wäre es hilfreich und kostensparend, wenn eine einfachere Methode zur Verfügung stände, mit deren Hilfe eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion vorhergesagt werden könnte.

In der hier vorliegenden Studie wurden 85 Kinder mit atopischem Asthma bronchiale untersucht. Der Schweregrad der Erkrankung variierte von intermittierend bis mittelschwer persistierend. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen Kindern, die einen normalen eNO-Wert (< 25 ppb) hatten (42 der untersuchten 85 Patienten (49%)), auch die Belastungsuntersuchung negativ war, d.h., dass es zu keinem Abfall der FEV₁ von $\geq 15\%$ nach Belastung im Vergleich zum Ausgangswert kam. Dies entsprach einem negativen prädiktiven Wert (NPV) von 100%. Allerdings traten bei immerhin 43/85 (51%) der Patienten erhöhte eNO-Werte auf, bei denen aber nur in 12 Fällen eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion vorlag (positiver prädiktiver Wert (PPV): 28%). Das Vorhandensein von subjektiven Asthmasymptomen in den letzten 2 Wochen vor der Untersuchung hatte zur Vorhersage einer belastungsinduzierten Bronchokonstriktion einen NPV von immerhin 96% und einen PPV von 26%. Ruhelungenfunktionswerte wie die FEV₁ oder der spezifische Atemwegwiderstand hatten weder einen positiven noch einen negativen prädiktiven Wert zur Vorhersage einer belastungsinduzierten Bronchokonstriktion. Bei 25/85 (29%) Patienten lagen sowohl erhöhte eNO-Werte als auch subjektive Asthmasymptome in den letzten 2 Wochen vor. Für diese

Kombination betrug der PPV auch nur 40%, der NPV war aber mit 97% sehr hoch. So konnte bei immerhin ca. 70% der Patienten, bei denen keine Kombination aus einem erhöhtem eNO-Wert und positiven Asthmasymptomen vorlag, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bei allen untersuchten atopischen Kindern mit Asthma bronchiale im Falle eines normalen eNO-Wertes ausgeschlossen werden konnte. Eine Kombination aus eNO-Messung und Symptomanamnese kann das Fehlen einer belastungsinduzierten Bronchokonstriktion mit ähnlich hoher Reliabilität in einer größeren Anzahl an Patienten vorhersagen, als wenn man nur eNO alleine misst. Da eNO-Messung und Symptomanamnese im Vergleich zur personal- und geräteintensiven Laufbelastungsuntersuchung einfach und zeiteffektiv sind, sollte eine Laufbelastungsuntersuchung nur erfolgen, wenn erhöhte eNO-Werte gemessen werden und Asthmasymptome in den letzten 2 Wochen vorlagen.

2.2. Klinischer Nutzen verschiedener noninvasiver Untersuchungsmethoden zur Messung der Atemwegsinfektion im Rahmen der Reduktion inhalativer Steroide bei Kindern mit leichtem bis mittelschwerem persistierendem Asthma bronchiale

(Anlage 9.2: Zacharasiewicz, A, Wilson NM, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, Khan M, Bush A. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 1077-1082.)

In den aktuellen Richtlinien zur medikamentösen Stufentherapie des persistierenden Asthma bronchiale sind die inhalativen Kortikosteroide Bestandteil jeder Behandlungsstufe. Es sollte immer die niedrigste individuell wirksame Dosis verwendet werden. Daher muss eine Reduktion der Kortikosteroid-Tagesdosis bei längerer Beschwerdefreiheit auf jeden Fall erwogen werden. Noninvasiv gemessene Marker der Atemwegsinfektion können evtl. helfen, herauszufinden, bei welchen Patienten mit Asthma eine solche Reduktion mit hoher Wahrscheinlichkeit erfolgreich sein wird und bei welchen nicht.

Unsere hier beschriebene Studie ist die erste longitudinale Studie im Kindesalter mit der Frage, ob ein oder mehrere noninvasive Marker zur Messung der Atemwegsinfektion ggf. erfolgreich im Therapiemonitoring - insbesondere im Rahmen der Reduktion der Therapieintensität - eingesetzt werden können. Bei 40 Kindern mit leichtem bis mittelschwerem persistierendem Asthma bronchiale wurde stufenweise alle 8 Wochen die Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden reduziert, solange die Patienten stabil waren, d.h. der Gebrauch an Bronchodilatoren in den letzten 8 Wochen < 3x/Woche war. Gleichzeitig wurden alle 8 Wochen über einen Zeitraum von 6 Monaten eNO-Messungen und eine Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung zur Sputuminduktion mit nachfolgender prozentualer Quantifizierung der Sputumeosinophilen sowie zur Hyperreagibilitätstestung durchgeführt. Therapieentscheidungen wurden aufgrund konventioneller klinischer Parameter und Lungenfunktionsergebnisse getroffen. Anschließend wurde eine retrospektive Analyse aller Ambulanzbesuche und der dabei gemessenen Werte durchgeführt. Dreißig von 40 Kindern (75%) tolerierten zumindest eine Reduktionsstufe, bei 15/40 Kindern (30%) konnten die inhalativen Steroide ganz abgesetzt werden. Eine Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Steroiden war in all den Fällen erfolgreich, in denen kurz vor der Reduktion keine Eosinophilen im Sputum nachweisbar waren (NPV 100%). Allerdings trat eine Exazerbation auch nur bei 41 % der Fälle mit nachweisbaren Sputumeosinophilen wirklich auf (PPV 41%). Die retrospektive Analyse der eNO-Werte ergab, dass 78% der Kinder, bei denen im Verlauf eine Asthmaexazerbation auftrat, bei dem Ambulanzbesuch, bei dem sie klinisch und

ruhelungenfunktionsdiagnostisch als stabil und symptomfrei eingeschätzt wurden, bereits eNO-Werte ≥ 22 ppb hatten. Hier hätte eventuell eine in der Folge der Therapiereduktion auftretende Exazerbation verhindert werden können, wären die eNO-Messwerte in die Therapieentscheidung auch aufgenommen worden. Andererseits war in 38 % der Patienten trotz erhöhter eNO-Werte eine Dosisreduktion der inhalativen Kortikosteroide ohne darauf folgende Exazerbation möglich. Die Analyse der „Odds Ratios“ ergab, dass die Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum erhöhte eNO-Werte von ≥ 22 ppb und einen positiven Hyperreagibilitätstest signifikant vorhersagen konnten, wann eine Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden erfolglos sein würde. Kombinierten wir diese Befunde in der multiplen Regressionsanalyse, zeigte sich, dass die prozentualen Eosinophilenzahlen im Sputum und erhöhte eNO-Werte ≥ 22 ppb als signifikante Prädiktoren für eine Exazerbation zu werten waren, ein positiver Hyperreagibilitätstest jedoch nicht. Neben eNO, der Eosinophilenzahl im Sputum und der Hyperreagibilitätstestung wurden in der vorliegenden Studie auch Nitrat, Nitrit und die Cysteinylleukotriene im Atemkondensat gemessen, die jedoch keinen Vorhersagewert für evtl. Exazerbationen hatten.

Zusammenfassend ergaben unsere Untersuchungsergebnisse, dass der Einsatz von noninvasiven Methoden zur Erfassung der Atemwegsinflammation helfen kann, den Erfolg oder den Misserfolg einer Dosisreduktion von inhalativen Steroiden vorherzusagen. Für das Kindesalter konnten wir damit erstmalig zeigen, dass das Monitoring der Atemwegsinflammation im Verlauf für die Langzeit-Therapieeinstellung nützlich sein kann.

2.3 Sputuminduktion bei Kindern mit schwerem Asthma: Sicherheit, Machbarkeit und inflammatorische Zellprofile

(Anlage 9.3: Lex C, Payne DN, Li AM, Zacharasiewicz A, Wilson NM, Hansel T, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: Safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:318-24).

Die Studie über den klinischen Nutzen der eNO-Messung, der Prozentzahl der Sputumeosinophilen und der Hyperreagibilitätstestung bei Kindern mit stabilem Asthma bronchiale zeigte, dass sowohl die Berücksichtigung von eNO-Werten als auch der prozentualen Zahl der Eosinophilen im Sputum zur Vorhersage einer Exazerbation im Rahmen einer Steroidreduktion helfen können (Zacharasiewicz et al., 2005, Anlage 9.2). Hieraus ergab sich die Frage, ob sich diese Ergebnisse auch auf Kinder mit schwerem Asthma bronchiale übertragen lassen. Kinder mit schwerem Asthma würden von einem adäquaten Therapiemonitoring besonders profitieren, da sie persistierende Symptome trotz sehr hoher Tagesdosen an Kortikosteroiden haben, und dabei unklar ist, ob diese hohen Kortikosteroiddosen ihnen überhaupt helfen. Je nach Inflammationstyp der Asthmaerkrankung sind eventuell alternative Asthmatherapeutika sinnvoll (Payne und Bush, 2004a). Der Typ der Atemwegsinflammation kann theoretisch im induzierten Sputum bestimmt werden, allerdings ist unklar, ob eine Sputuminduktion beim Kind mit schwerem Asthma überhaupt machbar und sicher ist.

Die vorliegende Studie ist die erste Studie, die eine größere Gruppe von Kindern mit schwerem Asthma bronchiale auf die Sicherheit und Machbarkeit einer Sputuminduktion untersuchte. Vierzig Kinder im Alter von 6 bis 16 Jahren wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Kinder erhielten vor der Sputuminduktion zunächst eine eNO-Messung und nach erfolgter Basislungenfunktion Salbutamol inhalativ zur protektiven Bronchodilatation. Zur Sputuminduktion inhalierten die Patienten eine 3.5%ige NaCl-Lösung über einen Zeitraum von 4 x 5 min. Bei 2 Kindern erfolgte keine Sputuminduktion, da die FEV₁ nach Bronchospasmolyse < 65% des Solls betrug. Sieben von 38 Kindern, bei denen eine Sputuminduktion durchgeführt wurde, hatten während der Inhalation der hypertonen Kochsalzlösung Symptome wie Dyspnoe und/oder Giemen. Von diesen 7 Kindern hatten 3 einen signifikanten Abfall der FEV₁ von mehr als 20% der postbronchodilatatorischen FEV₁, die jedoch auf inhalative Salbutamolgaben recht schnell reversibel war. Bei 28/38 Kindern (74%) war die Sputuminduktion erfolgreich, d. h. dass eine adäquate Sputumprobe produziert wurde, wobei die Erfolgsrate mit fast 90% bei Kindern \geq 12 Jahren signifikant höher war als

bei jüngeren Kindern. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Sputuminduktion auch bei Kindern mit schwerem Asthma eine sichere Methodik ist, um das Ausmaß der Atemwegsinfektion zu messen. Es ließen sich anhand der Sputumzellzahlen bei nur ca. 30% der Kinder (9/28) Zeichen einer persistierenden Atemwegsinfektion nachweisen. Dies ist höchstwahrscheinlich durch die Therapie mit hochdosierten inhalativen und teilweise auch systemischen Kortikosteroiden bedingt. Eine neutrophile Atemwegsinfektion, definiert als Anteil der Neutrophilen von $> 54\%$ an 400 ausgezählten Sputumzellen, zeigte sich bei einer Minderheit der Kinder (3/28). Die Befunde sprechen dafür, dass das „neutrophile Asthma“ bei Kindern mit einem schweren Asthmaschweregrad eine nur untergeordnete Rolle spielt, aber immerhin auch im Kindesalter in Erwägung gezogen werden sollte. Nur 6 von 23 Kindern, die einen erhöhten eNO-Wert > 23 ppb aufwiesen, hatten eine eosinophile Atemwegsinfektion nachweisbar, definiert als der prozentuale Anteil an Sputumeosinophilen von $\geq 2.5\%$. Ob die eNO-Werte oder die Prozentzahl an Eosinophilen im Sputum besser mit dem Ausmaß der Atemwegsinfektion korrelieren, die in endobronchialen Biopsien nachweisbar ist, sollte weiter untersucht werden. Darüber hinaus müssen auch in der Gruppe der Kinder mit schwerem Asthma bronchiale longitudinale Studien zeigen, ob noninvasive Methoden im Therapiemonitoring sinnvoll sind.

2.4 Vergleich noninvasiver und invasiver Untersuchungsmethoden zur Messung der Atemwegsinfektion bei Kindern mit mittelschwerem bis schwerem Asthma bronchiale

(Anlage 9.4: Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, Hansel TT, Payne NR, Bush A. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests, Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:1286-91)

Unter der Fragestellung, inwieweit noninvasive Methoden zur Messung der Atemwegsinfektion auch beim schweren Asthma bronchiale im Kindesalter machbar und sinnvoll sind, konnten wir bereits zeigen, dass die Methodik der Sputuminduktion auch bei dieser Patientengruppe sicher eingesetzt werden kann (Lex et al., 2005, Anlage 9.3). Wir beobachteten, dass viele Kinder mit schwerem Asthma persistierend hohe eNO-Werte hatten, die Sputumbefunde jedoch nur in einem Teil der Patienten auffällig waren. Auch Pijnenburg et al. (2005b) beschrieben, dass es Kinder mit stabilem Asthma gibt, die trotz aller therapeutischer Bemühungen wie Dosiserhöhung der inhalativen Steroide oder Optimierung der Inhalationstechnik persistent hohe eNO-Werte haben.

Die vorliegende Studie ist die erste Studie bei Kindern mit der Fragestellung, inwieweit erhöhte eNO-Werte oder erhöhte prozentuale Eosinophilenzahlen im induzierten Sputum das Vorliegen einer Atemwegsinfektion vorhersagen, wie sie invasiv-bronchoskopisch mittels Bestimmung der Eosinophilen in der BAL oder im endobronchialen Biopsat gemessen wird. Hierzu wurden 27 Kinder mit mittelschwerem bis schwerem Asthma untersucht, bei denen im Rahmen der klinischen Diagnostik eine Bronchoskopie durchgeführt wurde. Am Tag der stationären Aufnahme erfolgten zunächst eine eNO-Messung, eine Spirometrie und eine Sputuminduktion. Anschließend wurde innerhalb von 24 h eine Bronchoskopie mit einer BAL und einer endobronchialen Biopsie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte eNO-Werte, eine Sputum- und BAL-Eosinophilie durchaus vergleichbare Marker zur Erfassung der Atemwegsentzündung beim mittelschweren bis schweren Asthma bronchiale darstellen, da zwischen diesen Parametern signifikante positive Korrelationen nachweisbar waren. Die Sputumeosinophilie könnte als Prädiktor für das Vorliegen einer Eosinophilie in der BAL eingesetzt werden (PPV 75%), wohingegen eine normale Eosinophilenzahl im Sputum weniger verlässlich eine Eosinophilie in der BAL ausschließt (NPV 63%). Eine Kombination aus Eosinophilenprozentzahlen im Sputum und eNO-Werten erhöht den PPV auf 100%, jedoch nicht den NPV.

Die Ergebnisse zeigten überraschenderweise jedoch auch, dass die prozentualen Eosinophilenzahlen in der BAL und in der endobronchialen Biopsie bei Kindern mit schwerem Asthma sehr unterschiedlich waren. Eine mukosale Eosinophilie, d.h. eine erhöhte Eosinophilenzahl in der endobronchialen Biopsie, war im Gegensatz zur BAL-Eosinophilie selten, und sie war weder durch eNO-Werte noch durch Befunde aus dem induzierten Sputum vorhersagbar. Allerdings konnte eine mukosale Eosinophilie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, wenn im Sputum keine Eosinophilen nachweisbar waren oder ein normaler eNO-Wert vorlag (NPV 89% bzw. 83%).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass noninvasive Methoden zur Messung der Atemwegsinflammation, d.h. eNO-Messung und Bestimmung der Eosinophilen im Sputum im Langzeitmonitoring von Kindern mit mittelschwerem bis schwerem Asthma bronchiale die invasive Bestimmung der Eosinophilen in der BAL und in der endobronchialen Biopsie nicht vollständig ersetzen können. Allerdings zeigt die Studie bereits gute Korrelationen zwischen noninvasiven und invasiven Messmethoden zur Erfassung der Atemwegsinflammation. Eine Kombination von erhöhten eNO-Werten und Sputumeosinophilen kann möglicherweise eine Eosinophilie in der BAL vorhersagen. Das Fehlen jeglicher Eosinophilen im Sputum oder ein normaler eNO-Wert helfen, eine mukosale Eosinophilie auszuschließen.

2.5 Vorhersagewert der prozentualen Eosinophilenzahl im induzierten Sputum für das Ansprechen auf eine systemische Kortikosteroidtherapie bei Kindern mit schwerem Asthma bronchiale

(Anlage 9.5: Lex C, Jenkins G, Wilson NM, Zacharasiewicz A, Erin E, Hansel TT, Bush A, Payne NR. Does sputum eosinophilia predict the response to systemic corticosteroids in children with difficult asthma? *Pediatr Pulmonol* 2007;42:298-303)

Die Studie über den Vergleich von noninvasiven und invasiven Messmethoden zur Erfassung der Atemwegsinfammation zeigte zwar nicht, dass die Bestimmung der Eosinophilenprozentzahl im Sputum die Messung der Eosinophilen in der BAL oder in der Biopsie gänzlich ersetzen kann, ergab jedoch, dass eine erhöhte prozentuale Eosinophilenzahl im Sputum mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Eosinophilie in der BAL hinweist (Lex et al., 2006b, Anlage 9.4). Die Frage ist, ob Kinder mit schwerem Asthma bronchiale, die erhöhte Eosinophilenprozentzahlen im Sputum trotz einer hochdosierten inhalativen Steroidtherapie haben, möglicherweise im Langzeitverlauf anders auf eine systemische Kortikosteroidtherapie ansprechen als Kinder mit normalen Prozentzahlen an Eosinophilen im Sputum.

Wir untersuchten 20 Kinder im Alter von 8 bis 15 Jahren mit schwerem Asthma bronchiale, bei denen wir vor und 2 Wochen nach einem systemischen Kortikosteroidkurs eine adäquate Sputumprobe gewinnen konnten. Der systemische Kortikosteroidkurs bestand entweder aus einer 2-wöchigen oralen Gabe von Prednisolon 40 mg/Tag oder aus einer einmaligen intramuskulären Gabe von 80 mg Triamcinolon. Bei 17/20 Kindern wurde eine adäquate Aufnahme der Kortikosteroide im Körper nachgewiesen, und nur die Daten dieser Kinder wurden in der Studie ausgewertet. Acht Kinder wurden der „Eosinophilie-Gruppe“ zugeordnet, die als die Gruppe der Patienten mit einem prozentualen Anteil an Eosinophilen im Sputum von $\geq 2.5\%$ definiert wurde. Bei 9 Kindern lag der Prozentsatz an Eosinophilen im Sputum $< 2.5\%$. Sie gehörten somit in die „Nicht-Eosinophilie-Gruppe“. Es bestand kein signifikanter Unterschied im klinischen Ansprechen auf den Kortikosteroidkurs zwischen beiden Gruppen. Alle Patienten hatten entweder einen signifikanten Anstieg der FEV₁, definiert als Anstieg der FEV₁ $> 9\%$ des Solls in Analogie zum Vorgehen von Sly (1995), oder eine subjektive Verbesserung der Symptomatik. Die FEV₁ stieg in beiden Gruppen nach 2 Wochen signifikant an, allerdings war der Median der FEV₁-Differenzwerte in der „Eosinophilie-Gruppe“ höher als in der „Nicht-Eosinophilie-Gruppe“. Die Anzahl der

Sputumeosinophilen sank im Verlauf der 2 Wochen in der „Eosinophilie-Gruppe“. Es gab jedoch auch einen Patienten, dessen Prozentzahl an Sputumeosinophilen von 19 auf 23% leicht anstieg.

Zusammenfassend profitierten alle untersuchten Kinder mit schwerem Asthma klinisch von einem systemischen Kortikosteroidkurs, unabhängig davon, ob primär eine Sputumeosinophilie vorlag.

2.6 Messung der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat als noninvasives Verfahren zur Erfassung des Atemwegsremodelings

(Anlage 9.6: Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, Wilson NM, Nicholson AG, Kharitonov SA, Barnes PJ, Bush A. Exhaled breath condensate cysteinyl leucotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Resp Res* 2006;7:63)

Seit einigen Jahren werden klinische Studien auch zum Thema des Atemwegsremodelings, dem neben der Atemwegsentzündung weiteren pathophysiologischen Hauptcharakteristikum des Asthma bronchiale, durchgeführt. Eine Studie von Payne et al. (2003) zeigte, dass Zeichen des Atemwegsremodelings bei Kindern mit schwerem Asthma in gleichem Ausmaß vorhanden sind wie bei Erwachsenen mit Asthma unterschiedlichen Schweregrades. Unter der Vorstellung, dass das Atemwegsremodeling möglicherweise nicht komplett reversibel ist, ist es nötig, diesem frühzeitig entgegenzusteuern, am besten also schon beim asthmatischen Kind. Zum regelmäßigen Monitoring sind hier noninvasive Methoden notwendig, ähnlich wie sie bereits zur Messung der Atemwegsinflammation zur Verfügung stehen (z.B. Analyse von induziertem Sputum oder Atemkondensat). In unserer hier vorgelegten Studie mit 29 Kindern konnten wir erstmals in vivo einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene (hier im Atemkondensat gemessen) und der Dicke der Basalmembran beschreiben. In die Studie wurden Kinder mit mittelschwerem bis schwerem Asthma bronchiale aufgenommen (Alter 4 bis 15 Jahre), die im Rahmen der klinischen Diagnostik eine Bronchoskopie und eine endobronchiale Biopsie erhielten. Alle Kinder hatten zum Zeitpunkt der Studie eine hochdosierte inhalative Kortikosteroidtherapie. Achtundzwanzig Kinder hatten eine zusätzliche Therapie mit einem langwirksamen Bronchodilatator. Einundzwanzig Kinder erhielten in den letzten 2 Wochen vor der Studie zusätzlich ein systemisches Kortikosteroid (oral oder intramuskulär, entweder im Rahmen eines diagnostischen Kortikosteroidkurses oder im Rahmen einer Symptomverschlechterung). Vierzehn Kinder wurden zusätzlich mit dem Leukotrienrezeptorantagonisten Montelukast behandelt. Mindestens 24 h vor der Bronchoskopie wurden bei den Patienten eine Spirometrie und eine 10-minütige Sammlung von Atemkondensat durchgeführt. Die Cysteinyl-Leukotriene wurden im Atemkondensat mittels Enzymimmunoassay gemessen, die Dicke der Basalmembran wurde lichtmikroskopisch aus den Schnittpräparaten der endobronchialen Biopsie ermittelt. Bei 24/29 Kindern konnten Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat gemessen werden. Kinder, die mit Montelukast behandelt waren, hatten eine signifikant

niedrigere Konzentration an Cysteinyl-Leukotrienen im Atemkondensat als Kinder, die nicht mit Montelukast behandelt waren ($p=0.004$). In der Subgruppe von Kindern, die nicht mit Montelukast behandelt waren, bestand eine positive signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen an Cysteinyl-Leukotrienen im Atemkondensat und der Dicke des Basalmembran ($r=0.75$, $p=0.003$). Dieser signifikante Zusammenhang, wenn hier auch zunächst nur an einer kleinen Subgruppe an Kindern mit mittelschwerem bis schwerem Asthma gezeigt, legt die Vermutung nahe, dass zwischen den Cysteinyl-Leukotrienen in den Atemwegen und dem Atemwegsremodeling beim Asthma bronchiale in vivo ein Zusammenhang besteht.

Zusammenfassend folgt aus unseren Studienergebnissen, dass die Messung der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat möglicherweise als noninvasives Verfahren eingesetzt werden kann, um das Ausmaß des Atemwegsremodelings zu erfassen.

3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend zeigen die dargestellten eigenen Untersuchungen, dass verschiedene noninvasive Methoden zur Evaluierung der Atemwegsinfektion im Asthramonitoring bei Kindern sinnvoll eingesetzt werden können. Darüber hinaus ergibt sich erstmalig ein Anhaltspunkt dafür, dass das Ausmaß des Atemwegsremodelings möglicherweise noninvasiv gemessen werden kann. Die Studienergebnisse zeigen jedoch auch Probleme und mögliche Grenzen des Einsatzbereichs der verschiedenen Untersuchungsmethoden bei Kindern mit Asthma unterschiedlicher Schweregrade auf.

Wir konnten zeigen, dass eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bei allen untersuchten atopischen Kindern mit Asthma bronchiale im Falle eines normalen eNO-Wertes (< 25 ppb) ausgeschlossen werden kann (Lex et al., 2007a; Anlage 9.1). Buchvald et al. (2005) stellten bereits in einer klinischen Studie mit asthmatischen Kindern fest, dass eNO als Prädiktor für eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion dienen könnte. Es konnte jedoch kein eNO-Grenzwert festgelegt werden, bei welchem sicher auf eine Belastungsuntersuchung verzichtet werden konnte. Die Gruppe der von Buchvald et al. (2005) in die Untersuchung einbezogenen Kinder war allerdings heterogen und enthielt nicht nur atopische, sondern auch nichtatopische Kinder. In unserer Studie setzten wir zusätzlich die Symptomanamnese ergänzend zur eNO-Messung ein. Es zeigte sich, dass durch die Kombination aus eNO-Messung und Symptomanamnese bei einer grösseren Anzahl an Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine belastungsinduzierte Bronchokonstriktion ausgeschlossen werden konnte als durch die eNO-Messung alleine (70% versus 50%). Eine Laufbelastungsuntersuchung ist nach unseren Befunden nur erforderlich, wenn erhöhte eNO-Werte gemessen werden und gleichzeitig auch Asthmasymptome in den letzten 2 Wochen vorlagen. Da die eNO-Messung und die Symptomanamnese im Vergleich zur zeitaufwendigen Laufbelastung sehr viel weniger personal- und zeitintensiv ist, könnten somit einfach Ressourcen eingespart werden.

In einer Langzeitstudie konnten wir erstmalig für das Kindesalter zeigen, dass eNO-Messungen auch im Asthramonitoring sinnvoll sind (Zacharasiewicz et al., 2005, Anlage 9.2). Im Falle eines erhöhten eNO-Wertes von ≥ 22 ppb konnte bei Kindern mit leichtem bis mittelschwerem Asthma bronchiale das Auftreten einer Asthmaexazerbation nach Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit

vorhergesagt werden. Ähnliche Ergebnisse hatte zuvor lediglich die an Erwachsenen durchgeführte Studie von Jones et al. (2001b) geliefert.

Fast zum selben Zeitpunkt wie unsere Studie wurde eine weitere Longitudinalstudie zur Wertigkeit von eNO-Messungen im Kindesalter publiziert (Pijnenburg et al., 2005c). Diese Untersuchung zeigte, dass erhöhte eNO-Messwerte, die 2 und 4 Wochen nach Absetzen inhalativer Kortikosteroide gemessen wurden, eine signifikante Verschlechterung der Asthmasymptomatik in der Folge vorhersagen konnten. Dabei fanden die Autoren die beste Sensitivität und Spezifität für die Vorhersage einer Exazerbation bei einem eNO-Grenzwert von 49ppb (Sensitivität 71%, Spezifität 93%). Dieser höhere Grenzwert im Vergleich zu unserer Studie ist eventuell dadurch zu erklären, dass in dieser Studie die inhalativen Kortikosteroide zu Studienbeginn komplett abgesetzt und nicht wie in unserer Studie stufenweise reduziert wurden. Ebenfalls 2005 wurden die ersten beiden Longitudinalstudien veröffentlicht, die als Interventionsstudien die gemessenen eNO-Werte in die Therapieentscheidung einfließen ließen (Pijnenburg et al., 2005a; Smith et al., 2005). In einem doppelblinden Studiendesign über ein Jahr nutzten Pijnenburg et al. (2005a) eNO-Messungen bei 85 Kindern mit Asthma bronchiale zur Anpassung der inhalativen Kortikosteroiddosis für die Dauertherapie. Die Kinder wurden in zwei Gruppen eingeteilt; die Therapieentscheidungen bei Gruppe eins, der Kontrollgruppe, wurden je nach klinischer Symptomatik, bei Gruppe zwei je nach Höhe der gemessenen eNO-Werte getroffen. Aus Sicherheitsgründen wurde auch im Falle eines niedrigen eNO-Wertes bei Vorliegen klinischer Symptome keine weitere Dosisreduktion der inhalativen Kortikosteroide durchgeführt. Dies entspricht sicherlich auch dem Vorgehen im klinischen Alltag. Während zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der kumulativen inhalativen Kortikosteroiddosis nach einem Jahr zu finden war, zeigte sich jedoch eine signifikante Verbesserung der bronchialen Hyperreagibilität in der Gruppe 2, der „eNO-Gruppe“. Auch waren die eNO-Werte in der Kontrollgruppe nach einem Jahr höher, was als Indiz für eine vermehrte Atemwegsinflammation angesehen wird. Schwere Exazerbationen, welche mit oralen Steroiden behandelt werden mussten, waren in der Kontrollgruppe zwar zahlenmässig deutlich häufiger, jedoch war dieser Unterschied wegen der geringen Patientenzahl nicht signifikant (18 versus 8 in der „eNO-Gruppe“).

In der Studie von Smith et al. (2005) mit 97 erwachsenen Patienten konnte in einem ähnlichen Studiendesign die mittlere inhalative Kortikosteroidtagesdosis in der „eNO-Gruppe“ deutlich gesenkt werden ohne Einbußen bei der Symptomkontrolle. Wie auch bei Pijnenburg et al. (2005a) war die Exazerbationsrate in der Kontrollgruppe im Vergleich zur „eNO-Gruppe“

zahlenmäßig höher, aber dieser Unterschied war nicht signifikant. In der erst kürzlich von Fritsch et al. (2006) veröffentlichten klinischen Studie mit 47 Kindern zeigte sich lediglich eine Verbesserung der maximal expiratorischen Flusswerte bei 50% des ausatembaren Volumens (MEF₅₀-Werte) in der „eNO-Gruppe“. Der Nachweis einer Verbesserung klinischer Parameter gelang nicht.

Wir untersuchten in unserer Studie nicht nur die Wertigkeit von eNO-Messungen im Verlauf, sondern auch die der Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum (Zacharasiewicz et al., 2005, Anlage 9.2). Green et al. (2002a) hatten bereits in einer randomisierten Interventionsstudie bei erwachsenen Asthmatikern herausgefunden, dass in der Gruppe der Patienten, bei denen unter Berücksichtigung der prozentualen Eosinophilenzahl im Sputum eine Anpassung der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden vorgenommen wurde, weniger Asthmaexazerbationen auftraten als in der Kontrollgruppe. Wir konnten in unserer Studie mit 40 asthmatischen Kindern ebenfalls zeigen, dass die Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum einen signifikanten Vorhersagewert für den Erfolg einer Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden haben. Bei all den Kindern, bei denen vor der Reduktion keine Eosinophilen im Sputum nachweisbar waren, war die Reduktion der Kortikosteroiddosis auf jeden Fall erfolgreich. Diese Eindeutigkeit der Ergebnisse spricht dafür, dass die Bestimmung der prozentualen Eosinophilenzahl im Sputum im Asthramonitoring möglicherweise der eNO-Messung überlegen ist. Diese Hypothese wird gestützt durch die Ergebnisse der klinischen Studie an erwachsenen Asthmatikern von Jatakanon et al. (2000): Hier erwies sich ein signifikant positiver Prädiktionswert für das Auftreten von Asthmaexazerbationen im Verlauf der schrittweise durchgeführten Reduktion der Tagesdosis an inhalativen Kortikosteroiden für die Prozentzahl der Eosinophilen im Sputum, aber nicht für die eNO-Messwerte. Allerdings war die Zahl der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten mit n=15 sehr klein. Selbstverständlich bedeutet die Sputumanalyse im Vergleich zur eNO-Messung einen deutlichen zeitlichen und personellen Mehraufwand, so dass es zu beweisen gilt, ob sich dieser auf Dauer bei Patienten mit leichtem bis mittelschwerem Asthma lohnt. Bei Patienten mit schwerem Asthma bronchiale mag sich die Situation anders darstellen. Denn dies ist die Gruppe der Asthmatiker, die bei hohen Kortikosteroidtagesdosen aufgrund deren potentieller Nebenwirkungen besonders eines sorgfältigen Asthramonitorings bedarf, ggf. mit Kombination mehrerer Untersuchungsmethoden zur Messung der Atemwegsinfektion. So fanden vor kurzem Jayaram et al. (2006) bei Erwachsenen mittels eines der Studie von Green et al. (2002a) ähnlichen Studiendesign heraus, dass nur Patienten mit mittelschwerem bis schwerem Asthma und nicht Patienten mit leichtem Asthma von einem Therapiemanagement

profitieren, das sich regelmäßig nach den prozentualen Eosinophilenzahlen im induzierten Sputum richtet.

Um die Sputuminduktion möglicherweise auch bei Kindern mit schwerem Asthma im Asthramonitoring anwenden zu können, untersuchten wir zunächst erstmalig an einer grösseren Zahl an Kindern mit schwerem Asthma die Sicherheit und Machbarkeit dieser Methode (Lex et al., 2005). Es zeigte sich, dass eine ausgeprägte Bronchokonstriktion, definiert als Abfall der FEV₁ von > 20% gegenüber dem Ausgangswert, bei nur 8 % der eingeschlossenen Patienten während einer Sputuminduktion mit 3.5%iger NaCl-Lösung auftrat und bei allen nach Inhalation von Salbutamol recht schnell reversibel war. In der Studie von ten Brinke et al. (2001) erlitten 22% der untersuchten Erwachsenen mit schwerem Asthma bronchiale unter der Sputuminduktion eine Bronchokonstriktion. Allerdings wurde diese mit einem Abfall der FEV₁ von >15% gegenüber dem Ausgangswert definiert, was eventuell den höheren Anteil von betroffenen Patienten erklärt. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden auch Patienten mit einer postbronchodilatatorischen FEV₁ von < 65% des Solls eingeschlossen. Die Sputuminduktion wurde jedoch – abhängig von der FEV₁ - mit NaCl-Konzentrationen von 0.9 bis 4.5% durchgeführt. Grootendorst et al. (1999) untersuchten die Sicherheit der Sputuminduktion mit 4.5%iger NaCl-Lösung bei 20 Jugendlichen mit mittelschwerem bis schwerem Asthma. Keiner der Patienten erlitt eine signifikante Bronchokonstriktion. Möglicherweise waren die Patienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses alle in einem besseren klinischen Zustand.

In unserer Studie war die Erfolgsrate von knapp 75%, eine adäquate Sputumprobe bei Kindern mit schwerem Asthma bronchiale zu gewinnen, vergleichbar mit der in der Literatur mitgeteilten Erfolgsrate bei Kindern mit leichtem bis mittelschwerem Asthma bronchiale (Wilson et al., 2001; Gibson et al., 2003; Jones et al., 2001a). Bei Kindern ≥ 12 Jahren lag die Erfolgsrate bei fast 90%, so dass in dieser Altersgruppe die Sputuminduktion eher als Routine-Methode zur Messung der Atemwegsinfektion eingesetzt werden könnte.

In derselben Studie konnten wir des Weiteren beobachten, dass viele Kinder mit schwerem Asthma, behandelt mit hohen Tagesdosen an inhalativen und teilweise auch oralen Kortikosteroiden, persistent hohe eNO-Werte haben, die zellulären Sputumbefunde jedoch nur bei einem Teil der Patienten auffällig waren. Auch bei Pijnenburg et al. (2005b) wird von Kindern mit klinisch stabilem Asthma berichtet, die trotz aller therapeutischer Bemühungen wie Dosiserhöhung der inhalativen Steroide oder Optimierung der Inhalationstechnik dauerhaft hohe eNO-Werte haben. Eine Sputumanalyse zum Vergleich zur eNO-Messung war

in dieser Studie nicht erfolgt. Wir stellten uns die Frage, inwieweit eNO-Messwerte oder Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum mit den Eosinophilenzahlen korrelieren, wie sie invasiv bronchoskopisch durch Analyse der BAL oder der endobronchialen Biopsie zu erhalten sind (Lex et al., 2006b, Anlage 9.4), und wir untersuchten diese Fragestellung erstmalig für das Kindesalter. In vorangehenden Studien mit Kindern waren nur eNO-Messwerte, nicht aber prozentuale Eosinophilenzahlen des Sputums, mit den Eosinophilenzahlen in der BAL oder der endobronchialen Biopsie verglichen worden. Auch waren in diesen Studien keine Prädiktionswerte für das Vorliegen einer BAL- oder Bronchialschleimhaut-Eosinophilie errechnet worden (Payne et al., 2001a; Warke et al., 2002). In unserer Studie zeigte sich, dass zwar die eNO-Messwerte und die Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum miteinander und mit den Prozentzahlen der Eosinophilen in der BAL positiv korrelierten, aber nicht mit denen in der endobronchialen Biopsie. Eine mukosale Eosinophilie, d.h. eine erhöhte Eosinophilenzahl in der endobronchialen Biopsie, war im Gegensatz zur BAL-Eosinophilie selten und sie war weder durch eNO-Werte noch durch Befunde des induzierten Sputums vorhersagbar. Wie auch in der fast zeitgleich publizierten Studie mit erwachsenen Asthmatikern von Lemière et al. (2006) war bei den meisten Patienten, bei denen eine Sputumeosinophilie vorlag, keine mukosale Eosinophilie nachweisbar. Allerdings konnte nach den Ergebnissen unserer Studie eine mukosale Eosinophilie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, wenn im Sputum keine Eosinophilen nachweisbar waren oder ein normaler eNO-Wert vorlag.

Nach unseren Ergebnissen scheint der Zusammenhang zwischen der Eosinophilie im induzierten Sputum und der in der BAL und der Bronchialschleimhaut bei Kindern schlechter als bei Erwachsenen zu sein (Grootendorst et al., 1997; Maestrelli et al., 1995; Silkoff et al., 2003). Möglicherweise sind kleinere Sputumproben, wie sie üblicherweise von Kindern gesammelt werden, weniger repräsentativ für die tiefen Atemwege. Ähnlich wie aus Studien mit erwachsenen Asthmatikern vermutet, wird in unserer Studie jedoch deutlich, dass die Beziehung zwischen prozentualer Eosinophilenzahl im Sputum und in der BAL enger ist als die zwischen der prozentualen Eosinophilenzahl im Sputum und in der endobronchialen Biopsie (Grootendorst et al., 1997; Maestrelli et al., 1995; Silkoff et al., 2003). Als mögliche Erklärung wurde postuliert, dass Sputum- und BAL-Proben eher die grossen Atemwege repräsentieren, Biopsieproben hingegen die kleinen (Maestrelli et al., 1995; Silkoff et al., 2003). Welche Methode für das Therapiemonitoring am geeignetsten ist, bleibt derzeit noch unklar. Die Eosinophilen in der Mukosa werden möglicherweise durch eine geringere Kortikosteroiddosis oder einen kürzeren Therapiezeitraum eliminiert als die Eosinophilen, die

in der BAL nachweisbar sind. Bei den meisten unserer Patienten, die alle hochdosiert inhalativ und teilweise auch systemisch Kortikosteroide erhielten, war nämlich keine Eosinophilie mehr in der Biopsie nachweisbar. In Einzelfällen und insbesondere bei Sputumeosinophilie und erhöhten eNO-Werten werden Kinder, die trotz hoher Kortikosteroiddosen persistierende Symptome haben, also von der Durchführung einer endobronchialen Biopsie profitieren, um letztlich eine Überdosierung der Steroide zu vermeiden. Bei fehlender mukosaler Eosinophilie kommen dann möglicherweise andere Pharmaka als Kortikosteroide zum Einsatz (Payne und Bush, 2004a). Bei Nachweis einer mukosalen Eosinophilie sollte das Therapieziel die Entfernung der inflammatorischen Zellen aus der Mukosa sein. Für die Therapiesteuerung kann angesichts der Patientenbelastung jedoch keine der invasiven Methoden regelmässig herangezogen werden. Daher wurden auch in den vergangenen Jahren die klinischen Langzeitstudien mit der Frage, inwieweit erwachsene Patienten mit Asthma auf eine Kortikosteroidtherapie ansprechen, hauptsächlich mit Hilfe der Analyse des induzierten Sputums durchgeführt (Pavord et al., 1999; ten Brinke et al., 2004, Green et al., 2002b). Ten Brinke et al. (2004) fanden in einer Studie an Erwachsenen mit „therapierefraktärem“ Asthma bronchiale, das nicht durch inhalative Kortikosteroide zu kontrollieren war, heraus, dass die meisten Patienten mit einer Sputumeosinophilie auf eine systemische Kortikosteroidtherapie mit einem Abfall der prozentualen Eosinophilenzahl im Sputum und einer Verbesserung der klinischen Parameter und Lungenfunktionswerte reagierten. In unserer klinischen Studie mit Kindern mit schwerem Asthma bronchiale konnten wir die Beobachtungen einer verbesserten Asthmasymptomatik unter systemischer Kortikosteroid-Therapie bestätigen, allerdings zeigte sich, dass auch bei Kindern, die keine Sputum-Eosinophilie aufwiesen, eine Verbesserung der klinischen oder Lungenfunktionsparameter eintrat (Lex et al., 2007b; Anlage 9.5). In diesem Zusammenhang sind die Studienergebnissen von Pavord et al. (1999) und Green et al. (2002b) erwähnenswert, die aufzeigten, dass „nicht-eosinophiles“ oder „neutrophiles Asthma“ mit einem schlechten Ansprechen auf eine Kortikosteroidtherapie assoziiert ist. Allerdings waren diese Studien an Erwachsenen mit leichtem oder leichtem bis mittelschwerem Asthma durchgeführt worden und es war das Ansprechen auf eine inhalative, nicht systemische Kortikoidtherapie untersucht worden. Möglicherweise stellt das „nicht-eosinophile Asthma“, das bei Erwachsenen als eigenständige Entität beschrieben wird, im Kindesalter gar keine eigene Entität mit unterschiedlichen Charakteristika im Vergleich zum „eosinophilen Asthma“ dar. Im Rahmen unserer Studie zur Sicherheit der Sputuminduktion veröffentlichten wir erstmalig bei Kindern mit schwerem Asthma auch die verschiedenen Typen der inflammatorischen

Zellprofile (Lex et al., 2005; Anlage 9.3). Es zeigte sich, dass das „neutrophile Asthma“ zumindest bei den von uns untersuchten Kindern mit schwerem Asthma eine zahlenmäßig nur untergeordnete Rolle spielt. Andere Daten zur Häufigkeit des „neutrophilen Asthmas“ im Kindesalter liegen nicht vor. In eine ähnliche Richtung wie unsere weisen die Ergebnisse der Studie von Green et al. (2002b): Sie zeigte, dass die Patienten, die im Erwachsenenalter eine neutrophile Atemwegsentzündung haben, tendenziell älter sind und auch einen späteren Krankheitsbeginn hatten als die Patienten mit eosinophiler Atemwegsentzündung.

Doch es existieren für das Erwachsenenalter auch Studiendaten, die mit den oben zitierten Ergebnissen von Pavord et al. (1999) und Green et al. (2002b) nicht konform sind: Meijer et al. (2002) stellten fest, dass sich durch eine erhöhte prozentuale Eosinophilenzahl im Sputum bei nur 65% der betroffenen erwachsenen Asthmatiker das Ansprechen auf eine inhalative oder orale Kortikosteroid-Therapie korrekt vorhersagen ließ. In der Studie von Godon et al. (2002) verbesserte sich die FEV₁ bei allen Patienten nach einer einmonatigen Behandlung mit einem inhalativen Kortikosteroid, unabhängig von der prozentualen Zahl der Eosinophilen im Sputum. Aus unserer eigenen Studie läßt sich zusammenfassen, dass Kinder mit schwerem Asthma bronchiale von einem systemischen Kortikosteroidkurs auch bei fehlender Sputumeosinophilie profitieren können. Eine solche systemische Kortikosteroidgabe ist bei allen Kindern mit schwerem Asthma indiziert, insbesondere bei den Kindern, bei denen der Verdacht auf ein unzureichendes Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide besteht.

Es ist davon auszugehen, dass für das Therapiemonitoring des Asthma bronchiale neben der Atemwegsinfektion auch das Atemwegsremodeling eine wichtige Rolle spielt. Über die Kenntnis des Ausmaßes des strukturellen Umbaus der Atemwege kann die Progredienz und Schwere der Erkrankung besser eingeschätzt werden. In einer Pilot-Studie konnten wir erstmalig zeigen, dass das Atemwegsremodeling möglicherweise auch noninvasiv gemessen werden kann, und zwar durch die Analyse der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat (Lex et al., 2006a; Anlage 9.6). Weitere Studien an einer größeren Anzahl von Patienten sind jedoch zur Überprüfung dieser These notwendig.

In der Gruppe der Kinder mit mittelschwerem bis schwerem Asthma, die nicht mit Montelukast behandelt waren, bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat und der Dicke der retikulären Basalmembran. Darüber hinaus war die mittlere Konzentration an Cysteinyl-Leukotrienen im Atemkondensat in der Gruppe der Kinder, die mit Montelukast behandelt waren, signifikant niedriger als in der Gruppe, die kein Montelukast erhielt. Biernacki et al. (2005) fanden

kürzlich heraus, dass die Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat bei erwachsenen Asthmatikern nach einer 4-wöchigen Behandlung mit Montelukast signifikant sinkt. Mögliche Ursachen hierfür sind nicht klar, da Montelukast bekanntermaßen den Cysteinyl-Leukotrienrezeptor blockiert, was nicht die Synthese der Cysteinyl-Leukotriene beeinträchtigen dürfte. Erst kürzlich zeigte sich jedoch, dass Montelukast auch einen blockierenden Effekt auf die Synthese der Cysteinyl-Leukotriene hat, indem es die 5'-Lipoxygenase, einem wichtigen Enzym der Leukotrien-Biosynthese, blockiert.

Die Cysteinyl-Leukotriene wurden bereits in einigen Studien *in vitro* und im Tiermodell mit dem Atemwegsremodeling in Verbindung gebracht. Phan et al. (1988) konnten *in vitro* zeigen, dass Leukotrien C₄ einen biologischen Effekt auf die Kollagensynthese stimulierende Fibroblasten hat. In einer Studie mit allergisch sensibilisierten „Brown Norway“ Ratten konnten die durch wiederholte Allergenexposition induzierte vermehrte DNA-Synthese in Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur und die konsekutive Verdickung der glatten Atemwegsmuskulatur durch Pranlukast, einen spezifischen Cysteinyl-Leukotrienrezeptorantagonisten, signifikant reduziert werden (Salmon et al., 1999). Henderson et al. (2002) stellten im Asthma-Mausmodell fest, dass Montelukast, ein anderer spezifischer Cysteinyl-Leukotrienrezeptorantagonist, eine Reduktion der Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur und der subepithelialen Fibrose bewirkte. In einer anderen Untersuchungsreihe eines Asthma-Mausmodells reduzierte Montelukast hingegen zwar einige Charakteristika des Atemwegsremodelings (Hyperplasie der Becherzellen, Abschilferung des Bronchialepithels, fibrosierende Umbauvorgänge), aber nicht die Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur (Muz et al., 2006). Anhand unserer Studiendaten lässt sich keine Aussage treffen, ob Leukotrienrezeptorantagonisten wie z.B. Montelukast oder Pranlukast das Ausmaß des Atemwegsremodelings *in vivo* zu reduzieren vermögen. Hierzu zeigte sich in einer offenen Verlaufsstudie mit 7 Kindern mit Asthma bronchiale, dass die in der Computertomographie des Thorax nachweisbaren Areale niedriger Dichte, die als Zeichen des für das Asthma charakteristische „Air trappings“ interpretiert wurden, nach einer vierjährigen Therapie mit Montelukast bei 6 Patienten rückläufig waren. Die Autoren schlossen daraus, dass sich das Atemwegsremodelings möglicherweise durch einen Leukotrienantagonisten reduzieren lasse (Pifferi et al., 2004). Histologische Untersuchungen zur Verifizierung der These erfolgten in dieser Studie allerdings nicht.

Zusammenfassend ergibt sich aus unserer und den zitierten Untersuchungen die Annahme, dass zwischen der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene in den Atemwegen und dem Ausmaß des Atemwegsremodelings ein Zusammenhang besteht. Im Atemkondensat sind

Cysteinyl-Leukotriene auch bei Kindern grundsätzlich messbar, allerdings muss in den nächsten Jahren die Standardisierung der Methode noch deutlich verbessert werden. Alternativ können die Cysteinyl-Leukotriene auch im induzierten Sputum gemessen werden, doch zurzeit ist noch nichts über den Einfluss des dem Sputum zur Homogenisierung zugesetzten DTTs bekannt (siehe Kapitel 1.2.2 und Erin et al., 2005). Weiterführende Verbesserungen der Labormethoden sind dringend erforderlich. In Zukunft wird möglicherweise eine Kombination von Befunden verschiedener noninvasiver Marker eine diagnostische Alternative zu den bisher üblichen invasiven Methoden zur Evaluierung der Atemwegsremodelings und auch der Atemwegsinflammation darstellen. Diese Perspektive betrifft sowohl die direkte oder indirekte Evaluierung der Atemwegsinflammation als auch des Atemwegsremodelings. Auch wenn die noninvasiven Methoden zumindest teilweise schon in die Routine des Langzeit-Asthmamonitorings integriert werden können, so bestehen nach wie vor zum Teil noch Unklarheiten in der Interpretation der Ergebnisse (z.B. bei Patienten mit hohen eNO-Werten und hohen prozentualen Eosinophilenzahlen im Sputum, die klinisch aber stabil sind, oder bei Kindern mit schwerem Asthma, die bereits eine „ausgereizte“ konventionelle Asthmatherapie erhalten).

Zusammenfassend sprechen die eigenen und die aus der Literatur referierten Untersuchungsergebnisse dafür, dass es sinnvoll ist, bei Kindern mit Asthma bronchiale neben regelmäßigen Lungenfunktionsuntersuchungen auch wiederholte Evaluierungen des Ausmaßes der Atemwegsinflammation vorzunehmen. Hierzu bietet sich angesichts des geringen Zeitaufwandes und der vielen durchaus positiven Studiendaten insbesondere die eNO-Messung an. Bei Kindern mit schwerem Asthma bronchiale erscheint es sinnvoll, ab dem 12. Lebensjahr auch eine zelluläre Analyse des Sputums durchzuführen, da in diesem Alter die Methode der Sputuminduktion relativ Erfolg versprechend ist und in dieser Patientengruppe möglichst mehrere Verfahren zur Messung der Atemwegsinflammation eingesetzt werden sollten, um bestmöglich die individuell optimale Therapie zu bestimmen. Gegebenenfalls müssen bei Unklarheiten auch weiterhin invasive Techniken wie die der Bronchoskopie mit BAL und endobronchialer Biopsie zur weiterführenden Analytik durchgeführt werden. Das Atemwegsremodeling kann zurzeit noch nicht sicher noninvasiv untersucht werden. Hierzu wurden jedoch Ansätze erarbeitet, die weiterverfolgt werden sollten, so die Messung der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat.

4. Zusammenfassung

Atemwegsinflammation und –remodeling sind pathophysiologische Hauptcharakteristika des Asthma bronchiale; es wird davon ausgegangen, dass sie höchstwahrscheinlich für den Langzeitverlauf der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen. Zunehmend wird gefordert, dass im Langzeitmonitoring der Erkrankung neben den üblichen Lungenfunktionsuntersuchungen auch das Ausmaß der Atemwegsinflammation und – sofern möglich - des Atemwegsremodelings erfasst werden sollte und dies möglichst noninvasiv. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag geleistet werden, diesbezüglich verschiedene noninvasive Messverfahren im Kindesalter auf ihre Einsatzmöglichkeiten und ihre Wertigkeit zu überprüfen.

Zunächst konnten wir bei Kindern mit intermittierenden bis mittelschwer persistierendem Asthma bronchiale zeigen, dass bei einer normwertigen Stickstoffmonoxid-Konzentration im Exhalat (eNO) sich die Durchführung einer bronchialen Provokationstestung mittels aufwendiger Laufbelastung erübrigen lässt.

In einer Langzeitstudie wiesen wir erstmalig für das Kindesalter nach, dass sich durch Berücksichtigung sowohl von eNO-Werten als auch von prozentualen Eosinophilenzahlen im induzierten Sputum, die vor einer Dosisreduktion der inhalativen Kortikosteroide in der Dauertherapie gemessen wurden, mit hoher Wahrscheinlichkeit bei Kindern mit leichtem bis mittelschwerem persistierendem Asthma bronchiale das Auftreten einer Asthmaexazerbation im Verlauf vorhersagen ließ. Wir konnten darüber hinaus feststellen, dass eine Therapiereduktion in all den Fällen erfolgreich war, in denen vor der Reduktion keine Eosinophilen im Sputum nachweisbar waren.

Um diese Ergebnisse möglicherweise auf die kleinere, aber in der Therapieeinstellung schwierigere Patientengruppe der Kinder mit schwerem Asthma übertragen zu können, untersuchten wir im nächsten Schritt die Sicherheit und Machbarkeit der Sputuminduktion bei diesen Patienten. Eine ausgeprägte Bronchokonstriktion trat nur bei 8% der Patienten während einer Sputuminduktion durch Inhalation mit 3.5%iger NaCl-Lösung auf und war bei all diesen Patienten schnell reversibel. Die Erfolgsrate, ein adäquates Sputum zu gewinnen, war mit fast 90% zumindest in der Altersgruppe der Kinder ≥ 12 Jahre zufriedenstellend. Eine vergleichende Analyse der Sputumzellprofile mit den gemessenen eNO-Werten zeigte, dass prozentual viele Patienten erhöhte eNO-Werte, aber normale Prozentzahlen an Eosinophilen im Sputum hatten.

Wir führten daraufhin eine Studie durch, die sowohl eNO-Werte als auch prozentuale Eosinophilenzahlen im Sputum von Kindern mit mittelschwerem bis schwerem Asthma bronchiale mit der eosinophilen Entzündung verglich, wie sie invasiv-bronchoskopisch mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) oder endobronchialer Biopsie gemessen wurde. Die eNO-Messwerte und die Prozentzahlen der Eosinophilen im Sputum korrelierten positiv untereinander und mit den Prozentzahlen der Eosinophilen der BAL, aber nicht mit denen der endobronchialen Biopsie. Eine mukosale Eosinophilie, d.h. eine erhöhte prozentuale Eosinophilenzahl in der endobronchialen Biopsie, war im Gegensatz zur BAL-Eosinophilie selten, und sie war weder durch Berücksichtigung der eNO-Werte noch durch Befunde des induzierten Sputums vorhersagbar. Daraus lässt sich folgern, dass ggf. z.B. im Falle von therapeutischen Problemen bei Kindern mit schwerem Asthma in Einzelfällen auch eine invasive Technik zur Anwendung kommen muss, um die Mukosa direkt zu untersuchen. Allerdings konnte in unserer Studie eine mukosale Eosinophilie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, wenn im Sputum keine Eosinophilen nachweisbar waren oder ein normaler eNO-Wert vorlag.

Für das Langzeitmonitoring der Kinder mit schwerem Asthma sollte jedoch ein noninvasives Untersuchungsverfahren zur Erfassung der Atemwegsinfammation gefunden werden. So führten wir eine klinische Studie mit der Frage durch, ob Kinder mit schwerem Asthma verschiedener Phänotypen in unterschiedlicher Art auf eine systemische Kortikosteroidtherapie ansprechen, wie dies bei Erwachsenen mit Asthma bronchiale beschrieben wurde. Es zeigte sich jedoch, dass alle untersuchten Kinder mit schwerem Asthma bronchiale, von denen etwa die Hälfte gemäß des zellulären Sputumprofils ein „eosinophiles Asthma bronchiale“ und die andere Hälfte ein „nicht-eosinophiles Asthma bronchiale“ hatte, auf einen systemischen Kortikosteroidkurs ansprachen. Des Weiteren konnten wir beobachten, dass das so genannte „neutrophile Asthma“, ein Subtyp des „nicht-eosinophilen Asthma bronchiale“, das bei erwachsenen Asthmatikern als eigenständige Entität mit spezifischer Charakterisierung beschrieben wird und schlecht auf eine Kortikosteroidtherapie anspricht, zumindest in der von uns untersuchten Gruppe der Kinder mit schwerem Asthma nur eine zahlenmäßig untergeordnete Rolle spielte.

In der letzten hier dargestellten Studie versuchten wir, erstmalig eine noninvasive Methode zur Messung des Ausmaßes des Atemwegsremodelings zu finden. In vitro und im Asthma-Mausmodell war bereits in früheren Studien ein Zusammenhang zwischen den Cysteinyl-Leukotrienen und dem Atemwegsremodeling beschrieben worden. In einer Pilotstudie konnten wir nun erstmalig in vivo, und zwar bei Kindern mit mittelschwerem bis schwerem

Asthma bronchiale, einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat und der Dicke der retikulären Basalmembran, die in Bronchialbiopsaten als Korrelat des Atemwegsremodelings gemessen wurden, aufzeigen. Die signifikante Korrelation bestand zwar nur in der Subgruppe der Patienten, die nicht mit Montelukast behandelt waren, ergibt jedoch einen Anhaltspunkt dafür, dass die Messung der Cysteinyl-Leukotriene im Atemkondensat möglicherweise als noninvasives Verfahren eingesetzt werden kann, um das Ausmaß des Atemwegsremodelings zu messen.

Zusammenfassend haben die hier beschriebenen Untersuchungen gezeigt, dass verschiedene noninvasive Methoden zur Evaluierung der Atemwegsinfektion im Monitoring von Asthma bronchiale unterschiedlicher Schweregrade im Kindes- und Jugendalter sinnvoll eingesetzt werden können. Möglicherweise lässt sich sogar das Ausmaß des Atemwegsremodelings noninvasiv erfassen; erste Anhaltspunkte dafür lieferten unsere Untersuchungsergebnisse.

5. Literatur

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993;6:1368-1370.

American Thoracic Society/ European Respiratory Society Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930.

Avital A, Uwyed K, Berkman N, Godfrey S, Bar-Yishay E, Springer C. Exhaled nitric oxide and asthma in young children. *Pediatr Pulmonol* 2001;32:308-13.

Bacharier LB, Strunk RC, Mauger D, White D, Lemanske RF Jr, Sorkness CA. Classifying asthma severity in children: mismatch between symptoms, medication use, and lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:426-432.

Baraldi E, Azzolin NM, Zanconato S, Dario C, Zacchello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr* 1997;131:381-385.

Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, Piacentini G, Zacchello F, Zanconato S. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax* 2003a; 58:505-509.

Baraldi E, Ghiro L, Piovan V, Carraro S, Zacchello F, Zanconato S. Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma. *Arch Dis Child* 2003b;88:358-360.

Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, Zuin R, Beghe B, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:798-803.

Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, Zuin R, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:975-981.

Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, Barnes PJ. Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients. *Chest* 2005;128:1958-1963.

Bodini A, Peroni D, Vicentini L, Loiacono A, Baraldi E, Ghiso L, Corradi M, Alinovi R, Boner AL, Piacentini GL. Exhaled breath condensate eicosanoids and sputum eosinophils in asthmatic children: a pilot study. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:26-31.

Bousquet J, Chané P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033-1039.

Bousquet J, Chané P, Campbell AM, Lacoste JY, Poston R, Enander I, Godard P, Michel FB. Inflammatory processes in asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;94:227-232.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002;346:1699-1705.

British Thoracic Society, Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). British guideline on the management of asthma. *Thorax* 2003;58:S1-S94.

Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste JC, Pijnenburg MW, Silkoff PE, Bisgaard H. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1130-1136.

Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998;11:848-853.

Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 2002;57:677-682.

Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy JV. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:861-869.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:551-559.

Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1345-1349.

de Blic J, Tillie-Leblond I, Emond S, Mahut B, Dang Duy TL, Scheinmann P. High-resolution computed tomography scan and airway remodeling in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:750-754.

Deykin A, Massaro AF, Coulston E, Drazen JM, Israel E. Exhaled NO following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1237-1240.

Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J* 2002;37:S1-S2.

Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003;123:751-756.

Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J* 2002;37: S19-S23.

Erin EM, Zacharasiewicz A, Jose PJ, Williams TJ, Barnes PJ, Hansel TT. Optimized dialysis to restore immunoreactivity of chemokines and cytokines in sputum supernatants containing dithiothreitol. *Am J Respir Crit Care Med* 2005:A 313.

ERS Taskforce on difficult/therapy-resistant asthma. Difficult/Therapy-Resistant Asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. *Eur Respir J* 1999;13:1198-1208.

Frank TL, Adisesh A, Pickering AC, Morrison JF, Wright T, Francis H, Fletcher A, Frank PI, Hannaford P. Relationship between exhaled nitric oxide and childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1032-1036.

Fritsch M, Uxa S, Horak F Jr, Putschoegl B, Dehlink E, Szepfalusi Z, Frischer T. Exhaled nitric oxide in the management of childhood asthma: a prospective 6-months study. *Pediatr Pulmonol* 2006;41: 855-862.

Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, Clancy RL. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36-41.

Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J*. 2000;16:1008-1015.

Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116-121.

Godon P, Boulet LP, Malo JL, Cartier A, Lemiere C. Assessment and evaluation of symptomatic steroid-naïve asthmatics without sputum eosinophilia and their response to inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 2002;20:1364-1369.

Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002a;360:1715-1721.

Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002b;57:875-879.

Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, Van Krieken JH, Veselic-Charvat M, Sterk PJ. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997;27:769-779.

Grootendorst DC, van den Bos JW, Romeijn JJ, Veselic-Charvat M, Duiverman EJ, Vrijlandt EJLE, Sterk PJ, Roldaan AC. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophil cationic protein to clinical severity. *Eur Respir J* 1999;13:647-653.

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wildlund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-857.

Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:108-116.

Holz O, Jorres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:284-292.

Horvath I, Hunt J, Barnes PJ on behalf of the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005, 26:523-548.

James AJ, Penrose JF, Cazaly AM, Holgate ST, Sampson AP. Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respir Res* 2006;7:102.

Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1532-1539.

Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.

Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483-494.

Jeffery P. Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma. *Pediatr Pulmonol* 2001;21:S3-S16.

Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:176-183.

Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001a; 164:1146-1149.

Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, Taylor DR. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001b;164:738-743.

Kasahara K, Shiba K, Ozawa T, Okuda K, Adachi M. Correlation between the bronchial subepithelial layer and whole airway wall thickness in patients with asthma. *Thorax* 2002;57:242-246.

Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory infections. *Eur Respir J* 1995a;8:295-297.

Kharitonov SA, Robbins RA, Yates DH, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995b;8:152:609-612.

Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affects exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996;9:196-201.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693-1722.

Kon OM, Kay AB. T cells and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:133-135.

Leitlinie "Asthma bronchiale im Kindes- und Jugendalter" der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin, der Gesellschaft für Asthmaschulung im Kindes- und Jugendalter und der Gesellschaft für Pädiatrische Rehabilitation. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Fachgesellschaften, Leitlinien Register Nr. 026/010, www.leitlinien.net.

Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1033-1039.

Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:318-324.

Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, Wilson NM, Nicholson AG, Kharitonov SA, Barnes PJ, Bush A. Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res* 2006a;7:63.

Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, Hansel TT, Payne DN, Bush A. Airway Eosinophilia in Children with Severe Asthma: Predictive Values of Noninvasive Tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2006b;174:1286-1291.

Lex C, Dymek S, Heying R, Kovacevic A, Kramm CM, Schuster A. Value of surrogate tests to predict exercise-induced bronchoconstriction in atopic childhood asthma. *Pediatr Pulmonol* 2007a;42:225-230.

Lex C, Jenkins G, Wilson NM, Zacharasiewicz A, Erin E, Hansel TT, Bush A, Payne NR. Does sputum eosinophilia predict the response to systemic corticosteroids in children with difficult asthma? *Pediatr Pulmonol* 2007b;42:298-303.

Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'connor BJ, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:22-30.

Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000;55:184-188.

Lundgren R, Soderberg M, Horstedt P, Stenling R. Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J* 1988;1:883-889.

Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1926-1931.

Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, et al. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax* 2003;58:494-499.

Malmberg LP, Petays T, Haahtela T, Laatikainen T, Jousilahti P, Vartiainen E, Makela MJ. Exhaled nitric oxide in healthy nonatopic school-age children: determinants and height-adjusted reference values. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:635-642.

Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, Arends LR, Koeter GH, Kerstjens HA. Accuracy of eosinophils and eosinophilic cationic protein to predict steroid improvement in asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1096-1103.

Murphy AW, Platt-Mills TA, Lobo M, Hayden F. Respiratory nitric oxide levels in experimental human influenza. *Chest* 1999;114:452-456.

Muz MH, Deveci F, Bulut Y, Ilhan N, Yekeler H, Turgut T. The effects of low dose leukotriene receptor antagonist therapy on airway remodeling and cysteinyl leukotriene expression in a mouse asthma model. *Exp Mol Med* 2006;38:109-118.

Nationale Versorgungs-Leitlinie Asthma bronchiale. Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, Berlin 2006, <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/asthma>.

Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999;54:1061-1069.

Oh JW, Lee HB, Kim CR, Yum MK, Koh YJ, Moon SJ, Kang JO, Park IK. Analysis of induced sputum to examine the effects of inhaled corticosteroid on airway inflammation in children with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:491-496.

Panditi S, Silverman M. Perception of exercise induced asthma by children and their parents. *Arch Dis Child* 2003;88:807-811.

Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S31-S37.

Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999;353:2213-2214.

Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1376-1381.

Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:78-82.

Payne D, Bush A. Phenotype-specific treatment of difficult asthma in children. *Paediatr Respir Rev* 2004a;5:116-123.

Payne DN, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, Jeffery PK. Airway inflammation in children with difficult asthma: relationships with airflow limitation and persistent symptoms. *Thorax* 2004b;59:862-869.

Persson MG, Gustafsson LE. Ethanol can inhibit nitric oxide production. *Eur Respir J* 1992;224:99-100.

Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1210-1214.

Phan SH, McGarry BM, Loeffler KM, Kunkel SL. Binding of leukotriene C4 to rat lung fibroblasts and stimulation of collagen synthesis in vitro. *Biochemistry* 1988;27:2846-2853.

Phillips CR, Giraud GD, Holden WE. Exhaled nitric oxide during exercise: site of release and modulation by ventilation and blood flow. *J Appl Physiol* 1996;80:1865-1871.

Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999;13:1386-1390.

Pifferi M, Caramella D, Ragazzo V, de Marco E, Pietrobelli A, Boner AL. Montelukast and airway remodeling in children with chronic persistent asthma: an open study. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:472-473.

Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, de Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in asthmatic children: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005a; 172:831-836.

Pijnenburg MW, Bakker EM, Lever S, Hop WC, De Jongste JC. High fractional concentration of nitric oxide in exhaled air despite steroid treatment in asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 2005b;35:920-925.

Pijnenburg MW, Hofhuis W, Hop WC, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax* 2005c;60:215-218.

Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-29.

Pohunek P. Can we treat airway remodeling? *Paediatr Respir Rev* 2006;7 Suppl:S108-109.

Ramires R, Caiaffa MF, Tursi A, Haeggstrom JZ, Macchia L. Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324:815-821.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-765.

Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993;48:26-32.

Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijmans JW, Donckerwolcke RA, Jobsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:4-19.

Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:249-254.

Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, Turpeinen M, Rogers AV, Payne DN, Bush A, Haahtela T, Mäkelä MJ, Jeffery PJ. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:722-727.

Saglani S, Papaioannou G, Khoo L, Ujita M, Jeffery PK, Owens C, Hansell DM, Payne DN, Bush A. Can HRCT be used as a marker of airway remodelling in children with difficult asthma? *Respir Res* 2006;7:46.

Salmon M, Walsh DA, Huang TJ, Barnes PJ, Leonard TB, Hay DW, Chung KF. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. *Br J Pharmacol* 1999;127:1151-1158.

Scollo M, Zanconato S, Ongaro R, Zaramella C, Zacchello F, Baraldi E. Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;160:1047-1050.

Sears MR. Consequences of long-term inflammation. The natural history of asthma. *Clin Chest Med* 2002;21:315-329.

Silkoff PE, Wakita S, Chatkin J, Ansarin K, Gutierrez C, Caramori M, McClean P, Slutsky AS, Zamel N, Chapman KR. Exhaled nitric oxide after beta2-agonist inhalation and spirometry in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:940-944.

Silkoff PE, Trudeau JB, Gibbs R, Wenzel S. The relationship of induced-sputum inflammatory cells to BAL and biopsy. *Chest* 2003;123:S371-S372.

Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, Katial RK, Balzar S, Strand M, Wenzel SE. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1249-1255.

Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:559-565.

Sly PD: Lung Function. In: Silverman M, editor. *Childhood asthma and other wheezing disorders*. London: Chapman and Hall Medical; 1995: pp 115-139.

Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor DR. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:473-78.

Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005;352:2163-2173.

Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JH, Vandenbroucke JP, Sterk PJ. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1043-1051.

Sorva R, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Backman K, Bjorksten F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:45-50.

ten Brinke A, de Lange C, Zwinderman AH, Rabe KF, Sterk PJ, Bel EH. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol: predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749-753.

ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma: effect of parenteral corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:601-605.

van Amsterdam JG, Verlaan BP, van Loveren H, Elzakker BG, Vos SG, Opperhuizen A, Steerenberg PA. Air pollution is associated with increased level of exhaled nitric oxide in nonsmoking healthy subjects. *Arch Environ Health* 1999;54:331-335.

van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2107-2113.

van Rensen EL, Straathof KC, Veselic-Charvat MA, Zwinderman AH, Bel EH, Sterk PJ. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax* 1999;54:403-408.

Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, Shields MD. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383-387.

Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1001-1008.

Wenzel S. Severe/fatal asthma. *Chest* 2003;123: S405-S410.

Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368:804-813.

Wilson NM, James A, Uasuf C, Payne DN, Hablas H, Afrofoti C, Bush A. Asthma severity and inflammation markers in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:125-132.

Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1996;9:1130-1133.

Yoshikawa T, Shoji S, Fujii T, Kanazawa H, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J. Severity of exercise-induced bronchoconstriction is related to airway eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Eur Respir J* 1998;12:879-884.

Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Li A, Bush A. Effect of inhalation times on exhaled NO. *Pediatr Pulmonol* 2004;38:335-338.

Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, Khan M, Bush A. Clinical Use of Noninvasive Measurements of Airway Inflammation in Steroid Reduction in Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1077-1082.

Zanconato S, Carraro S, Corradi M, Alinovi R, Pasquale MF, Piacentini G, Zacchello F, Baraldi E. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:257-263.

Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, Alving K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1999;13:327-333.

Zhu Z, Lee CG, Zheng T, Chupp G, Wang J, Homer RJ, Noble PW, Hamid Q, Elias JA. Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:S67-S70.

6. Danksagungen

An allererster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Klaus Schmidt für die Möglichkeit der Habilitation danken. Er hat mich seit meiner Rückkehr aus London tatkräftig unterstützt und immer wieder ermuntert, meine Forschungstätigkeiten neben meiner klinischen Verpflichtung fortzuführen. Insbesondere hat er durch Hilfestellungen der vielfältigsten Art dazu beigetragen, dass ich trotz Gründung einer kleinen Familie vor zwei Jahren viele Forschungsprojekte abschließen und neue beginnen konnte.

An zweiter Stelle möchte ich meiner klinischen und akademischen Lehrmeisterin Frau Professor Dr. Antje Schuster danken. Sie hat mich nach meiner Facharztausbildung klinisch und wissenschaftlich in die pädiatrische Allergologie und Pneumologie eingeführt und mich von ihren großen Erfahrungen und ihrem Wissen profitieren lassen. Sie war es, die mich maßgeblich dabei unterstützt hat, einen Forschungsaufenthalt in London zu verwirklichen. Ihre Anregungen und Ideen haben im wesentlichen Maße zu der hier vorgestellten Arbeit beigetragen.

Besonders danken möchte ich meinem Lehrmeister von der anderen Seite des Kanals: Herrn Professor Andrew Bush vom Royal Brompton Hospital in London, England. Durch seine Kombination von grandiosen Ideen, Ausdauerkraft und Humor hat er es immer geschafft, mich für vielfältige Forschungsprojekte zu begeistern. Auch einige Jahre nach meiner Rückkehr nach Deutschland arbeite ich an verschiedenen Kooperationsprojekten gerne mit ihm zusammen.

Anerkennen möchte ich auch die sehr gute Zusammenarbeit mit meinen englischen Tutoren Dr. Nicola Wilson und Dr. Donald Payne, jetzt Princess Margaret Hospital for Children, Perth, Australien, die mich tatkräftig in meinem Londoner Umfeld unterstützt haben. Auch möchte ich meinen Freunden und Mitstreitern Frau PD. Dr. Angela Zacharasiewicz, jetzt Wilhelminenspital, Wien, Österreich, Dr. Albert Li, jetzt Prince of Wales Hospital, Hongkong und Dr. Flavia Ferreira, jetzt Children's University, Sao Paulo, Brasilien, dafür danken, dass in guter Zusammenarbeit und interessantem Gedankenaustausch verschiedene hier vorgestellte Projekte realisiert werden konnten.

Hervorgehoben werden muss auch die Tatkraft und Hilfe vieler Personen, die mir bei der Betreuung der Patienten in den Studien sowie der Labortätigkeit geholfen haben: Im Einzelnen möchte ich Dr. Catharina Brindicci, Doktorandin Frau Sabine Dymek, Frau Christiane Reiz und Frau Yasmin Frerichs danken. An dieser Stelle möchte ich mich auch besonders bei allen Patienten und ihren Familien für ihre uneigennützigte Mitarbeit an den klinischen Studien bedanken und bei denen, die meine Forschung maßgeblich finanziell unterstützt haben (European Respiratory Society, verschiedene Stiftungen und Elterninitiativen).

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinem Ehemann und meiner Familie bedanken, die mich in den letzten Jahren oft entbehren mussten und mich in der Zwischenzeit in meinen Aufgaben als Mutter unendlich unterstützt haben.

7. Lebenslauf

Name	Dr. Christiane Lex
Geburtsdatum	13.08.1969
Geburtsort	Dortmund
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Adresse	Schleiermacherstrasse 44, 06114 Halle/Saale
Telefon	0345/5216196
Email-Adresse	christianelex@hotmail.com

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1975-1979	Grundschule Dortmund
1979-1988	Phoenix-Gymnasium Dortmund
Mai 1988	Abitur (Note:1,8)
1988-1995	Studium der Humanmedizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1991-1992	Studium der Humanmedizin, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Frankreich, ERASMUS-Stipendium
1994	Studium der Humanmedizin, Presbyterian University Hospital University of Pittsburgh, USA
Juni 1995	Ärztliche Prüfung (Gesamtnote:gut)
1995-2002	Ärztin am Zentrum für Kinderheilkunde, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (Direktoren Prof. Dr. H.G. Lenard, Prof. Dr. U. Göbel, Prof. Dr. M. Bougois/Prof. Dr. K.G. Schmidt), seit 04/00 in der Pädiatrischen Pulmonologie und Allergologie tätig (Prof. Dr. A. Schuster)
Januar 1998	Promotion bei Prof. Dr. med. Haverkamp, Universitätskinderklinik Bonn, Thema: Psychomotorische Entwicklung beim fetofetalen Transfusionssyndrom (Gesamturteil: sehr gut)
März 2002	Anerkennung zur Ärztin für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
2002-2003	Forschungsaufenthalt am National Heart and Lung Institute at the Royal Brompton Hospital, Imperial College, School of Science, Technology and Medicine, London, UK (Prof. Andrew Bush, M.D.) Stipendium der "European Respiratory Society" (ERS)

2003-2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für
Kinderkardiologie und Pneumologie der Heinrich Heine
Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. K.G. Schmidt)

Februar 2006 Anerkennung der Zusatz-Bezeichnung Allergologie

seit Januar 2007 Oberärztin in der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder-
und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. D. Körholz)

Preise und Stipendien

Mai 1988 Abiturpreis des Fonds der Chemischen Industrie

Mai 1991 Einjähriges Auslandsstipendium des 'ERASMUS' Programms

Oktober 2002 Forschungsstipendium („long term fellowship“) der „European
Respiratory Society (ERS)“

Mai 2003 Reisestipendium der “British Lung Foundation“ für die 99.
Jahrestagung der “American Thoracic Society“, Seattle, USA

Mai 2004 Reisestipendium der GSK-Stiftung für die 100. Jahrestagung der
„American Thoracic Society“, Orlando, USA

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften

seit 1997 Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

seit 2000 Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie (GPA)

seit 2001 European Respiratory Society (ERS)

seit 2003 Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP), seit 2006 in
der Arbeitsgemeinschaft Lungenfunktion tätig

Gutachtertätigkeit für

Pediatric Pulmonology
Allergy

8. Publikationsliste

A. Originalarbeiten

Cooper TM, McMahon B, **Lex C**, Lenert JJ, Johnson PC. Cross-facial nerve grafting for facial reanimation: effect on normal hemiface motion. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:99-103.

Bonig HB, Hannen M, **Lex C**, Wolfel S, Banning U, Nurnberger W, Körholz D, Gobel U. Additive effects of infection and neutropenia on the induction of granulocytopoietic activity in vivo. *Cancer* 1999; 86:340-8

Bonig H, Körholz D, **Lex C**, Wolfel S, Gobel U. Monocyte deactivation and its reversal in a patient with chemotherapy-induced leukopenia and severe systemic infection. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34:39-42.

Haverkamp F, **Lex C**, Hanisch C, Fahnenstich H, Zerres K. Neurodevelopmental risks in twin-to-twin transfusion syndrome: preliminary findings. *Eur J Paediatr Neurol* 2001; 5:21-7.

Lex C, Körholz D, Kohlmüller B, Bonig H, Willers R, Kramm C, Gobel U. Infectious complications in children with acute lymphoblastic leukemia and T-cell-lymphoma - a rationale for a tailored supportive care. *Support Care Cancer* 2001; 9:514-21.

Li AM, **Lex C**, Zacharasiewicz A, Wong E, Erin E, Hansel T, Wilson NM, Bush A. Cough frequency in children with stable asthma: correlation with lung function, exhaled nitric oxide and sputum eosinophil count. *Thorax* 2003; 58:974-8.

Zacharasiewicz A, Wilson N, **Lex C**, Li A, Kemp M, Donovan J, Hooper J, Kharitonov SA, Bush A. Repeatability of sodium and chloride in exhaled breath condensates. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:273-5.

Steffens S, Sandquist S, Frank S, Fischer U, **Lex C**, Rainov N, Kramm C. A neuroblastoma-selective suicide gene therapy approach employing the tyrosine hydroxylase promoter. *Pediatr Res* 2004; 56:268-77.

Zacharasiewicz A, Wilson N, **Lex C**, Li A, Bush A. Effect of inhalation times on eNO. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:335-8.

Lex C, Payne DN, Li AM, Zacharasiewicz A, Wilson NM, Hansel T, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: Safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:318-24.

Zacharasiewicz A, Wilson N, **Lex C**, Erin EM, Li AM, Hansel T, Khan M, Bush A. Clinical Use of Non-Invasive Measurements of Airway Inflammation in Steroid Reduction in Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1077-82.

Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Nicholson AG, Wilson NM, Bush A. Is a two week trial of oral prednisolone predictive of target lung function in paediatric asthma? *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:521-7.

Zihlif N, Paraskakis E, **Lex C**, Van De Pohl LA, Bush A. Correlation between cough frequency and airway inflammation in children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:551-7.

Li AM, Sonnappa S, **Lex C**, Wong E, Zacharasiewicz A, Bush A, Jaffe A. Non-CF bronchiectasis: does knowing the aetiology lead to changes in management? *Eur Respir J* 2005; 26:8-14.

Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DNR, Wilson NM, Nicholson AG, Kharitonov SA, Barnes PJ, Bush A. Exhaled cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res* 2006 Apr 7;7:63.

Zihlif N, Paraskakis E, Tripoli C, **Lex C**, Bush A. Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:509-14.

Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, Hansel TT, Payne DN, Bush A. Airway Eosinophilia in Children with Severe Asthma: Predictive Values of Noninvasive Tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174:1286-91.

Lex C, Dymek S, Heying R, Kovacevic A, Kramm CM, Schuster A. Value of screening tests to predict exercise induced bronchoconstriction in atopic childhood asthma. *Pediatr Pulmonol* 42:225-30.

Lex C, Jenkins G, Wilson NM, Zacharasiewicz A, Hansel TT, Bush A, Payne DNR. Does sputum eosinophilia predict the response to systemic corticosteroids in children with difficult asthma? *Pediatr Pulmonol* 2007;42:298-303.

B. Übersichtsartikel

Lex C, Schuster A. Akute Asthmaanfälle im Kindesalter - Evidenzbasierte Akuttherapie. *Kinderärztliche Praxis* 2004;1:18-24.

Lex C, Schuster A. Lungenfunktionsuntersuchungen im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilk* 2005;153:885-898.

Lex C. Kausale Behandlung durch Hyposensibilisierung. *Pädiatrische Zeitung* 2005;9:12.

Barker M, **Lex C**, Möller A, Zacharasiewicz A, Horak F Jr. Exhalierendes Stickstoffmonoxid (eNO): Stellenwert für die Diagnostik und Therapie von Kindern und Jugendlichen mit Asthma bronchiale. *Monatsschr Kinderheilkd* 2007; 155: 560-562.

C. Buchartikel

Lex C, Fahnenstich H, Haverkamp F. Psychomotorische Entwicklung beim fetofetalen Transfusionsyndrom. In: Aktuelle Neuropädiatrie 1996. Boltshauser E., Schmitt B., Steinlin M. (ed.), 1997. Novartis Pharma, Nürnberg, S 421-8.

Klowat B, Heide M, John B., Krämer M., **Lex, C.**, Haverkamp F. Pathological generalized EEG findings in patients with or without epilepsy: is there a risk factor for motor and cognitive performance? In: New developments in child neurology. Perat, M. V. (ed.), 1998. Monduzzi Editore, Bologna, S511-3.

Lex C, Irsfeld H, Janssen G, Göbel U. Preoperative coagulation screening in children focused on PTT elevation. In: 30. Hämophiliesymposium 1999. Scharrer I, Schramm W (ed.), 2000. Springer, S417-9.

Lex C. Atemwegsremodeling und die Rolle der Cysteinyl-Leukotriene. In: Lungenkarrieren in Wort und Bild. Riedl-Seifert RJ (ed), 2007, Agilium Verlagsgesellschaft mbH, München, S 191-3.

9. Anlagen

- 9.1. Lex C, Dymek S, Heying R, Kovacevic A, Kramm CM, Schuster A. Value of surrogate tests to predict exercise-induced bronchoconstriction in atopic childhood asthma. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:225-230.
- 9.2. Zacharasiewicz A, Wilson NM, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, Khan M, Bush A. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1077-1082.
- 9.3. Lex C, Payne DN, Li AM, Zacharasiewicz A, Wilson NM, Hansel T, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: Safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:318-24.
- 9.4. Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, Hansel TT, Payne NR, Bush A. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests, *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1286-1291.
- 9.5. Lex C, Jenkins G, Wilson NM, Zacharasiewicz A, Erin E, Hansel TT, Bush A, Payne NR. Does sputum eosinophilia predict the response to systemic corticosteroids in children with difficult asthma? *Pediatr Pulmonol* 2007;42:298-303.
- 9.6. Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, Wilson NM, Nicholson AG, Kharitonov SA, Barnes PJ, Bush A. Exhaled breath condensate cysteinyl leucotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Resp Res* 2006;7:63.

Value of Surrogate Tests to Predict Exercise-Induced Bronchoconstriction in Atopic Childhood Asthma

Christiane Lex, MD,* Sabine Dymek, MD, Ruth Heying, MD, Alexander Kovacevic, MD, Christof M. Kramm, MD, and Antje Schuster, MD

Summary. Exercise challenge tests are helpful in the diagnosis and management of childhood asthma, but methodology is complex and time-consuming. The aim of this study was to investigate whether exercise-induced bronchoconstriction (EIB) can be predicted by the results of different surrogate tests in a pediatric population. Eighty-five children (mean age: 11 years, range: 5–16 years) with atopic asthma were studied. Measurements of exhaled nitric oxide (eNO), spirometry and whole body plethysmography were performed followed by a standardized exercise testing. Questionnaires were completed asking for respiratory symptoms within 2 weeks preceding the study protocol. In 12/85 children (14%), forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) was significantly reduced by $\geq 15\%$ after exercise testing. eNO was significantly elevated in this group of 12 patients as compared to patients without EIB (51.3 (31.1–67.3) parts per billion (ppb) versus 20.2 (10.9–42.3) ppb; $P=0.003$). All children with normal eNO levels (≤ 25 ppb) had normal lung function results after exercise; hence the negative predictive value (NPV) of elevated eNO levels for prediction of EIB was 100%. However, the positive predictive value (PPV) was only 28%. The NPV and PPV for reported asthma symptoms within 2 weeks preceding the study were 96% and 26%, respectively. Considering recent symptom history in addition to elevated eNO improved the PPV to 40%, and resulted in the best combination of sensitivity and specificity. No baseline lung function parameter predicted whether a patient would develop EIB or not. In conclusion, eNO measurements, symptom questionnaires and most efficiently a combination of both surrogate tests can be used as time-saving methods to exclude EIB in atopic childhood asthma. **Pediatr Pulmonol.** 2007; 42:225–230. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: asthma; children; exhaled nitric oxide; exercise testing; lung function; airway inflammation.

INTRODUCTION

Children with asthma suffer from exercise-induced bronchoconstriction (EIB) more often than asthmatic adults. One reason may be that children are more often engaged in physical activities. Diagnosis and control of EIB is helpful in the management of asthma since the degree of EIB has been shown to correlate with the degree of bronchial eosinophilic inflammation.¹ This is particularly important in atopic asthma, in which eosinophilic inflammation is one of the predominant inflammatory subtypes.

The diagnosis of EIB is made by demonstrating a decrease of 15% in forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) after an exercise challenge as compared to lung function under resting conditions, following the guidelines of the European Respiratory Society and the American Thoracic Society.^{2,3} EIB is usually studied with equipment such as treadmill and cycloergometer or by free running. Exercise challenges are complex, expensive and require a large space. Furthermore, an exercise challenge may cause significant discomfort for some patients. Thus, a simple, standardized, and

reproducible surrogate test would be a useful diagnostic tool to screen for necessity of EIB testing.

Questionnaires asking for respiratory symptoms, specific baseline lung function parameters, and exhaled nitric oxide (eNO), a marker of eosinophilic airway inflammation, have been studied as potential surrogate tests to diagnose EIB.^{4–8} All these tests are completely non-invasive and easy and quickly performed. To our knowledge, there is no study comparing the values of these different surrogate tests for prediction of EIB.

Department of Paediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

Grant sponsor: Juergen Manchot Foundation.

*Correspondence to: Dr. Christiane Lex, Department of Paediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich-Heine-University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail: lex@med.uni-duesseldorf.de

Received 11 May 2006; Revised 28 July 2006; Accepted 4 August 2006.

DOI 10.1002/ppul.20556

Published online 23 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

The aim of this study was to investigate whether in a group of children with atopic asthma, EIB can be predicted by one or more of these three surrogate tests or by a combination of these. We selected a group of atopic children, because this subgroup is most common in pediatric asthma and eNO as a marker of eosinophilic inflammation seems especially useful in atopic asthma.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Study Protocol

Eighty-five children with atopic asthma (age 5–16 years) were recruited from the pediatric asthma clinic of the Children's University Hospital Düsseldorf. Asthma was diagnosed clinically when children had episodic cough, breathlessness, and wheeze responsive to bronchodilators according to International and American Thoracic Society (ATS) criteria.^{9–12} Asthma was classified in different severity grades according to the National Asthma Education and Prevention Program/Expert Panel Report 2 Guidelines.¹³ Patients were only included in this study if they were non-smokers, cooperative to all testing, if they had no clinical evidence of a respiratory tract infection within 2 weeks preceding the study procedure and if they had been withholding short- and long-acting bronchodilators for at least 12 hr, and food or sweet drinks for at least 2 hr before the measurements were made.

Children underwent eNO measurements first, and then spirometry and whole body plethysmography, followed by an exercise challenge with a treadmill. A short questionnaire was completed asking for the frequency and the type of asthma symptoms, use of rescue bronchodilators, and maintenance treatment within 2 weeks preceding the study. Especially, patients were asked whether they had symptoms only while exercising or whether asthma symptoms also occurred in other situations. Atopy was defined by a serum-specific IgE > 0.34 kU/L or a positive skin prick test (wheal > 2 mm larger than negative control) to at least one antigen (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, cat, dog, grass pollen, birch pollen, *Aspergillus fumigatus*).

The study was approved by the local Ethics Committee, and written informed consent was obtained from parents and children recruited for the study.

eNO Measurement

eNO was measured prior to spirometry and body plethysmography using a chemiluminescence analyzer (NOA280, Sievers Instruments, Boulder, CO) with a sensitivity of < 0.1 parts per billion (ppb). Single-breath online measurements were performed at a constant expiratory flow of 50 ml/sec according to ERS/ATS guidelines.¹⁴ The analyzer was calibrated every day with two different gases, one with NO-free air, and one with

200 ppb of NO. Ambient NO-concentration was always below 5 ppb. The upper limit of normal was defined as 25.0 ppb.¹⁵

Lung Function Testing

Spirometry and whole body plethysmography (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Germany) were performed pre-exercise according to the criteria of the European Respiratory Society.¹⁶ Patients were asked to withhold β_2 -agonists for at least 12 hr; inhaled steroids were not withdrawn prior to testing. After measuring specific airway resistance ($sR_{aw,tot}$) by body plethysmography, baseline spirometry was performed. Forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁), forced vital capacity (FVC), forced expiratory flow between 25 and 75% of vital capacity (FEF_{25–75%}) were measured, and the FEV₁/VC ratio was calculated. The best of three manoeuvres was used for further analysis. The upper limit of normal for $sR_{aw,tot}$ was defined as 1 kPa \cdot s.¹⁷ All other lung function values were expressed as percentage of predicted pediatric reference values.¹⁸

Exercise Challenge

Exercise challenge was performed on a treadmill for 7 min (LE 300C, Jaeger, Germany) under stable environmental conditions. Speed was rapidly increased until the target heart rate of 80% of predicted maximum heart rate was reached. Spirometry was repeated 3 and 10 min after exercise. A decline in FEV₁ of at least 15% from baseline was considered confirmative for diagnosis of EIB.^{2,3}

Statistical Analyses

All analyses were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS for Windows, release 12.0; SPSS, Inc., Chicago, IL). Comparisons between groups were made using the Fisher's exact test and Mann–Whitney *U*-Test, as appropriate. Correlations were measured using the Spearman rank correlation. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Sensitivity, specificity, positive (PPV), and negative (NPV) predictive values were calculated, and receiver operator characteristic curves constructed according to Altman and Bland.^{19–21}

RESULTS

Clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Asthmatic children (42/85) were treated with inhaled corticosteroids, 8 of these received additional treatment with inhaled long-acting bronchodilators. Children (39) had mild intermittent asthma, 19 had mild persistent asthma, and 27 had moderate persistent asthma. In 12 of 85 children (14%), exercise challenge induced EIB, defined by a decrease in FEV₁ of $\geq 15\%$ from

TABLE 1—Clinical Characteristics of Patients

Total number	85
Age (years)	11.0 (5–16)
Male (n)	52
Baseline FEV ₁ (% predicted)	101.6 (93.6–111.2)
Asthma severity	
Mild intermittent asthma (n)	39
Mild persistent asthma (n)	19
Moderate persistent asthma (n)	27
Treatment in previous 2 weeks	
Inhaled steroids (n)	42
Inhaled steroid dose (µg/d)	0 (0–400)
Leukotriene antagonist (n)	4
Long-acting bronchodilators (n) ¹	8

Age data are expressed as mean (range), FEV₁ and inhaled steroid dose are expressed as median (range).

¹Withheld on the study day.

baseline. All these children had typical symptoms of tight chest or wheezing and inhaled 200 µg of salbutamol after significant fall in FEV₁ had been demonstrated. All patients were asymptomatic before leaving the lung function laboratory. None of the subjects who showed a fall in FEV₁ of <15% from baseline reported respiratory symptoms after the exercise challenge. There was no significant difference in age, sex, treatment with inhaled corticosteroids, or long-acting bronchodilators between patients who were and were not classified as EIB patients.

Predictive Value of the Questionnaire on Respiratory Symptoms

Thirty-eight out of 85 patients (45%) reported respiratory symptoms in the 2 weeks preceding the exercise challenge. Nine of these reported symptoms only during or after exercise, 29 children had symptoms triggered by exercise and other factors, for example, allergies. Thirty-two patients reported use of rescue bronchodilators. Frequency of bronchodilator use was about up to once/week in 22 patients, 2–3 times/week in 7 patients, and more than 3 times/week in 3 patients. There was a significant difference in the frequency of rescue bronchodilator use whether or not patients were diagnosed with EIB (*P* = 0.02). We analyzed whether and to what extent the presence or absence of reported symptoms predicted

EIB. Forty-five out of 47 patients without any reported symptoms were diagnosed not to have EIB. Hence, the NPV was 96% (Table 2). However, only 10 out of 38 patients with reported symptoms were diagnosed to have EIB (PPV 26%). Interestingly, patients whose asthma was triggered only by exercise had a positive exercise challenge less often than those patients who suffered from asthma symptoms triggered by different factors (1/9 vs. 9/29). However, this difference was not significant (*P* = 0.40).

Predictive Value of Specific Lung Function Parameters

Upon analysis of pre-exercise sR_{aw,tot} 45 children had values above the normal range. However, sensitivity and specificity of elevated sR_{aw,tot} for EIB were low, indicating that this parameter cannot be used as a surrogate test to predict EIB.

Pre-exercise FEV₁, FVC, FEV₁/VC, FEF_{25–75%}, and sR_{aw,tot} also did not predict the outcome of the exercise challenge (Table 3).

Predictive Value of Exhaled Nitric Oxide

eNO was measured in all subjects. The median (interquartile range (IQR)) value was 23.9 (12.1–51.4) ppb. Median eNO was significantly higher in the EIB group than in the non-EIB group (51.3 (31.1–67.3) versus 20.2 (10.9–42.3) ppb, *P* = 0.002, Table 3 and Fig. 1). There was a significant positive correlation between the magnitude of eNO and the maximum decrease in FEV₁ after exercise challenge as compared to baseline (*r* = 0.315, *P* = 0.003). Forty-two out of 85 patients (49%) had normal pre-exercise eNO levels (≤25.0 ppb). None of these patients demonstrated EIB, indicating sensitivity and a NPV of 100%. On the other hand, only 12 out of 43 patients with elevated eNO levels had EIB, indicating specificity and a PPV of 58% and 28%, respectively. The area under the receiver operator characteristics (ROC) curve yielded a value of 0.796 (Fig. 2). The cut off level of 25 ppb resulted in the best combination of sensitivity and specificity.

We also analyzed the predictive values of combining eNO and questionnaire-reported respiratory symptoms to

TABLE 2—Predicting Exercise-Induced Bronchoconstriction: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value (PPV), and Negative Predictive Value (NPV)

	Sensitivity (%) (with/without ICS)	Specificity (%) (with/without ICS)	PPV (%) (with/without ICS)	NPV (%) (with/without ICS)
Asthma symptoms in the preceding 2 weeks > 0/week (n = 38)	83 (100/75)	62 (64/59)	26 (24/29)	96 (100/92)
sR _{aw,tot} > 1.0 kPa · s (n = 45)	33 (50/25)	43 (53/33)	9 (11/8)	79 (90/67)
eNO > 25 ppb (n = 43)	100 (100/100)	58 (87/43)	28 (29/28)	100 (100/100)
Asthma symptoms and eNO > 25 ppb (n = 25)	83 (100/75)	79 (83/76)	40 (40/40)	97 (100/93)

TABLE 3—Comparison of Test Results in Children With Atopic Asthma With and Without Exercise-Induced Bronchoconstriction (EIB)

	With EIB (n = 12)	Without EIB (n = 73)	P-value
FEV ₁ (% predicted)	95.2 (88.0–105.3)	101.9 (95.0–114.0)	0.079
FVC (% predicted)	86.1 (78.1–98.1)	94.7 (85.0–105.6)	0.072
FEV ₁ /VC (% predicted)	116.2 (111.1–123.0)	114.9 (108.1–121.4)	0.453
FEF _{25–75%} (% predicted)	93.6 (72.5–101.2)	97.5 (79.0–12.1)	0.574
sR _{aw,tot} (% predicted)	208.3 (144.2–258.5)	218.8 (181.4–263.2)	0.341
eNO (ppb)	51.3 (31.1–67.3)	20.2 (10.9–42.3)	0.002

Results are expressed as median (interquartile range).

predict EIB. Twenty-five out of 85 children (29%) had both an elevated eNO and asthma symptoms in the 2 weeks preceding the challenge. Ten of these 25 children had EIB (PPV 40%). Since 58 of the remaining 60 children had no EIB, the NPV of the combination of eNO and symptom report was 97% (Table 2).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first pediatric study to investigate predictive values of symptom questionnaires, specific lung function parameters as well as eNO as surrogate tests for EIB. The principle findings of this study are first that, bronchial constriction in response to exercise was not seen in children with normal eNO values (≤ 25.0 ppb), second, that symptom questionnaires proved to be almost as reliable as eNO at ruling out the presence of EIB, and third that baseline lung function parameters such as sR_{aw,tot} could not predict EIB. Our data suggest that both a normal eNO level and the absence of asthma symptoms in the preceding 2 weeks both help to rule out EIB (NPV 100% and 96%, respectively). However, it was not possible to predict the presence of EIB by any of both surrogate tests (PPV 28% and 26% respectively). Considering both elevated eNO and reported symptoms at

the same time, improved PPV to 40%, at an NPV of 97% and resulted in the best combination of sensitivity and specificity. However, the possibility to predict the presence of EIB was still poor.

Over the last 10 years several clinical studies have investigated to what extent different surrogate screening tests may relate to EIB.^{4–8,22,23} In the clinical routine setting, most diagnoses of EIB are made by evaluation of reported exercise-related respiratory symptoms. However, interestingly, studies showed that self-reported exercise symptoms only poorly correlate with the results of specific exercise challenges.^{4,5} In our study, reported asthma symptoms in general but not reported exercise-related symptoms proved to be a predictor of EIB in children with atopic asthma. Thus, exercise challenge is predominantly positive in children whose asthma is unstable and who get symptoms triggered by various factors. Asthmatic

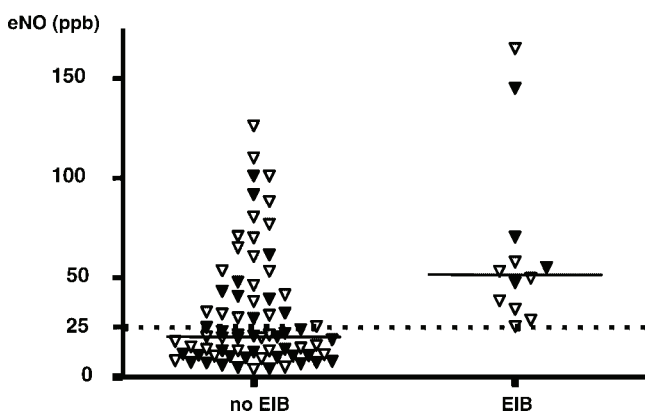


Fig. 1. eNO in subgroups with atopic asthma based on exercise challenge results. Open symbols indicate patients without inhaled corticosteroids. EIB, exercise-induced bronchoconstriction.

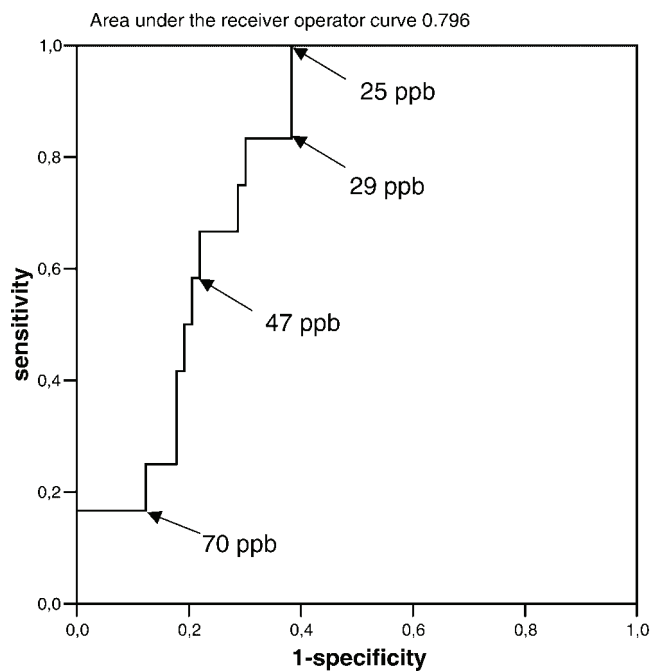


Fig. 2. Receiver operator characteristics (ROC) curves showing the sensitivity and (1-specificity) over a range of cut-off points for eNO for the prediction of exercise-induced bronchoconstriction.

children with symptoms occurring only while exercising are probably the milder ones in whom the exercise test is not necessarily positive.

It has also been investigated in the past whether lung function parameters measured at rest may allow predicting EIB. Comparing baseline FEV₁ and FEF_{25–75%} between patients with EIB and patients without EIB did not reveal any significant difference,^{6,22,23} which is in accordance with our own findings. The measurement of sR_{aw,tot} requires passive cooperation only and is independent of body size and age, which is especially useful in children.²⁴ To our knowledge, our study is the first to investigate the relationship between EIB and basal sR_{aw,tot}. However, our results could not demonstrate a potential use of sR_{aw,tot} for prediction of EIB.

The pathophysiology of EIB is complex. Exercise causes airway narrowing by hyperventilation and subsequent water loss and dehydration. The mechanism is thought to relate to cooling and rewarming of the airways or an increase in airway osmolarity releasing mediators from different cells of the airways.^{25–27} Different studies have shown that EIB correlates with the degree of eosinophilic inflammation.^{1,28,29} In an adult study, blood eosinophils correlated with the occurrence and severity of EIB.²⁸ However, this test needs blood to be drawn, a procedure that especially in children is usually associated with discomfort and consecutively with a high non-compliance, and should be avoided, if possible. Yoshikawa et al. and Otani et al. found that sputum eosinophils correlated with the severity of EIB in asthmatic adults.^{1,29} However, sputum induction and processing is even more time-consuming than exercise challenge testing, is inconvenient to the patient, too, and can also induce bronchial constriction. ENO, a marker of eosinophilic airway inflammation, has been suggested as a marker of airway responsiveness. ENO can easily and quickly be measured in children starting at school age, and eNO measurement itself is completely non-invasive. Studies published recently and also this study have shown a significant relationship between eNO levels measured pre-exercise and the maximum fall in FEV₁ after exercise challenge in asthmatic children.^{22,23} Our study showed in addition that eNO levels were significantly higher in the group of children with EIB than in the group of children without. However, the primary aim of our study was to find out whether pre-exercise eNO can predict the test result—positive or negative—of an exercise challenge. We were able to show that no child with normal pre-exercise eNO (≤ 25 ppb) had an abnormal exercise challenge result. However, several patients with normal exercise challenges had elevated eNO levels. Thus, in an attempt to optimize diagnostic procedures with respect to time and resources, exercise challenges may only be omitted if a patient shows normal eNO levels. In case of eNO levels above 25.0 ppb, exercise challenges should be performed as a valuable tool

for diagnosis of exercise-induced asthma and to monitor asthma control. After all, 49% of all patients included in our study had normal eNO levels indicating a substantial proportion of exercise challenges that can be replaced by this simple surrogate test. Considering reported symptoms in addition to eNO could also exclude EIB with a high reliability, and at the same time, could make exercise challenges unnecessary in even about 70% of the cases. No other cut off level for eNO would have been more useful in predicting or ruling out EIB.

Buchvald et al.⁸ reported NPVs of eNO for prediction of EIB to be 88% in steroid naïve asthmatic children and 96% in children with inhaled corticosteroid treatment. Both values are lower compared to those of our study. However, the study of Buchvald et al. included patients with asthma irrespective of their atopic status. This unselected patient group could be the reason why their NPVs were lower compared to our results, since eNO is a useful marker of inflammation in atopic asthma and not in nonatopic asthma. Nevertheless, in accordance with Buchvald et al., we also found lower NPVs in steroid naïve children than in children who were on inhaled corticosteroid treatment.

There are also a number of weaknesses in our study. First, the prevalence of EIB occurring in our patients (14%) is lower than reported in the literature.^{30,31} This is probably due to a relatively high proportion of asthmatic children in the present study who received long-term treatment with inhaled steroids rendering good asthma control. Sano et al.³⁰ reported a prevalence of EIB of 45% among children with mild to moderate asthma who had not used inhaled steroids during the month prior to exercise challenge testing. We cannot exclude a higher percentage of EIB as defined as $\geq 15\%$ reduction in FEV₁ in our own study population, though, since lung function was not continuously measured after exercise but only at two defined time points after exercise, and no conclusion can be drawn for the time between and after these time points. However, we intentionally chose this study design to achieve the highest degree of compliance in the children investigated.

Second, our study population was in some part heterogeneous including patients with different asthma severities and long-term treatments. However, the difference in sensitivity, specificity, PPVs, and NPVs of different surrogate tests was only small assuming that the results may be applied to most asthmatic children.

In summary, we have shown that EIB can be excluded in patients with normal eNO levels. Combining eNO measurement and symptom report can predict the absence of EIB in many more patients than does measuring eNO alone at a comparable level of reliability. Because eNO measurements and symptom questionnaires are very time-efficient and simple compared to the resource-consuming exercise challenge procedure, we suggest that exercise

challenges in atopic asthmatic children are required only in case of an elevated eNO level and the presence of self-reported asthma symptoms in the past 2 weeks.

REFERENCES

- Yoshikawa T, Shoji S, Fujii T, Kanazawa H, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J. Severity of exercise-induced bronchoconstriction is related to airway eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Eur Respir J* 1998;12:879–884.
- ERS Task Force on Standardization of Clinical Exercise Testing. Clinical exercise testing with reference to lung diseases: Indications, standardization, and interpretation strategies. *Eur Respir J* 1997;10:2662–2689.
- Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. Official Statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309–329.
- Panditi S, Silverman M. Perception of exercise induced asthma by children and their parents. *Arch Dis Child* 2003;88:807–811.
- Hallstrand TS, Curtis JR, Koepsell TD, Martin DP, Schoene RB, Sullivan SD, Yorioka GN, Aitken ML. Effectiveness of screening examinations to detect unrecognized exercise-induced bronchoconstriction. *J Pediatr* 2002;141:343–349.
- Fonseca-Guedes CHF, Cabral ALB, Martins MA. Exercise-induced bronchospasm in children: Comparison of FEV₁ and FEF_{25-75%} responses. *Ped Pulmonol* 2003;36:49–54.
- ElHalawani SM, Ly NT, Mahon RT, Amundson DE. Exhaled nitric oxide as a predictor of exercise-induced bronchoconstriction. *Chest* 2003;124:639–643.
- Buchvald F, Hermansen MN, Nielsen KG, Bisgaard H. Exhaled nitric oxide predicts exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic school children. *Chest* 2005;128:1964–1967.
- International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Bethesda, MD; 1992. NIH Publication No. 92–3091.
- Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225–244.
- Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, Zuin R, Beghe B, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:798–803.
- Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased Interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1290–1293.
- Expert Panel Report 2: National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Bethesda, MD; 1997. NIH Publication No. 97–4053.
- Baraldi E, de Jongste JC, European Respiratory Society; American Thoracic Society. Measurement of exhaled nitric oxide in children. *Eur Respir J* 2002;20:223–237.
- Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste J, Pijnenburg MW, Silkoff PE, Bisgaard H. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1130–1136.
- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;16:S5–S40.
- Lindemann H, Leupold W. 2003. Lungenfunktionsdiagnostik bei Kindern. Stuttgart: Kohlhammer. 69p.
- Zapletal A, Samanek M, Paul T. Lung function in children and adolescents. Methods, reference values. *Prog Respir Res* 1987;22:1–220.
- Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* 1994;308:1552.
- Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ* 1994;309:102.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994;309:188.
- Terada A, Fujisawa T, Togashi K, Miyazaki T, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K, Kamiya H, Togari H. Exhaled nitric oxide decreases during exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1879–1884.
- Scollo M, Zanconato S, Ongaro R, Zaramella C, Zacchello F, Baraldi E. Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;160:1047–1050.
- Klug B, Bisgaard H. Specific airway resistance, interrupter resistance, and respiratory impedance in healthy children aged 2–7 years. *Ped Pulmonol* 1998;25:322–331.
- McFadden ER Jr, Gilbert IA. Exercise-induced asthma. *N Engl J Med* 1994;33:1362–1367.
- Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:453–459.
- Lee TH, Nagakura T, Papageorgiou N, Cromwell O, Iikura Y, Kay AB. Mediators in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:634–639.
- Koh Y, Choi I. Blood eosinophil counts for the prediction of the severity of exercise-induced bronchospasm in asthma. *Respir Med* 2002;96:120–125.
- Otani K, Kanazawa H, Fujiwara H, Hirata K, Fujimoto S, Yoshikawa J. Determinants of the severity of exercise-induced bronchoconstriction in patients with asthma. *J Asthma* 2004;4:271–278.
- Sano F, Sole D, Naspitz CK. Prevalence and characteristics of exercise-induced asthma in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:181–185.
- Badargi A, Agudo A, Bardagi S, Agudo A, Gonzalez CA, Romero PV. Prevalence of exercise-induced airway narrowing in school children from a Mediterranean town. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1112–1115.

Clinical Use of Noninvasive Measurements of Airway Inflammation in Steroid Reduction in Children

Angela Zacharasiewicz, Nicola Wilson, Christiane Lex, Edward M. Erin, Albert M. Li, Trevor Hansel, Mohammed Khan, and Andrew Bush

Departments of Respiratory Pediatrics and Health Services Research, Clinical Trials and Evaluation Unit, Royal Brompton Hospital; National Heart and Lung Institute Clinical Studies Unit, Department of Thoracic Medicine, Imperial College, London, United Kingdom; Department of Pediatric and Adolescent Medicine, Pulmonary and Infectious Diseases, Wilhelminenspital, Vienna, Austria; and Department of Pediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

The use of noninvasive methods of monitoring airway inflammation, such as exhaled nitric oxide (eNO) and induced sputum, has been shown to improve asthma monitoring and optimize treatment in adult patients with asthma. There is a lack of comparable data in children. Forty children with stable asthma eligible for inhaled steroid reduction were reviewed every 8 weeks, and their inhaled steroid dose halved if clinically indicated. eNO, sputum induction combined with bronchial hyperreactivity testing, and exhaled breath condensate collection were performed at each visit to predict success or failure of reduction of inhaled steroids. Thirty of 40 (75%) children tolerated at least one dose reduction, 12 of 40 (30%) were successfully weaned off, and in total, 15 of 40 (38%) children experienced loss of asthma control. Treatment reduction was successful in all children who had no eosinophils in induced sputum before the attempted reduction. Using multiple logistic regression, increased eNO (odds ratio, 6.3; confidence interval, 3.75–10.58) and percentage of sputum eosinophils (odds ratio, 1.38; confidence interval, 1.06–1.81) were significant predictors of failed reduction. These findings suggest that monitoring airway inflammation may be useful in optimizing treatment in children with asthma.

Keywords: asthma; children; exhaled nitric oxide; sputum eosinophil counts

Asthma is characterized by variable degrees of airway obstruction, airway hyperresponsiveness, and chronic airway inflammation. Current guidelines emphasize that inhaled corticosteroid (ICS) treatment is the mainstay of asthma therapy because it targets the underlying airway inflammation. The possible side effects of ICS, particularly when administered in high dosages, are of particular concern (1). It is therefore essential to use the lowest possible dose of ICS compatible with good asthma control (2). Current guidelines for asthma management recommend that, after a period of stability, a reduction of ICS dose should be attempted. In clinical practice, the decision to try to reduce ICS dosage is based on reported symptoms and lung function (3). Reports of symptoms are often inaccurate (4); spirometry depends on cooperation and, even in symptomatic children, is often within the normal range (5). A number of noninvasive methods of assessing inflammation have been developed, such

as the measurement of exhaled nitric oxide (eNO), examination of the cellular and soluble content of induced sputum (sometimes in combination with a test of bronchial hyperresponsiveness [BHR]), and to some extent the analysis of exhaled breath condensate (EBC). Most of these methods have been used in cross-sectional studies, and very few of these studies have attempted to assess their utility to guide treatment in the asthma clinic. In a randomized study in adults, a strategy involving the measurement of BHR, and increasing ICS dose if there was an asymptomatic deterioration in this parameter, reduced asthma exacerbations and improved indices of airway remodeling over a 2-year period, at the cost of increased use of ICS (6). Green and colleagues (7) used sputum eosinophils to monitor treatment and showed that a strategy to normalize this parameter, regardless symptom control, reduced asthma exacerbations without increasing the use of ICS (7). Another study compared the ability of eNO, sputum eosinophils, and BHR to predict a relapse in asthma after stopping ICS, and showed that a rise in eNO predicted loss of control (8). Although eNO has been suggested as a potentially useful clinical tool in the management of asthma (9, 10), information is lacking on its use to monitor treatment in children in clinical practice. Despite the availability of methods of assessing airway inflammation, they are not routinely used to guide treatment, and there are no prospective longitudinal studies in children with asthma who are treated with ICS. The aim of this study was to assess the additional value of noninvasive markers of airway inflammation as predictors of success or failure of ICS reduction. We aimed to determine whether in the setting of a pediatric asthma clinic, measuring airway inflammation was of practical value in the management of the individual child, in whom clinically a reduction in ICS dosage was believed appropriate. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (11, 12).

METHODS

Subjects

Forty children (age, 6–17 years) with asthma (1) diagnosed by a pediatric respiratory physician (13) and (2) stable for at least 2 months (bronchodilator use < 3 times/week in past 2 months) on a constant ICS dose were recruited from the pediatric outpatients clinic.

Study Design

This was a prospective and observational study. Children eligible for ICS reduction according to current guidelines (3) were asked to participate. A follow-up visit was scheduled 2 months later unless a loss of asthma control occurred, in which case children were encouraged to attend for an immediate appointment. Full details of the dose reduction schedule are given in the online supplement. At each visit, a respiratory pediatrician unaware of the results of these markers made treatment decisions on the basis of clinical assessment and spirometry. The study was approved by the Royal Brompton Hospital Ethics Committee, and caregivers provided informed consent; children gave age-appropriate assent.

(Received in original form September 20, 2004; accepted in final form January 21, 2005)

Supported by a scholarship from the Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V. (A.Z.).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Angela Zacharasiewicz, M.D., Department of Respiratory Pediatrics, Royal Brompton Hospital, Sydney Street, London SW3 6NP, UK. E-mail: angela.zacharasiewicz@wienkav.at

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 171, pp 1077–1082, 2005

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200409-1242OC on February 11, 2005
Internet address: www.atsjournals.org

Assessment of Inflammation

eNO. eNO was measured using a chemoluminescence analyzer (NIOX; Aerocrine, Stockholm, Sweden) according to published European Respiratory Society/American Thoracic Society guidelines (14).

Sputum induction with combined BHR testing. Baseline spirometry was performed (Compact Vitalograph Ltd., Buckingham, UK) using at least three reproducible forced expiratory maneuvers to measure FEV₁ and FVC (15). Sputum induction was performed using the following equipment: a DeVilbiss 2000 ultrasonic nebulizer (Somerset, PA); a Hans Rudolph 2700, two-way non-re-breathing valve (Hans Rudolph, Inc., Kansas City, KS); and inhalation of hypertonic (4.5%) saline, as described elsewhere (16). If FEV₁ was more than 75% of predicted at baseline and the child had not used a short-acting β₂-agonist within the last 6 hours, we performed the procedure without premedication, allowing concurrent assessment of bronchial reactivity.

Sputum processing. Selected sputum plugs were processed as previously reported (17). Differential cell counts using Diff Quick-stained cytopspins were performed by an investigator blind to the clinical status of the patient.

EBC. Exhaled breath was collected for 10 minutes using an Echocreen condenser (Jaeger; VIASYS Healthcare, Hoechst, Germany) and samples stored immediately at -80° C. We measured nitrite/nitrate and cysteinyl leukotriene levels as previously described (18, 19).

Definition of Loss of Asthma Control

Loss of asthma control was defined as the use of bronchodilators more than five times per week (excluding the prophylactic use before exercise or with a viral cold). In such a case, ICS treatment was increased, and the child withdrawn from the study. A course of oral steroids precluded a further reduction of inhaled steroids.

Statistical Analysis

Predictors of exacerbation were sought using multiple logistic regression, with robust variance estimation adjusting for the clustering of repeat visits with failure as outcome. Details can be found in the online supplement. Sensitivity and specificity for the predictors were calculated, and receiver operator characteristic curves constructed. Correlations were measured using Spearman rank correlation. Results were expressed as means and SD or medians and interquartile ranges (IQR), as appropriate; a p value less than 0.05 was considered statistically significant. All data were analyzed using Stata 7 (StataCorp LP, College Station, TX) (20).

RESULTS

Steroid Reduction

Demographic data are given in Table 1, and trial profile in Figure 1. After the first ICS reduction, 30 of 40 (75%) children were stable for at least 2 months.

Fifteen children tolerated further reduction steps successfully. Ten of 40 (25%) children had an exacerbation after the first reduction, and 5 of 40 (13%) after the subsequent reductions; therefore, 15 of 40 children were unable to tolerate a reduction in ICS despite one being clinically indicated. For those remaining stable, the median starting dose before reduction was 400 μg (range, 200–500) ICS. Similarly, the median daily dose in those who subsequently suffered an exacerbation during ICS reduction

was also 400 μg (range, 200–800). The median ICS dose immediately before exacerbation was 250 μg (range, 100–750). The median time to exacerbation was 40 days (range, 25–71). Complete weaning off was successful in 12 of 40 (30%) children. There was no difference in atopic status between children who subsequently exacerbated and those who remained stable.

Induced Sputum, BHR testing, eNO, and EBC

Sputum induction was successful in 75% of children, 88% of whom agreed to repeat the procedure at the next clinic visit. All children who failed to produce a sputum sample at the first visit were also unable to produce a sufficient sample at the next visit. The median weight of sputum sample was 1.2 g (IQR, 0.6–2.1). eNO measurements were possible in the majority (89%) of children; results of BHR testing were eligible for analysis on 52 occasions (67%) where children fulfilled all criteria for bronchial hyperreactivity testing; EBC collection was possible in all the children.

Exacerbations. There was evidence of increased airway inflammation during an exacerbation. In five cases, loss of control was only reported retrospectively as not all children were able to attend the clinic during an exacerbation (see Figure E1 in the online supplement for FEV₁ values). During an exacerbation, the percentage of sputum eosinophils was significantly increased compared with the preceding stable visit (15.5% [IQR, 3–22] vs. 0.5% [IQR, 0–2], p < 0.005, paired data for n = 6). Similarly, eNO values were increased during an exacerbation (53 ppb [IQR, 29–82] vs. 16 ppb [IQR, 8–35], p < 0.05, paired data for n = 10). In contrast, neither nitrite/nitrate levels nor cysteinyl leukotrienes, measured in 22 and 21 children, respectively, increased before exacerbation, and the levels in children with stable asthma did not differ from levels found before or during an exacerbation (see Figures E2 and E3 in the online supplement).

Predicting result of ICS reduction. GROUP FINDINGS. The longitudinal measurements of sputum eosinophils and eNO for individual children during stepwise steroid reduction can be seen in Figure 2. Table 2 shows the odds ratios for percentage of sputum eosinophils, BHR testing, and eNO calculated from the individual models, adjusted for clustering of repeat visits. The percentage of sputum eosinophils was a significant predictor for failed reduction (exacerbation) in the single model. A positive BHR, defined as a fall of FEV₁ of more than 15% from baseline, and a raised eNO (≥ 22 ppb) were also significant predictors for failed steroid reduction. However, this effect was not found when eNO was analyzed as a continuous variable.

TABLE 1. DEMOGRAPHICS OF STUDY POPULATION

Male/female	30:10
Median age, yr (range)	12 (10–14)
ICS dose median, μg/d (range)	400 (200–500)
Mean FEV ₁ , % predicted (range)	88.5 (81.5–95.5)
Median sputum eosinophil, % (range)	2.0 (0.0–4.0)
Median eNO, ppb (range)	21.5 (8.5–33.0)

Definition of abbreviations: eNO = exhaled nitric oxide; ICS = inhaled corticosteroids.

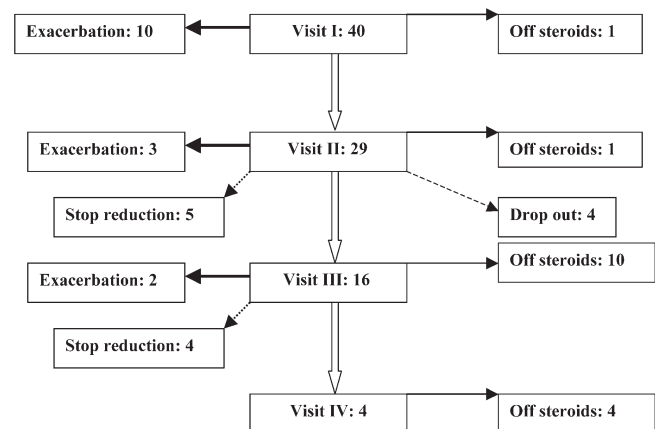


Figure 1. Trial profile.

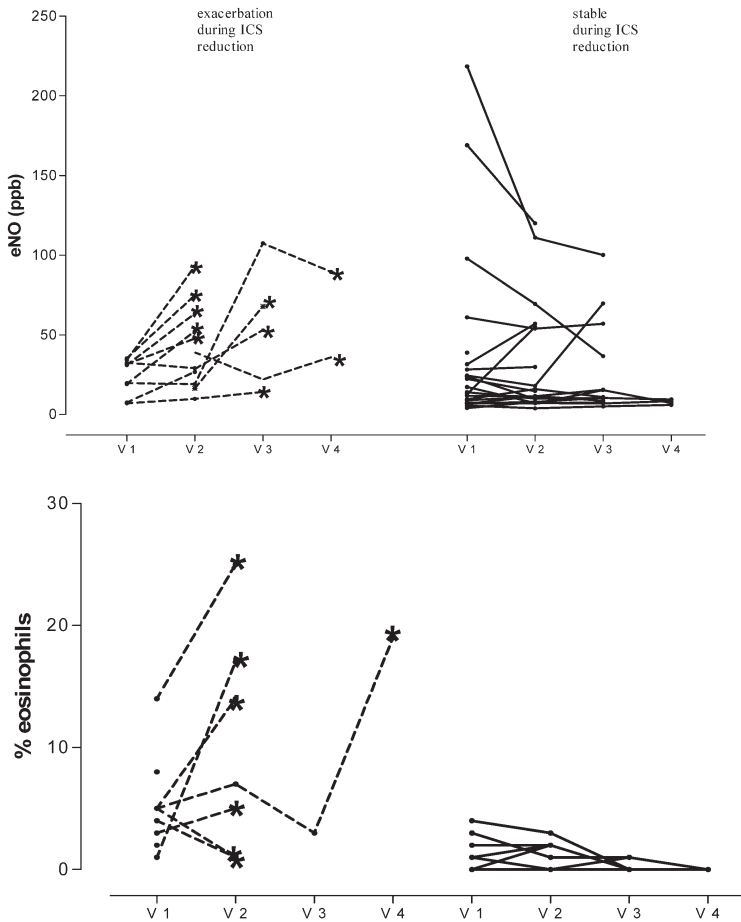


Figure 2. Exhaled nitric oxide (eNO) and sputum eosinophils during stepwise inhaled corticosteroid (ICS) reduction in subsequently exacerbated (left) and in stable (right) individuals over time. *Visit at exacerbation.

In the combined logistic regression model, we only used the binary variable of eNO (eNO ≥ 22 ppb) because it had shown a strong statistical significance in the single model. Sputum eosinophils and eNO were statistically significant predictors of exacerbation, whereas BHR lost statistical significance in the multiple logistic regression model (Table 3).

Statistically significant correlations using Spearman rank correlations were found for eNO and sputum eosinophils, as well as for BHR and eosinophils and eNO (see Table E1 in the online supplement).

DATA FOR PREDICTION IN INDIVIDUALS. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of the inflammatory markers are shown in Table 4. The negative predictive value of BHR, eosinophils, or eNO was high, predicting a favorable outcome of treatment reduction in 84.6, 78.7, and 92.5%, respec-

tively. The positive predictive value characterizing the percentage of children who subsequently experienced a loss of control with a positive test was 31.8% for a positive BHR test, 46.1% for sputum eosinophils, and 44% for an eNO of 22 ppb or greater.

Inhaled steroid reduction was successful in all children in the absence of eosinophils in sputum. Figure 3 shows the receiver operator characteristic curves for sputum eosinophils and eNO at various cutoff points.

DISCUSSION

This is the first article to report prospectively the predictive value of monitoring airway inflammation using noninvasive methods during ICS reduction in children with asthma. The percentage of sputum eosinophil and an eNO of 22 ppb or greater were

TABLE 2. SINGLE MODEL WITH ODDS RATIOS, CONFIDENCE INTERVALS, AND RECEIVER OPERATOR CHARACTERISTIC CURVE RESULTS FOR FAILURE OF REDUCTION (= EXACERBATION) FOR THE NONINVASIVE MARKERS TESTED ADJUSTED FOR CLUSTERING OF REPEAT VISITS

	OR	CI	p Value	SE	95% CI	Area under ROC
BHR fall > 15%*	2.75	1.33–5.69	0.006	0.086	0.44–0.78	0.62
eNO, ppb	1.00	0.99–1.00	0.137	0.068	0.61–0.87	0.74
ENO, ≥ 22 ppb	10.4	4.0–27.0	< 0.001	0.065	0.62–0.88	0.76
Sputum eosinophils, %†	1.36	1.22–1.51	< 0.001	0.068	0.67–0.94	0.81

Definition of abbreviations: BHR = bronchial hyperresponsiveness; CI = confidence interval; eNO = exhaled nitric oxide; OR = odds ratio; ROC = receiver operator characteristic.

*BHR test performed in combination with the sputum induction; defined as positive if fall of FEV₁ > 15% from baseline.

† The percentage of sputum eosinophils was analyzed as a continuous variable.

TABLE 3. MULTIPLE LOGISTIC REGRESSION MODEL FOR FAILURE OF REDUCTION (= EXACERBATION) ADJUSTED FOR CLUSTERING OF REPEAT VISITS AND DOSE INCLUDED AS CONFOUNDER

Markers	OR	CI	p Value
BHR fall > 15%*	0.699	0.08–5.60	0.73
Sputum eosinophils, %†	1.38	1.06–1.81	0.017
eNO > 22 ppb	6.30	3.75–10.58	0.000

Definition of abbreviations: BHR = bronchial hyperresponsiveness; CI = confidence interval; eNO = exhaled nitric oxide; OR = odds ratio.

*BHR test performed in combination with the sputum induction; defined as positive if fall of FEV₁ > 15% from baseline.

† The percentage of sputum eosinophils was analyzed as a continuous variable.

significant predictors for failed ICS reduction in children with apparently well-controlled asthma. Using these methods as part of a clinical assessment of the individual patient could help optimize therapy because 22% (15 children in 71 visits) of children failed reduction, despite fulfilling clinical guideline criteria.

A retrospective analysis of the visits before exacerbation showed that excluding children with an eNO of 22 ppb or greater could have prevented an exacerbation in 11 of 14 (78%) children and, in the case of sputum eosinophils of 3% or more, an exacerbation could have been predicted in 8 of 11 (72%) children. On the other hand, if these values were used as indicators not to reduce treatment, a sputum eosinophil count of 3% or more would have prevented an attempted inhaled steroid reduction in 6 of 28 (21%) and elevated eNO levels in 19 of 49 (39%) occasions, where ICS reduction was in fact successful. Inhaled steroid reduction was always successful in asymptomatic children without sputum eosinophils.

This study was not designed to determine whether it is better to risk an exacerbation in some children by aggressively reducing ICS dose or “play for safety” at a risk of overtreatment. Clearly, however, this is an important question.

We found that above-normal eNO (≥ 22 ppb) was a significant predictor of failed ICS reduction. The odds ratio of more than 6 is high; however, this is a result from the group data analysis. This result seems less convincing when applied to the individual child. For example, using the same cutoff of eNO greater than 22 ppb as in the multiple logistic regression means that more than 20% of the children with eNO levels below this

cutoff point will nevertheless fail ICS reduction. Similarly, more than 30% of children will remain stable during ICS reduction despite having elevated eNO levels. Combining the results of the percentage of sputum eosinophils, positive BHR, and elevated eNO in our model, sputum eosinophils and eNO were both significant predictors for exacerbation, whereas BHR lost significance. A combination using all three suggested methods increased the sensitivity to 60% and the specificity to 89% (Table 4).

Our study has a number of limitations. First, although we recruited 40 children, our results are based on only 15 exacerbations. We were unable to perform a power calculation before this study because of the lack of relevant previous pediatric data. Many (5 of 15) of these exacerbations could not be verified by the investigator because of the distances some of the children had to travel. Either a detailed history was taken and treatment instructions then given over the phone or, alternatively, some exacerbations were treated by local doctors and only reported retrospectively.

However, the drop in FEV₁, and rise in eNO and sputum eosinophils in the children we were able to study confirmed that at least these exacerbations were genuine, and implies that the ones we were unable to study, defined by the families on the same clinical criteria, were also likely to be genuine. We tried to reduce ICS in the same manner in all children. Interestingly, on five visits, the clinicians wished to reduce the dose, but the family was unwilling to risk a deterioration, despite the child meeting nationally agreed criteria for a treatment reduction. Likewise, on some visits, either the family or the pediatrician or both believed that a smaller reduction than directed by the protocol would be safer. Although this was subjective and not evidence-based, it is likely to reflect clinical practice in the real world.

We aimed to assess loss of asthma control likely to be caused by the decreased steroid dosage. Because the effect of ICS on mild virus-related symptoms in asthma is controversial, and is difficult to quantify, transitory deterioration of symptoms occurring during a clinically diagnosed viral cold and temporarily requiring a more frequent use of short-acting bronchodilators was excluded, and did not preclude a further dose reduction in inhaled steroids. A different basis for poor control of asthma and viral-related symptoms has been supported by others (21). This approach, which only applied to a few children, seems to have been justified, because three of five children successfully continued with ICS reduction despite virus-related symptoms.

TABLE 4. PREDICTING LOSS OF CONTROL: SENSITIVITY, SPECIFICITY, POSITIVE PREDICTIVE VALUE, NEGATIVE PREDICTIVE VALUE*

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)
BHR fall $\geq 15\%$ †	63.6	59.5	31.8	84.6
Eosinophils				
$\geq 0\%$	100	51.0	41.0	100
$\geq 1\%$	72.7	63.6	40	87.5
$\geq 2\%$	63.6	75.7	46.6	86.2
$\geq 3\%$	54.5	84.8	46.1	78.7
eNO				
≥ 22 ppb	78.6	68.6	44	92.5
≥ 35 ppb	71.4	82.4	52.6	91.3
≥ 22 + sputum eosinophils, %‡ + BHR fall $\geq 15\%$	60.0	89.6	66.7	86.7

Definition of abbreviations: BHR = bronchial hyperresponsiveness; eNO = exhaled nitric oxide.

*The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for failure of reduction (= exacerbation) for the noninvasive markers investigated, calculated from *t* tables.

† BHR test performed in combination with the sputum induction; defined as positive if fall of FEV₁ > 15% from baseline.

‡ The percentage of sputum eosinophils was analyzed as a continuous variable.

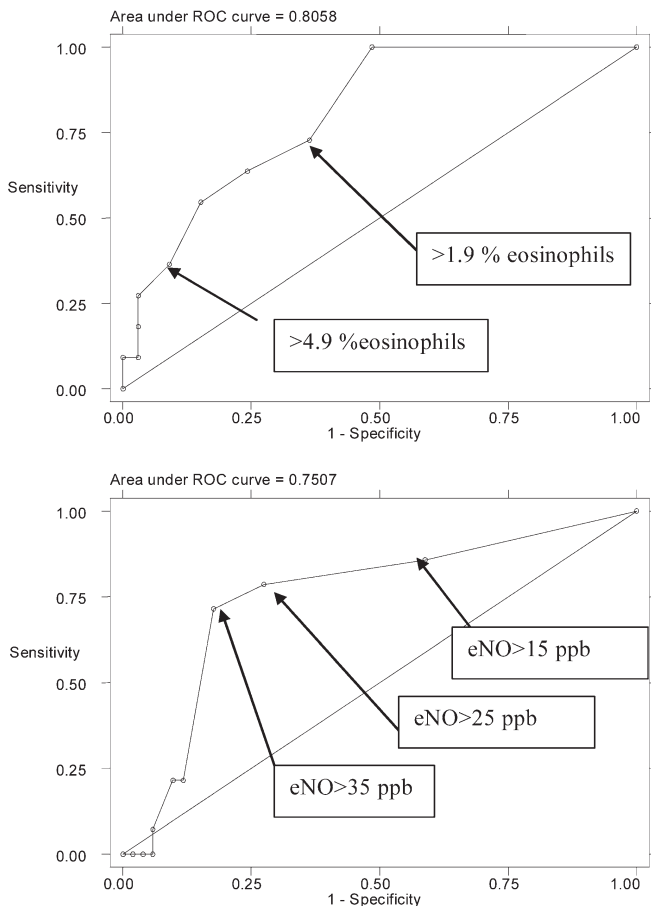


Figure 3. Receiver operator characteristic (ROC) curves showing the sensitivity and 1 – specificity over a range of cutoff points for sputum eosinophils ($n = 44$) and eNO ($n = 65$) for predicting failure of ICS reduction (= exacerbation).

We also did not ask the children to perform peak flow measurements. This was a deliberate decision, because they have been shown to be unreliable in children, with studies suggesting that more than 60% of the data were fabricated after 2 weeks of monitoring (22–24).

We also have no information on adherence to treatment. Metered dose inhalers with inbuilt recorders would have been helpful, but again, are not used in routine clinical practice, where adherence usually has to be taken on trust. Information concerning symptom control was obtained retrospectively from parents and children at the next clinic visit; however, in a routine clinical setting, this is normal practice.

In this study, EBC measurements of nitrite/nitrate levels and cysteinyl leukotrienes proved disappointing clinical tools. The small volumes of condensate obtained meant that we had to make arbitrary choices of what to measure, and our results cannot be taken to suggest that EBC has no role in the monitoring of asthma. In particular, and in retrospect, measurement of EBC pH (25) or levels of oxidants and antioxidants (26) might have been worthwhile. Further studies are needed to determine whether components of EBC other than those measured in this study would be valuable in monitoring children with asthma.

Our results are in many ways similar to those of adult studies addressing the importance of sputum eosinophils in monitoring disease status or predicting future symptoms. In one study, a

higher sputum eosinophil count at baseline was found in patients with subsequent exacerbations (27), and Leuppi and coworkers (28) found percentages of sputum eosinophils to be significantly greater before failure of reduction. In children, eosinophils in sputum were reported to be higher in children with asthma (29, 30), and the change in number was significantly associated with symptoms (31). What is novel in our study is the use of a panel of markers prospectively and the demonstration that some may be helpful in guiding therapy.

Our results do differ in some respects from adult studies (7, 8), in which it was suggested that eNO and sputum eosinophilia could be used interchangeably. Jones and coworkers (8) reported eNO and sputum to be equally useful in predicting exacerbation in adults; however, in their study, eNO measurements were made at weekly intervals, compared with every 8 weeks in our study. This, however, is not likely to be practical until a device for home monitoring of eNO becomes available.

As previously reported, sputum induction with combined hypertonic saline challenge has been found to be well tolerated, safe, and highly successful in children with asthma (15). A response to hypertonic saline in children is most strongly associated with current asthma and allergy symptoms (32). BHR, however, is not a direct marker of airway inflammation; it has been suggested to be a separate dimension in the description of chronic asthma (33). A considerable number of children had used bronchodilators before attending their clinical appointment; therefore, it was only possible to perform a test of BHR in a subgroup of children. A larger number might have shown a statistical significance in the multiple logistic regression model. However, there was a correlation between BHR and sputum eosinophils and eNO. Therefore, we suggest this test may be a surrogate marker for successful reduction in children in whom eNO measurements or sputum induction cannot be performed. However, a further prospective study is required to confirm this suggestion.

In conclusion, we have shown for the first time in children that the use of methods to monitor airway inflammation can help predict success or failure of ICS reduction. The number of exacerbations was relatively small, but inspection of the data suggests that our conclusion that eNO and sputum eosinophil measurements may be helpful is likely to be correct, although the absolute predictive values may be less reliable. These results need to be confirmed by other workers in larger numbers before they can be recommended for widespread clinical use. The data presented here can be used to inform the design of future studies. However, we have presented data, which for the first time provide proof of concept that the use of measurements of airway inflammation may be useful to guide therapy in individual children, and not merely be used to define mechanisms by looking at overlapping differences between groups.

Conflict of Interest Statement: A.Z. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; N.W. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; C.L. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; E.M.E. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; A.M.L. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; T.H. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; M.K. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; A.B. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors thank Dr. Louise Donnelly for her expertise in the measurement techniques of nitrite/nitrate levels in exhaled breath.

References

1. Skoner D. Update of growth effects of inhaled and intranasal corticosteroids. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:7–10.

2. Wilson JW, Robertson CF. Inhaled steroids—too much of a good thing? *Med J Aust* 2002;177:288–289.
3. The BTS/SIGN British guidelines on the management of asthma. *Thorax* 2003;58(Suppl 1):i1–i84.
4. Roberts EM. Does your child have asthma? Parent reports and medication use for pediatric asthma. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;157:449–455.
5. Davis SD. Neonatal and pediatric respiratory diagnostics. *Respir Care* 2003;48:367–385.
6. Sont JK, Willems LNA, Bel EH, van Krieken JH, Vanderbroucke JP, Sterk PJ, and the AMPUL Study Group. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long term treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1043–1051.
7. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw A, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715–1721.
8. Jones SL, Knittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, Taylor DR. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:738–743.
9. Artlich A, Busch T, Lewandowski K, Jonas S, Gortner L, Falke KJ. Childhood asthma: exhaled nitric oxide in relation to clinical symptoms. *Eur Respir J* 1999;13:1396–1401.
10. Strunk RC, Szeffer SJ, Phillips BR, Zeiger RS, Chinchilli VM, Larsen G, Hodgdon K, Morgan W, Sorkness CA, Lemanske RF Jr. Childhood Asthma Research and Education Network of the National Heart, Lung, and Blood Institute. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:883–892.
11. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Li A, Hansel T, Bush A. What markers help predict success or failure of steroid reduction in children [abstract]? *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:A295.
12. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Donnelly L, Kharitonov S A, Bush A. Prospective nitrite, nitrate and cys-leukotriene(cys-LTs) measurements in EBC (exhaled breath condensate) in asthmatic children and relation to outcome during inhaled steroid reduction [abstract]. *Eur Respir J* 2003;22:534s.
13. Von Mutius E. Presentation of new GINA guidelines for paediatrics. The Global Initiative on Asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30(Suppl 1):6–10.
14. Baraldi E, de Jongste JC, for the European Respiratory Society/American Thoracic Society Task Force. Measurements of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J* 2002;20:223–237.
15. American Thoracic Society. Standardization of spirometry: 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107–1136.
16. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1146–1149.
17. Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau LC, Radermecker M, Djukanovic R. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J* 1999;13:660–667.
18. Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001;56:456–461.
19. Czoma Z, Kharitonov SA, Balint A, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1345–1349.
20. Stata reference manual, release 7. 2. 2001;H-P:227–228
21. Reddel H, Ware S, Marks G, Salome C, Jenkins C, Woolcock A. Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. *Lancet* 1999;353:364–369.
22. Redline S, Wright EC, Kattan M, Kerckmar C, Weiss K. Short-term compliance with peak flow monitoring: results from a study of inner city children with asthma. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:203–210.
23. Gorelick MH, Stevens M, Schultz T, Scribano PV. Difficulty in obtaining peak expiratory flow measurements in children with acute asthma. *Pediatr Emerg Care* 2004;20:22–26.
24. Uwyyed K, Springer C, Avital A, Bar-Yishay E, Godfrey S. Home recording of PEF in young asthmatics: does it contribute to management? *Eur Respir J* 1996;9:872–879.
25. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, Urban P, Hom S, Gaston B, Hunt J. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J* 2003;22:889–894.
26. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, Carraro S, Zanconato S, Baraldi E. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;167:395–399.
27. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64–72.
28. Leuppi JD, Salome C, Jenkins CR, Anderson SD, Xuan W, Marks GB, Koskela H, Brannan JD, Freed R, Andersson M, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:406–412.
29. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:s100–s101.
30. Gibson PG. How to measure airway inflammation: induced sputum. *Can Respir J* 1998;5(Suppl A):22A–26A.
31. Gibson PG, Simpson J, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116–121.
32. Riedler J, Gamper A, Eder W, Oberfeld G. Prevalence of bronchial hyperresponsiveness to 4.5% saline and its relation to asthma and allergy symptoms in Austrian children. *Eur Respir J* 1998;11:355–360.
33. Rosi E, Ronchi MC, Grazzini M, Duranti R, Scano G. Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness, and airway function in asthma: results of a factor analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:232–237.

Sputum Induction in Children With Difficult Asthma: Safety, Feasibility, and Inflammatory Cell Pattern

Christiane Lex, MD,^{1,2} Donald N.R. Payne, MD, MRCPCH,¹ Angela Zacharasiewicz, MD,¹
Albert M. Li, MRCPCH,¹ Nicola M. Wilson, FRCPCH,¹ Trevor T. Hansel, PhD, FRCPath,³
and Andrew Bush, MD, FRCP, FRCPCH^{1*}

Summary. Difficult childhood asthma is defined by persistent symptoms despite maximal conventional therapy. We aimed to establish a safe method of sputum induction for these children and to study cytology and the relationship to exhaled nitric oxide (eNO). Sputum induction was performed in 38/40 children (aged 6–16 years) with difficult asthma, using 3.5% saline for four 5-min periods after bronchodilator pretreatment. Two children were excluded from sputum induction because postbronchodilator forced expired volume in 1 sec (FEV₁) was <65% predicted. Seven of 38 children had symptoms (dyspnea and wheezing) during induction; of these, 3 experienced a fall in FEV₁ of >20% from postbronchodilator FEV₁, readily reversed with salbutamol. Sputum induction was successful in 28/38 children, with a higher success rate in children ≥12 years than in younger children (87% vs. 50%, *P*=0.02). Only 9/28 had abnormal sputum cytology; of these, 6 had predominant sputum eosinophilia (>2.5% eosinophils, ≤54% neutrophils), while 3 had sputum neutrophilia (≤2.5% eosinophils, >54% neutrophils). Of 23 children with elevated eNO values, only 6 had sputum eosinophilia. In conclusion, sputum induction can be used to assess airway inflammation in children with difficult asthma, but abnormal sputum cytology is only present in a minority. Raised nitric oxide is only poorly predictive of sputum eosinophilia in these children.
Pediatr Pulmonol. 2005; 39:318–324. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: sputum induction; difficult asthma; airway inflammation; children; exhaled nitric oxide.

INTRODUCTION

A small number of children have difficult asthma, defined as persistent symptoms despite maximal conventional treatment.¹ Using endobronchial biopsy, it was shown that persistent eosinophilic airway inflammation is present in some of these patients.² However, bronchoscopy is invasive and cannot be used repeatedly. Exhaled nitric oxide (eNO) and sputum induction are both well-recognized noninvasive methods to assess airway inflammation. Whereas eNO was shown to be a surrogate marker of eosinophilic airway inflammation, particularly in steroid-naïve patients,^{3,4} sputum induction allows a wide range of cell types to be performed. For example, it was shown that neutrophilic airway inflammation is a feature of asthma in some patients, particularly in severe asthma,^{5,6} and this might explain their poor response to corticosteroids. A recent paper on adults suggested that titrating the dose of inhaled corticosteroids to sputum eosinophils improves asthma control.⁷ These results may be very important for children with difficult asthma, because these children are often taking high doses of inhaled steroids, with the attendant risks.⁸ However, sputum induction has not been studied in a larger group of children with difficult asthma. Safety and feasibility data are needed before sputum induction can be established in clinical and research practice for this difficult patient group.

The aim of this study was to evaluate the safety and feasibility of sputum induction in children with difficult asthma, using a standardized protocol. We investigated various factors which could influence the success rate in

¹Department of Respiratory Paediatrics, Royal Brompton Hospital, London, UK.

²Department of Pediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

³Clinical Studies Unit, Royal Brompton Hospital, London, UK.

Grant sponsor: European Respiratory Society; Grant sponsor: National Asthma Campaign, UK; Grant sponsor: Society of Pediatric Pneumology (German, Austrian, and Swiss).

*Correspondence to: Andrew Bush, M.D., F.R.C.P., F.R.C.P.C.H., Department of Respiratory Paediatrics, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, Sydney St., London SW3 6NP, UK.
E-mail: a.bush@rbh.nthames.nhs.uk

Received 24 April 2004; Revised 22 August 2004; Accepted 23 August 2004.

DOI 10.1002/ppul.20159

Published online 27 January 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

this special patient group. Sputum cytology was studied in order to investigate neutrophilic and eosinophilic airway inflammation; results were compared with eNO measurements made on the same occasion.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Forty children with difficult asthma (ages 6–16 years) with neither clinical evidence of a respiratory tract infection within 2 weeks, nor an asthma exacerbation within 3 days preceding the study, were studied. Asthma was diagnosed according to American Thoracic Society (ATS) criteria.⁹ Difficult asthma was defined as “symptoms requiring rescue bronchodilator on ≥ 3 days/week, despite $\geq 1,600$ μg of inhaled budesonide (or equivalent), and regular long-acting β_2 -agonist (or a previous unsuccessful trial of long-acting β_2 -agonist), and/or regular prednisolone.”² General characteristics of the patients are summarized in Table 1. Thirty-eight of 39 children were atopic, defined as a serum-specific IgE >0.34 kU/l or a positive skin-prick test for at least 1 of 5 common aeroallergens. In one child, atopic status could not be determined because of needle phobia.

The study protocol was covered by approval from the Ethics Committee of the Royal Brompton and Harefield Hospital National Health Service Trust.

TABLE 1—Clinical Characteristics of Children With Difficult Asthma¹

Number	40
Age (years)	12.4 (6–16)
Male, n	26
Atopic, n ²	38
Lung function	
Baseline FEV ₁ (% predicted) ³	74.0 (66.0–84.0)
Postbronchodilator FEV ₁ (% predicted)	85.0 (77.5–95.0)
Treatment in previous 2 weeks	
Inhaled steroid dosage ($\mu\text{g}/\text{day}$)	2,000 (2,000–4,000)
Budesonide, n	5
Fluticasone, n	35
Oral steroids, n	19
Oral maintenance steroids, n	14
Oral steroids in last week, n	5
Long-acting bronchodilator	39
Theophylline, n	2
Montelukast, n	16
Azithromycin, n	2
Intravenous immunoglobulin, n	1
Asthma control in previous 2 weeks	
Daily rescue bronchodilator use	35
Exacerbation of asthma (excluding last 3 days preceding study visit)	7

¹Age data are expressed as mean (range). Other data are expressed as median (interquartile range) or absolute numbers (n, out of 40).

²No data in one child.

³No data in 5 children who could not withhold short-acting bronchodilator for 4 hr.

eNO Measurement

eNO was measured using a chemiluminescence analyzer (NIOX[®], Aerocrine, Stockholm, Sweden) prior to spirometry and sputum induction according to European Respiratory Society (ERS)/ATS guidelines.¹⁰ The upper limit of normal for eNO was taken as 23.0 ppb, based on the findings of Warke et al.¹¹

Spirometry and Sputum Induction

Spirometry (Compact Vitalograph, Vitalograph Ltd., Buckingham, UK) was performed at baseline and 10 min after pretreatment with 1 mg salbutamol via a large-volume spacer. Reversibility was expressed as (post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) – baseline FEV₁)/FEV₁ predicted.¹² Patients were asked to withhold short-acting bronchodilator for 4 hr, if possible. Children with a postbronchodilator FEV₁ of $<65\%$ predicted were excluded from the induction procedure. Sputum induction was performed using an inhalation of hypertonic saline solution (3.5%) through a mouthpiece and a large two-way valve (Hans Rudolph, Inc., Kansas City, KS) connected with a DeVilbiss 2000 ultrasonic nebulizer (Sunrise Medical, Somerset, PA) with a maximum output (6 ml/min). The saline solution was inhaled at 5-min intervals for 20 min. After each inhalation period, the child was encouraged to cough and expectorate any sputum. Spirometry was repeated 30 sec after each induction interval or earlier in the event of troublesome symptoms. The procedure was discontinued if there was a fall in FEV₁ of $>20\%$ compared with the postbronchodilator value (“excessive bronchoconstriction”) or if troublesome symptoms or discomfort occurred.

Sputum Processing

Selected sputum (sputum plugs separated from saliva) was processed within 2 hr of sputum induction, according to the protocol of Pizzichini et al.¹³ In brief, a volume of 0.1% dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Poole, UK), 4 times the volume of the selected sputum sample, was added. Samples were gently mixed using a plastic transfer pipette, and placed on a tube rocker at 22°C for 15 min. Phosphate-buffered saline (PBS) was then added to the sputum in the same volume as DTT, and the samples were filtered through a 48- μm nylon mesh. After centrifugation at 400g (Sorvall RT6000D, Kendro, Bishop’s Stortford, UK) for 10 min at 4°C, the supernatant was aspirated and stored at –70°C. Cell pellets were resuspended in 1 ml PBS. Cell viability and total cell counts were then established by Trypan blue exclusion staining (Sigma-Aldrich). Cyto-centrifuged cells were stained with Diff-Quik[®] (Dade Behring, UK). Differential cell counts were expressed as a percentage of 400 cells, excluding squamous cells. A sputum sample was considered adequate if cell viability

was $>40\%$ ¹⁴ and if one countable cytospin for estimation of differential cell count, with minimal squamous contamination ($<50\%$) and pulmonary macrophages present, was produced.¹⁵ For the repeatability study, slides from 5 individuals selected at random were counted under blind conditions. Intraobserver repeatability was assessed by counting the same slide four times; within-sample repeatability was assessed by counting two different slides of the same sample.

Sputum inflammatory cell profiles were classified into 1 of 3 different patterns: 1) "eosinophilic" (eosinophils $>2.5\%$,^{16,17} neutrophils $\leq 54\%$ ¹⁸), 2) "eosinophilic-neutrophilic" (eosinophils $>2.5\%$, neutrophils $>54\%$), and 3) "neutrophilic" (eosinophils $\leq 2.5\%$, neutrophils $>54\%$).

Statistical Analyses

All analyses were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS for Windows, release 9.0, SPSS, Inc., Chicago, IL). Comparison between groups was made using Fisher's exact test and Mann-Whitney U-test, as appropriate. Correlations were measured using Spearman rank correlation. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Intraclass coefficients were calculated for intraobserver and within-sample repeatability. A value >0.75 was considered to represent a clinically useful method.¹⁹

RESULTS

Safety of Sputum Induction

Sputum induction was performed in 38 out of 40 children. Two children were excluded because post-bronchodilator FEV₁ was $<65\%$ predicted. Seven of 38 children developed noticeable symptoms during the 20-min inhalation protocol; of these, 3 experienced a significant ($>20\%$) fall in FEV₁, which was readily reversed with inhaled β_2 -agonists. Asthma symptoms resolved within 1 hr after completing the procedure. The other 4 children developed moderate symptoms, such as mild dyspnea and/or wheezing. Their FEV₁ did not drop significantly. Ten children reported mild symptoms, mainly at the end of the procedure (such as sore throat

or "discomfort" (such as "feeling tired" or "not liking the taste of 3.5% saline") (Table 2).

Feasibility of Sputum Induction

Sputum induction was successful in 28/38 children (74%). There was a significant effect of age. Only 7/14 children (50%) aged less than 12 years were able to produce an adequate sample, compared to 21/24 children (88%) who were 12 years or older (Fisher's exact test, $P = 0.02$). Twenty-one of 38 children (55%) completed the 20-min inhalation procedure. The median (interquartile range; IQR) time of inhalation was 20 (10–20) min, and only 5/38 children discontinued the procedure before 10 min. There was no significant difference in success rate whether or not the children discontinued the inhalation protocol (Table 2). All 7 patients who discontinued because of noticeable symptoms were able to produce an adequate sputum sample. The median (IQR) of the lowest FEV₁ measured during sputum induction was significantly lower in children who produced an adequate sample (77.5 (71.0–88.0)% predicted) than in children who could not produce an adequate sample (94.0 (81.0–106.0)% predicted, Mann-Whitney U-test, $P = 0.02$, Table 3). There was no significant difference in baseline FEV₁, reversibility, eNO, or maintenance use of oral steroids between the group in which sputum induction was successful and the group in which it was unsuccessful.

Sputum and eNO Results

The intraobserver intraclass coefficients for sputum cell counts were 0.99 for eosinophils, 0.92 for neutrophils, 0.98 for macrophages, 0.78 for lymphocytes, and 0.53 for epithelial cells. Intraclass coefficients were slightly lower for within-sample repeatability: 0.97 for eosinophils, 0.78 for neutrophils, 0.97 for macrophages, 0.79 for lymphocytes, and 0.58 epithelial cells.

There was no significant difference in total cell counts, viability, percent squamous cells, and differential cell counts whether the children completed the protocol or not (Table 4).

Analyzing the sputum cytology, only 9 of 28 children (32%) showed evidence of cellular airway inflammation. Six children had a predominately eosinophilic cell

TABLE 2—Safety and Feasibility of Sputum Induction in Children With Difficult Asthma

Adequate sample	n	Discontinuation of sputum induction due to			
		Excessive bronchoconstriction (fall in FEV ₁ $> 20\%$)	Moderate symptoms (wheezing, dyspnea)	Minor symptoms/discomfort	Complete induction
Yes	28	3 (11%)	4 (14%)	5 (18%)	16 (57%)
No	10	0	0	5 (50%)	5 (50%)
Total	38	3 (8%)	4 (11%)	10 (26%)	21 (55%)

TABLE 3—Comparison of Children With Difficult Asthma With and Without Successful Sputum Induction

	Adequate sputum sample		P value
	Yes (n = 28)	No (n = 10)	
Age ¹	13.0 (11.2–15.5)	10.0 (7.75–12.5)	0.01
Male/female	19/9	6/4	1.00
Regular oral steroids %	46.4	40.0	1.00
Baseline FEV ₁ (% predicted) ¹	72.5 (66.3–79.0)	84.0 (66.5–100.5)	0.15
Postbronchodilator FEV ₁ (% predicted) ¹	84.0 (79.0–94.0)	94.5 (82.5–108.8)	0.07
Reversibility (% predicted) ¹	10.0 (4.8–16.3)	5.0 (2.0–21.0)	0.33
Lowest FEV ₁ during induction (% predicted) ¹	77.5 (71.0–88.0)	94.0 (81.0–106.0)	0.02
Maximal fall in FEV ₁ from baseline FEV ₁ (% predicted) ^{1,2}	–4.5 (–14.5–1.75)	–6.0 (–19.5–2.0)	0.76
Maximal fall in FEV ₁ from PB FEV ₁ (% predicted) ^{1,2}	5.0 (2.3–10.0)	4.0 (–2.0–5.5)	0.18
Maximal fall in FEV ₁ from PB FEV ₁ (% of PB FEV ₁) ^{1,2}	6.0 (2.7–12.2)	3.6 (–4.0–5.0)	0.06
eNO (ppb) ¹	42.3 (24.3–77.9)	56.8 (28.5–86.8)	0.74

¹Results are expressed as median (interquartile range).

²During sputum induction. PB, postbronchodilator.

pattern; 3 children presented with a neutrophilic cell pattern (Fig. 1). None showed a combined eosinophilic-neutrophilic pattern. Three of 7 children with an exacerbation in the 2 weeks preceding the study showed eosinophilic inflammation, in comparison to 3/21 children without an exacerbation. However, the small numbers preclude drawing conclusions.

Sputum eosinophils correlated significantly with patients' inhaled steroid dosage (Spearman rank, $r = -0.52$, $P = 0.005$), but there was no significant relationship in sputum eosinophils whether the children were treated with oral steroids or not (Mann-Whitney U-test, $P = 0.52$). No significant correlation was found between sputum eosinophils and age ($r = -0.05$), baseline FEV₁ ($r = -0.30$), reversibility ($r = 0.28$), or fall in FEV₁ percent postbronchodilator FEV₁ ($r = -0.01$). There was also no significant correlation between sputum neutrophils and age ($r = 0.11$), inhaled steroid dosage ($r = -0.30$), baseline FEV₁ ($r = -0.33$), reversibility ($r = 0.37$), or fall in FEV₁ percent postbronchodilator FEV₁ ($r = 0.08$).

Analyzing the eNO results, a high proportion of children (33/40) had elevated eNO values >23 ppb. No significant correlation was found between sputum eosi-

nophils and eNO ($r = 0.09$). Seventeen of 23 children with elevated eNO values and an adequate sample had no sputum eosinophilia. However, all 6 children with raised sputum eosinophils also had elevated eNO values.

DISCUSSION

The principal findings of this study are, firstly, that sputum induction can safely be performed in symptomatic children with difficult asthma, with a yield comparable to studies in more mildly affected children; secondly, that the majority of these children do not have evidence of abnormal sputum cellularity despite being symptomatic; and thirdly, that many of these children have an elevation in eNO with no evidence of sputum eosinophilia.

An earlier study from our department included some children with difficult asthma,²⁰ but this is the first report on the safety and success rate of sputum induction in a larger group of children with difficult asthma. In children with mild to moderate asthma, the proportion of patients developing excessive bronchoconstriction was only assessed in a few studies and was reported to be between 0–4%.^{21–23} Grootendorst et al.²³ performed sputum

TABLE 4—Comparison of Sputum Parameters in Relation to Completion of Induction Protocol in Children Who Produced Adequate Sample¹

	Complete induction		P value
	Yes (n = 16)	No (n = 12)	
Total cell count, $\times 10^6$ /g sputum weight	0.88 (0.4–1.7)	1.2 (0.5–3.6)	0.45
Viability %	79.5 (68.4–82.6)	69.2 (58.0–75.4)	0.28
Squamous cells %	10.4 (1.2–23.5)	2.7 (0.7–12.3)	0.63
Eosinophils %	0.9 (0–1.9)	0.6 (0–3.2)	1.00
Neutrophils %	15.5 (4.8–27.9)	25.9 (3.8–32.9)	0.46
Macrophages %	74.5 (67.3–93.6)	72.4 (59.5–94.4)	0.78
Lymphocytes %	0.5 (0–1.7)	0.1 (0–0.9)	0.29
Epithelial cells %	0.3 (0–1.2)	0.3 (0.3–0.9)	0.66

¹Results are expressed as median (interquartile range).

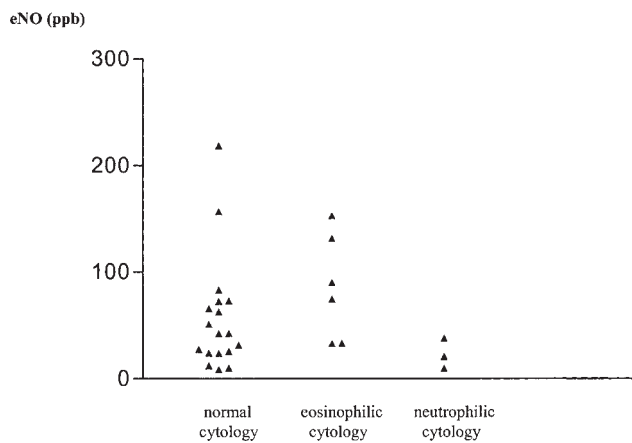


Fig. 1. eNO (ppb) in subgroups with difficult asthma, based on sputum cell profiles. Normal cytology: sputum eosinophils \leq 2.5%, neutrophils \leq 54%. Eosinophilic cytology: sputum eosinophils $>$ 2.5%, neutrophils \leq 54%. Neutrophilic cytology: eosinophils \leq 2.5%, neutrophils $>$ 54%.

induction on 20 adolescents (12–18 years) with severe stable asthma. None of them experienced a significant fall in FEV₁. However, this patient group was of stable rather than poorly controlled asthmatics. The percentage of excessive bronchoconstriction occurring in our patients (8%) is comparable with other studies performed in adults with asthma of varying degrees of severity (5.8–32%).^{24–26} There is only one published study investigating the safety of sputum induction in difficult asthma in adults. Ten Brinke et al.²⁷ reported that 22% of their study patients experienced excessive bronchoconstriction, defined as a fall of FEV₁ $>$ 15%. Patients whose postbronchodilator FEV₁ was $<$ 65% were not excluded, but the protocol allowed for a change in tonicity of saline solutions from 0.9% to 4.5%, depending on FEV₁ during induction. In the current study, we decided to use 3.5% saline to keep the protocol as simple as possible for the children. Ten Brinke et al.²⁷ also showed that excessive bronchoconstriction was more likely in patients who had had an increased use of rescue short-acting β_2 -agonists in the previous few days. In our study, the number of patients with excessive bronchoconstriction was too small ($n = 3$) to perform such a subanalysis, and in any case, all of our children needed rescue bronchodilator treatment at least 3 times a week by definition. The majority used rescue treatments several times a day.

The success rate of 74% for obtaining an adequate sputum sample in all children in our study and 85% in children \geq 12 years of age is comparable with studies in mild to moderate childhood asthma,^{20,28,29} indicating that sputum induction is a feasible method to assess airway inflammation, even in children with difficult asthma. This is the first report describing a significant effect of age on the success rate of this test procedure. Wilson et al.²¹ did not find any relationship between age and success rate,

perhaps because the children included were on average younger than in our study. The age effect was not related to a greater willingness of older children to complete the protocol, since there was no difference in time of nebulization between younger and older children. Interestingly, the children who were able to produce an adequate sputum sample had a significantly lower FEV₁ during sputum induction than the children who could not produce a sample. This might be related to greater severity of asthma or a higher degree of airway inflammation, although there was no difference in eNO between the two groups.

In this study, we tried as far as possible to complete the 20-min inhalation period, as it was shown that there are changes in sputum composition during the induction procedure, with a higher percentage of neutrophils in the sputum sample obtained in the first 10 min.³⁰ However, only 55% of the children completed our 20-min protocol. By comparison, an 11.5-min sputum protocol was completed by 98% of 53 children with variable asthma severity in a study by Jones et al.²⁹ In our study population, there were no differences in sputum composition whether or not the children discontinued the protocol (median inhalation time of children who discontinued the protocol, 10 min). However, we did not process the early and late sputum aliquots separately in those who inhaled saline for the full 20 min. Further research studies are needed to address the question of early and late sputum collection and cell composition in children, in order to determine the optimal length of sputum induction protocol.

In adults, it was shown that neutrophilic airway inflammation is a feature of severe asthma.^{5,6} Gibson et al. found evidence of neutrophilic inflammation in 59% of 56 patients with persistent severe asthma,⁵ and Green et al. in 23% of 259 adults with asthma of variable severity.⁶ This is the first report investigating different sputum inflammatory cell patterns in children with difficult asthma who did not have a concurrent acute exacerbation. Only a minority of children had sputum neutrophilia or eosinophilia in our study, despite being chronically symptomatic. There are a number of possible explanations for our findings. Firstly, neutrophilic airway inflammation may not be a feature of difficult asthma in children. Green et al. found in their study with adult asthmatics that the subpopulation of patients with neutrophilic inflammation was older and had a later onset of asthma than patients without neutrophilic inflammation.⁶ In childhood difficult asthma, the mechanism of symptoms might be non-inflammatory or not mediated by cellular inflammatory processes. Secondly, sputum cytology may have been normalized by the high doses of steroids, whereas deeper in the airway wall there may have been residual inflammatory cells. Nonetheless, our findings would at the very least raise questions about the strategy of treating children with difficult asthma with ever-escalating doses of potent anti-inflammatory medications.

Recently it was shown that a treatment strategy in adult asthmatics directed at normalization of the induced sputum eosinophil count, independent of any symptoms, reduces asthma exacerbations and admissions without the need for additional anti-inflammatory treatment.⁷ This group suggested that eNO could be used as a surrogate for sputum eosinophils if sputum induction was not possible. This strategy could be very useful in children with difficult asthma, as the attendant risks of high doses of inhaled steroids would justify the use of a detailed diagnostic program such as sputum induction. However, in this study we did not find a significant correlation between sputum eosinophils and eNO. Most patients with elevated eNO did not have sputum eosinophilia. Thus were we to use eNO in this group of patients as a surrogate for sputum eosinophilia, as suggested by Green et al.,⁷ a substantial number of children would be overtreated. However, further prospective studies are needed to address the best way of monitoring children with difficult asthma in clinical practice.

In conclusion, we showed that sputum induction can be performed safely in children with difficult asthma, and that it is a feasible method to assess airway inflammation, particularly in older children. However, future studies are needed to find out whether sputum induction is successfully tolerated on repeated visits. The results showed that the majority of symptomatic children did not have evidence of abnormal sputum cellularity, implying that the mechanism of their symptoms might be noninflammatory. Longitudinal studies are needed to further evaluate the possible mechanism of airway inflammation in difficult childhood asthma and to determine whether induced sputum, eNO, or another marker is helpful in the clinical management of this difficult patient group.

REFERENCES

- ERS Taskforce on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. *Eur Respir J* 1999;13:1198–1208.
- Payne DNR, Adcock IA, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1376–1381.
- Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;53:91–95.
- Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999;13:1386–1390.
- Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329–1336.
- Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002;57:875–879.
- Green RH, Brightling CE, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavard ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715–1721.
- Todd GR, Acerini CL, Buck JJ, Murphy NP, Ross-Russell R, Warner JT, McCance DR. Acute adrenal crisis in asthmatics treated with high-dose fluticasone propionate. *Eur Respir J* 2002;19:1207–1209.
- Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225–244.
- Baraldi E, de Jongste JC, European Respiratory Society, American Thoracic Society. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J* 2002;20:223–237.
- Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, Shields MD. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383–387.
- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report of Working Party standardization of lung function tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;16:5–40.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Lolovich J, Hargraeve FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308–317.
- Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J* 2002;37:19–23.
- Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, Clancy RL. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36–41.
- Gibson PG, Grootendorst DC, Henry RL, Pin I, Ryttila PH, Wark P, Wilson N, Djukanovic R. Sputum induction in children. *Eur Respir J* 2002;37:44–46.
- Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998;11:848–853.
- Gibson PG, Norzila MZ, Fakes K, Simpson J, Henry RL. Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:261–270.
- Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J* 2003;21:433–438.
- Wilson NM, James A, Uasuf C, Payne DN, Hablas H, Afrofoti C, Bush A. Asthma severity and inflammation markers in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:125–132.
- Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000;55:768–774.

22. Mattes J, Storm van's Gravesande K, Reining U, Alving K, Ihorst G, Henschen M, Kuehr J. NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. *Eur Respir J* 1999; 13:1391–1395.
23. Grootendorst DC, van den Bos JW, Romeijn JJ, Veselic-Charvat M, Duiverman EJ, Vrijlandt EJLE, Sterk PJ, Roldaan AC. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophil cationic protein to clinic severity. *Eur Respir J* 1999;13:647–653.
24. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47: 25–29.
25. Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon RF, Hussack P, Hargreave FE. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J* 2000;16:997–1000.
26. Pizzichini E, Pizzichini MM, Burigo AC, Ferreira SC. Sputum induction in stable steroid naive asthmatics: influence of prior use of beta2-agonist. *Eur Respir J* 1998;12:365S.
27. ten Brinke A, de Lange C, Zwinderman AH, Rabe KF, Sterk PJ, Bel EH. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol. Predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749–753.
28. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116–121.
29. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1146–1149.
30. Holz O, Jorres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1998;28:284–292.

Airway Eosinophilia in Children with Severe Asthma

Predictive Values of Noninvasive Tests

Christiane Lex, Flavia Ferreira, Angela Zacharasiewicz, Andrew G. Nicholson, Patricia L. Haslam, Nicola M. Wilson, Trevor T. Hansel, Donald N. R. Payne, and Andrew Bush

Departments of Pediatric Respiratory Medicine and Histopathology, and Cell Biology and Clinical Studies Units, Imperial College of Science, Technology, and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, United Kingdom; and Department of Paediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

Rationale: Children with severe asthma experience persistent symptoms despite maximal conventional treatment. Fraction of exhaled nitric oxide ($F_{E_{NO}}$) and sputum eosinophils are used as markers of airway inflammation to guide treatment with steroids, but no data are available on how reliable they are in predicting airway eosinophilia assessed bronchoscopically in these children.

Objectives: To determine how $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils predict airway eosinophilia measured in both bronchoalveolar lavage (BAL) and endobronchial biopsy.

Methods: Twenty-seven children with moderate to severe persistent asthma attempted measurement of $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils, followed by bronchoscopy, BAL, and endobronchial biopsy within 24 h.

Main Results: Significant correlations were found between eosinophils in sputum and both BAL eosinophils ($n = 20$, $r = 0.45$, $p = 0.045$) and $F_{E_{NO}}$ ($n = 23$, $r = 0.42$, $p = 0.049$). The relationship between $F_{E_{NO}}$ and BAL eosinophils was also significant with a stronger correlation ($n = 24$, $r = 0.54$, $p = 0.006$). The positive predictive value (PPV) for increased sputum eosinophil percentage ($> 2.5\%$) to detect elevated eosinophils in BAL ($> 1.19\%$) was 75%; the negative predictive value (NPV) was 63%. All patients with both increased sputum eosinophils and an elevated $F_{E_{NO}}$ value (> 23 ppb) had elevated eosinophils in BAL (PPV, 100%); the NPV of these two markers was 65%. Eight of nine patients without any sputum eosinophils had normal subepithelial eosinophil numbers ($< 1.2\%$; NPV, 89%). However, the PPV of any sputum eosinophils for increased subepithelial eosinophilia was only 36.4%.

Conclusions: There was moderate agreement between both $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils and BAL eosinophils. There was good NPV, but only poor PPV for these markers for mucosal eosinophilia.

Keywords: airway inflammation; bronchoalveolar lavage; endobronchial biopsy; exhaled nitric oxide; sputum induction

Children with difficult asthma experience persistent symptoms despite maximal conventional treatment. The management of these patients is complex, with little evidence to guide clinicians. Treatment decisions are usually made on the basis of reported symptoms and objective measures of lung function. However,

(Received in original form March 10, 2006; accepted in final form September 14, 2006)

Supported by the European Respiratory Society (C.L.), the National Asthma Campaign, UK (D.N.R.P.), the Society of Pediatric Pneumology (German, Austrian and Swiss; A.Z.), and the Royal Brompton and Harefield Charitable Fund B0437 (P.L.H.).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Prof. Andrew Bush, M.D., Department of Pediatric Respiratory Medicine, Imperial College of Science, Technology, and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, Sydney Street, London SW3 6NP, UK. E-mail: a.bush@rbht.nhs.uk

This article has an online supplement, which is accessible from the issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 174, pp 1286–1291, 2006
Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200603-352OC on September 14, 2006
Internet address: www.atsjournals.org

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Asthma is characterized by eosinophilia in sputum, in bronchoalveolar lavage, and in the bronchial wall, but the relationship between the three compartments is not known.

What This Study Adds to the Field

We show that, whereas bronchoalveolar lavage and sputum eosinophil counts are very similar, they do not relate to airway wall eosinophilia; it is unclear which is clinically important.

recent research suggests that monitoring airway inflammation, in particular sputum eosinophils and fraction of exhaled nitric oxide ($F_{E_{NO}}$), as a surrogate may also have a role in guiding steroid therapy (1–3). Such an approach is attractive for children with difficult asthma, in whom every attempt should be made to avoid the prescription of excessively high doses of inhaled or systemic corticosteroids.

Endobronchial biopsy and bronchoalveolar lavage (BAL) have traditionally been used for assessment of airway inflammation. However, bronchoscopy is not practical for most children or most centers. Even in specialist centers, bronchoscopic assessment of airway inflammation cannot be performed repeatedly. Longitudinal studies that have investigated the role of markers of eosinophilic airway inflammation to guide therapy have therefore used noninvasive methods, such as $F_{E_{NO}}$ and induced sputum. Previously, a number of research groups have demonstrated an association between $F_{E_{NO}}$ and airway eosinophils, measured bronchoscopically either using BAL or endobronchial biopsy, in children and adolescents with asthma (4–6). However, to our knowledge, there are no complete data in this age group investigating the relationship between noninvasive markers (induced sputum eosinophils, $F_{E_{NO}}$) and eosinophils in either BAL or endobronchial biopsy. This is important because if the aim of treatment is to prevent bronchial inflammation, incorrect use of noninvasive markers could lead to the wrong doses of inhaled steroids being prescribed. The hypothesis of this study is that $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils are closely related to BAL and mucosal eosinophilia.

The aim of this study was therefore to investigate the relationships between $F_{E_{NO}}$ and eosinophils in induced sputum, BAL, and the bronchial subepithelium in a group of children and adolescents with asthma undergoing bronchoscopy as part of their clinical evaluation. This involves assessment of lung function, $F_{E_{NO}}$, and sputum cytology, followed by a bronchoscopy, BAL, and endobronchial biopsy. Most children follow our difficult asthma protocol, in which measurements are done after a

course of systemic corticosteroids, usually prednisolone 40 mg daily, including noninvasive assessments of inflammation at the beginning of this course. The full details are discussed elsewhere (7), and given in more detail in the online supplement. We specifically aimed to determine how often FE_{NO} or sputum eosinophil values misclassified BAL or endobronchial eosinophils. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (8).

METHODS

Subjects

We recruited 27 children and adolescents with moderate to severe persistent asthma who underwent bronchoscopy, including endobronchial biopsy, as part of their clinical assessment (7, 9). Asthma was diagnosed according to American Thoracic Society (ATS) guidelines (10). Moderate to severe persistent asthma was characterized by "daily symptoms despite > 400 μ g of inhaled budesonide (or equivalent)" (11). Patient characteristics are shown in Table 1.

Study Design

Subjects underwent measurement of FE_{NO} , spirometry before and after bronchodilator, and sputum induction, followed by bronchoscopy, BAL, and endobronchial biopsy within 24 h. A questionnaire was completed about recent asthma symptoms, use of rescue bronchodilator, and maintenance treatment. Atopy was diagnosed if serum specific IgE was raised (> 0.34 kU/L) or skin-prick tests were positive (wheal > 2 mm larger than negative control) to one or more antigens (*Dermatophagoides pteronyssinus*, cat, dog, grass pollen, *Aspergillus fumigatus*). The study was approved by the local ethics committee, and written, informed consent was obtained from all parents and children recruited into the study.

FE_{NO} Measurement

FE_{NO} was measured using a chemiluminescence analyzer (NIOX; Aerocrine, Stockholm, Sweden) according to European Respiratory Society/ATS guidelines (12). The upper limit of normal for FE_{NO} was taken as 23.0 ppb (13).

TABLE 1. PATIENT CHARACTERISTICS

Number	27
Age, yr, mean (range)	11.4 (5–15)
Male	14
Atopic*	20
Baseline FEV_1 , % predicted†	73 (65–87)
Post-bronchodilator FEV_1 , % predicted	84 (79–91)
Treatment in previous 2 wk	
Inhaled steroid dosage (budesonide equivalent), μ g/d	2,000 (1,000–3,000)
Budesonide, n	8
Fluticasone, n	19
Oral or intramuscular steroids	23
2-wk course of prednisolone, 40 mg/d	10
Intramuscular triamcinolone, 80 mg	9
Short course of prednisolone because of worsening of symptoms	2
Maintenance oral prednisolone	2
Long-acting bronchodilator	27
Montelukast	16
Theophylline	2
Use of rescue bronchodilator in previous 2 wk*	
None	3
1–2 times/wk	2
3–6 times/wk	4
~ Daily	16

Age data are expressed as mean (range). Other data are expressed as median (interquartile range) or absolute numbers.

* No data in two children.

† No data in three children who could not withhold short-acting bronchodilator for 4 h.

Spirometry, Sputum Induction and Processing

Spirometry before and after bronchodilator and sputum induction and processing was performed as previously described (14). For subjects with a post-bronchodilator FEV_1 less than 65% predicted, sputum induction was performed with 0.9% instead of 3.5% saline. A normal sputum eosinophil percentage was defined as approximately 2.5% (14).

Bronchoscopy, BAL and Biopsy Processing

Bronchoscopy was performed as previously described (9). For the BAL, three aliquots of normal saline (1 ml/kg, maximum 40 ml) were instilled in the right middle lobe through the bronchoscope and the fluid retrieved by mechanical suction. Up to four endobronchial biopsies were taken from the subsegmental carinae of the right lower lobe using cupped forceps. Biopsies were initially fixed in formal saline.

BAL processing is described in the online supplement. A normal BAL eosinophil percentage was defined as less than 1.19% (15).

Endobronchial biopsies were processed into paraffin blocks. Five-micrometer sections were cut and stained with hematoxylin and eosin to assess morphology. Suitable sections (those with visible epithelium, reticular basement membrane, and subepithelium) were stained for eosinophils using EG2 antibodies as previously described (16). Positively stained cells were quantified using the validated stereologic technique of point counting as previously described (16), and expressed as volume density (%). For each subject, one section from between one to four biopsies was analyzed. A normal eosinophil volume density was defined as less than 1.2%, based on previous data from nonasthmatic control subjects (5, 16). All measurements were made independently and investigators were blinded to other results.

Statistical Analyses

All analyses were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS for Windows, release 12.0; SPSS, Inc., Chicago, IL). Correlations were measured using Spearman rank correlation. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Sensitivity, specificity, and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated, and receiver operator characteristic (ROC) curves constructed according to Altman and Bland (17–19).

RESULTS

Details of the subjects are shown in Table 1. Seventeen children were approximately 12 yr old; eight of these children were male and nine were female. Nineteen patients were included in our difficult asthma protocol, receiving either a course of oral corticosteroids or a single intramuscular injection of triamcinolone 2 wk preceding the study (7). There were no significant adverse events during sputum induction and bronchoscopy. We found anatomic abnormalities in 3 of 27 (11%) patients: a short right main bronchus with an abnormal branching pattern in one patient and tracheomalacia in two patients. Six patients had positive BAL cultures (*Staphylococcus aureus*, n = 4; *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, n = 1 each).

FE_{NO} could be measured in all subjects. The median (interquartile range [IQR]/absolute range [AP]) value was 20.3 (9.6–46.3/4.2–100.1) ppb. Eleven of 27 subjects had elevated values. Sputum induction was successful in 23 of 27 (85%) subjects. The median (IQR/AP) eosinophil percentage was 0.5% (0–2.5/0–23.25%). Detectable eosinophils were found in 12 subjects, of whom 5 had elevated values.

A satisfactory BAL cytospin was obtained in 24 of 27 (90%) subjects (median [IQR/AP] eosinophils: 1.0% [0.3–2.5/0–14.0%]). Ten subjects had BAL eosinophils above the normal range. Subepithelial eosinophils could be measured in 22 subjects. Five had values above the normal range.

There was a significant negative correlation between age and pre- and post- FEV_1 ($r = -0.64$, $p = 0.001$, and $r = -0.61$, $p = 0.002$, respectively) but not between age and FE_{NO} , sputum eosinophils, or BAL or biopsy eosinophils.

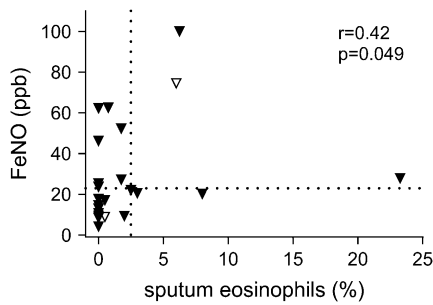


Figure 1. Spearman's correlations (r) between sputum eosinophils and $F_{E_{NO}}$. Open symbols indicate patients without systemic steroids. The upper limit of normal is shown by the dashed line.

Pre- or post-bronchodilator FEV_1 alone did not correlate with any of the other parameters ($F_{E_{NO}}$, or sputum, BAL, or biopsy eosinophils). However, bronchodilator reversibility correlated significantly with the percentage of sputum eosinophils ($r = 0.473$, $p = 0.035$), but not with $F_{E_{NO}}$ or BAL or biopsy eosinophils. There was no significant difference in pre- or post-bronchodilator FEV_1 , $F_{E_{NO}}$, or sputum, BAL, or biopsy eosinophils whether patients had been using rescue bronchodilator at least daily or less than daily.

Comparison between $F_{E_{NO}}$ and Sputum Eosinophils

There was 61% concordance ($n = 14$) between the two markers. Thirty percent of patients ($n = 7$) had a raised $F_{E_{NO}}$ but no elevation in sputum eosinophils; 9% ($n = 2$) had raised sputum eosinophils but normal $F_{E_{NO}}$ (Table E1 of the online supplement). There was a positive significant correlation between sputum eosinophils and $F_{E_{NO}}$ ($n = 23$, $r = 0.42$, $p = 0.049$; Figure 1).

Comparison between Endobronchial Biopsy and BAL Eosinophils

There was agreement between the two techniques in only 58% of children ($n = 11$). BAL eosinophilia with no biopsy eosinophilia was present in 32% ($n = 6$), whereas a positive biopsy with negative BAL was found in 10% ($n = 2$). There was no significant correlation between biopsy and BAL eosinophils ($n = 19$, $r = 0.36$, $p = 0.10$; Figure 2).

Comparison between Noninvasive and Invasive Markers of Airway Inflammation

The concordance between any noninvasive marker and any invasive marker ranged between 59 and 75% (Table E1). There was no consistent pattern whereby one marker consistently over- or underpredicted the other.

Comparison between $F_{E_{NO}}$ and sputum and BAL. There was a significant relationship between sputum and BAL eosinophils

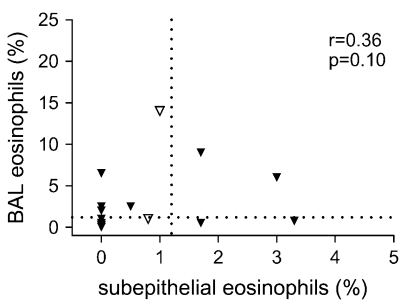


Figure 2. Spearman's correlations (r) between biopsy and bronchoalveolar lavage (BAL) eosinophils. Open symbols indicate patients without systemic steroids. The upper limit of normal is shown by the dashed line.

($n = 20$, $r = 0.45$, $p = 0.045$; Figure 3). There was also a positive relationship between $F_{E_{NO}}$ and BAL eosinophils and the correlation between both markers was even stronger ($n = 24$, $r = 0.54$, $p = 0.006$; Figure 3). We analyzed how well the presence or absence of elevated sputum eosinophil percentages or increased or normal $F_{E_{NO}}$ values predicted the presence or absence of eosinophils in BAL (Table 2). The PPVs were 75 and 64% and the NPVs were 63 and 77%, respectively. We also analyzed the predictive values for combining elevated sputum eosinophils and raised $F_{E_{NO}}$ values to predict increased BAL eosinophils. Because all children with both elevated $F_{E_{NO}}$ values and increased sputum eosinophil percentages had increased BAL eosinophils, the PPV was 100%. However, the NPV was 65% for this combination. Figure 3 also shows the ROC curves of $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils for prediction of BAL eosinophilia at various cutoff points. The area under the curve (AUC) was 0.850 for $F_{E_{NO}}$ ($p = 0.004$) and 0.747 for sputum eosinophils ($p = 0.063$).

Comparison between $F_{E_{NO}}$ and sputum and biopsy. There were no significant correlations between biopsy eosinophils and any of the other two parameters (sputum eosinophils [$n = 20$, $r = 0.36$, $p = 0.12$] and $F_{E_{NO}}$ [$n = 22$, $r = 0.07$, $p = 0.76$]; Figure 4). Eight of nine patients without any sputum eosinophils had subepithelial eosinophils within the normal range (NPV, 89%). However, only 4 of 11 patients who had detectable sputum eosinophils had elevated biopsy eosinophils (PPV, 36.4%). The PPV and NPV for $F_{E_{NO}}$ were similar to those of sputum (see Table 3). Figure 4 also shows the ROC curves for $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils at various cutoff points. The AUC was 0.624 for $F_{E_{NO}}$ ($p = 0.411$) and 0.600 for sputum eosinophils ($p = 0.513$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first pediatric study to investigate predictive values of both $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils for airway eosinophils assessed bronchoscopically, using BAL and endobronchial biopsy. The principal findings of this study are as follows: first, $F_{E_{NO}}$ is frequently elevated when sputum eosinophils are normal; second, there is moderate agreement between both $F_{E_{NO}}$ and sputum eosinophils and BAL eosinophils; third, normal eosinophils on endobronchial biopsy were predictable from either $F_{E_{NO}}$ or sputum eosinophils. The data suggest that an increased sputum eosinophil percentage is a reasonable predictor of the presence of airway eosinophils in BAL (PPV, 75%), but a normal sputum eosinophil percentage is less good at ruling out the presence of BAL eosinophils (NPV, 63%). Considering elevated sputum eosinophils and increased $F_{E_{NO}}$ together improves the PPV to 100%, but not the NPV, although the numbers are small. The ability to predict the presence of biopsy eosinophilia from sputum eosinophilia or $F_{E_{NO}}$ is poor (PPV, 20 and 30%, respectively); in contrast, biopsy eosinophilia is unlikely when there are no sputum eosinophils or a normal $F_{E_{NO}}$ value (NPV, 89 and 83%, respectively).

The subjects recruited to this study represent a highly selected subgroup of children and adolescents with problematic asthma, and the number of subjects studied is relatively small. It would have been valuable to try to correlate our findings with asthma severity or treatment, but the homogeneous severity of the group, and the difficulty of making comparisons between patients on prednisolone and triamcinalone, precluded us from performing this analysis. The findings cannot therefore be generalized to all patients with asthma. However, in practice, patients attending a tertiary center are those who will likely derive most benefit from (and have access to) regular monitoring of sputum eosinophils and $F_{E_{NO}}$. The data are therefore of particular importance for clinicians working in specialist centers.

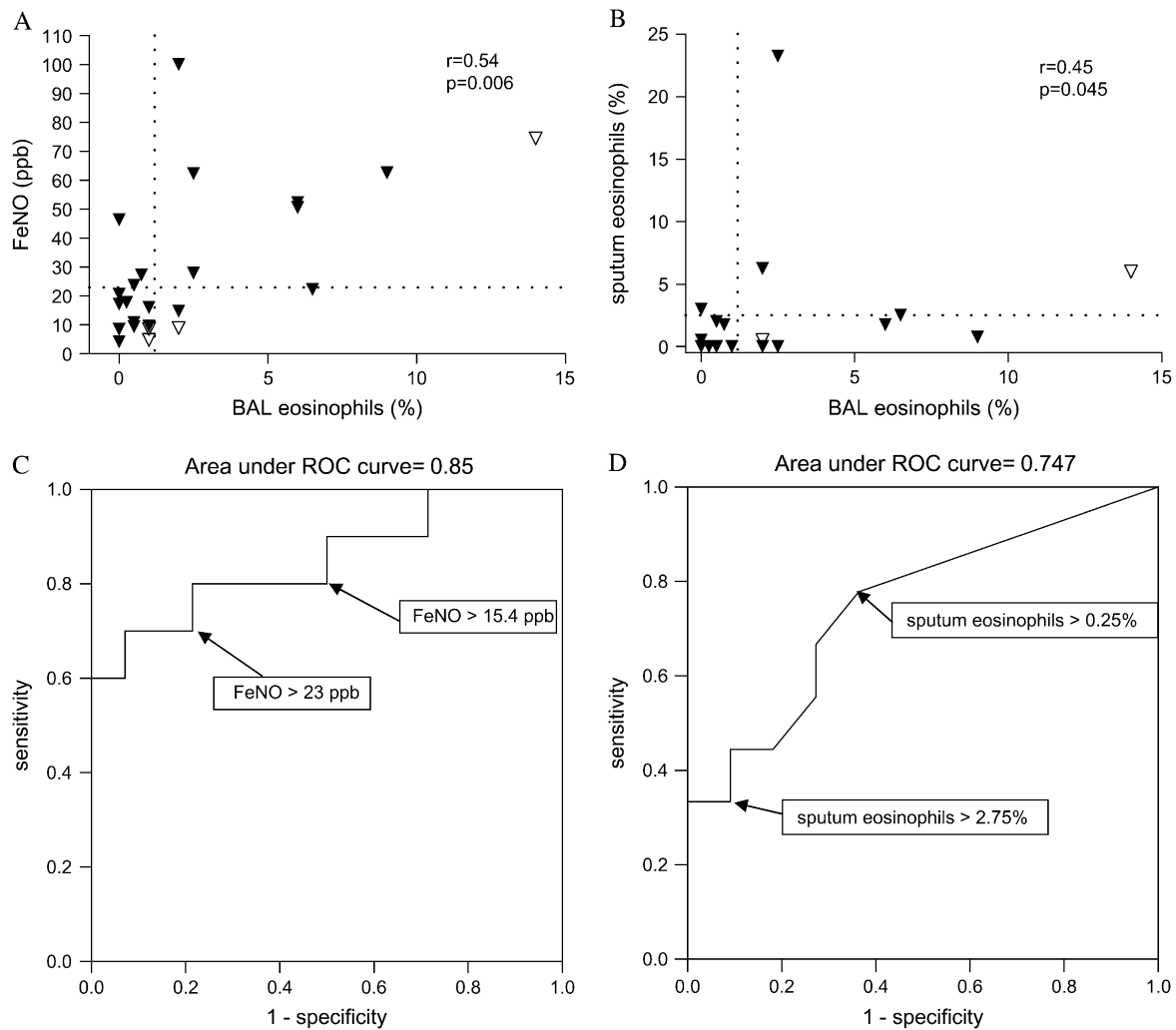


Figure 3. (A) Spearman's correlation between BAL eosinophils and $F_{E_{NO}}$ (for A–B, open symbols indicate patients without systemic steroids; the upper limit of normal is shown by the dashed line). (B) Spearman's correlation between BAL eosinophils and sputum eosinophils. (C) Receiver operator characteristics (ROC) curve for $F_{E_{NO}}$ for predicting BAL eosinophilia. (D) ROC curve for sputum eosinophils for predicting BAL eosinophilia.

The majority of subjects underwent assessment of eosinophilic airway inflammation after treatment with high-dose systemic corticosteroids. This means that the relationships described here may have been altered by steroid therapy, and may not be relevant in steroid-naïve patients with asthma, or those inhaling only a low dose of corticosteroids. Furthermore, the overall level of airway eosinophilia, for all methods used, was low and the range was narrow. In particular, over half the subjects had no detectable eosinophils present in their biopsy. Assessment of correlation between biopsy eosinophils and the other parameters is therefore difficult to interpret. However, the lack of any significant positive correlation between biopsy eosinophils and sputum eosinophils is in keeping with data from adult studies (20–22).

Of more practical relevance, and the major strength of this study, is that the data shed light on the relationships between eosinophilic airway inflammation assessed noninvasively and bronchoscopically. The combination of sputum eosinophils and $F_{E_{NO}}$ may help to identify, with confidence, patients with evidence of airway eosinophilia in BAL. However, it was not possible to predict the presence of biopsy eosinophilia—only its absence. The presence or absence of eosinophilia is of practical importance. Absence of eosinophils leads to consideration of

corticosteroid reduction. Persistent eosinophilia with symptoms leads to intensification of corticosteroid therapy, or the addition of a steroid-sparing agent such as cyclosporine. It should be stressed that we do not know, nor does this study elucidate, which measure of eosinophilia is most useful in guiding therapy. However, it should be noted that this study was cross-sectional, and thus the significance of the bronchoscopic findings could not be assessed.

It appears from the current study that the relationship between sputum and either BAL or biopsy is less in children than in adults with asthma (20–22). The percentage of sputum eosinophils may be due to the smaller pediatric sample sizes, which may be less representative for the complete airways. However, it is clear from the current study and from previous studies involving adults (20–22) that the different techniques described sample different airway compartments. The relationship between eosinophils in sputum and BAL is consistently stronger than that between sputum and biopsy. A possible explanation for this is the fact that both sputum and BAL sample inflammatory cells from a much larger area of the airways than is possible with biopsy. Another explanation may be that eosinophils traverse from the peripheral blood into the airway lumen far distal

TABLE 2. PREDICTING ELEVATED BRONCHOALVEOLAR LAVAGE EOSINOPHILS: SENSITIVITY, SPECIFICITY, POSITIVE PREDICTIVE VALUE, AND NEGATIVE PREDICTIVE VALUE

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)
Sputum eosinophils > 0%	78	64	64	78
> 2.5%	33	91	75	63
Fe _{NO} > 23 ppb	70	79	64	77
Sputum eosinophils > 0% and Fe _{NO} > 23 ppb	44	91	80	67
Sputum eosinophils > 2.5% and Fe _{NO} > 23 ppb	33	100	100	65

from the major airways that are sampled by biopsy, and thus are not seen in the proximal airways.

The data from the current study cannot be used to determine which is the most appropriate method for measuring eosinophilic airway inflammation in children and adolescents with difficult asthma. We do not know whether intraluminal or intramural eosinophils are more important in causing or monitoring this disease, and this study cannot answer that question. It is possible that clearing infiltrating eosinophils from within the airway wall, as assessed by biopsy, might even require lower steroid doses or a shorter treatment period than that used in this study, as we had fewer patients with biopsy eosinophilia than patients with BAL eosinophilia in our study. In clinical practice, noninvasive methods are more acceptable for monitoring of inflammation over time, with invasive methods more suited to one-off investigations of airway pathology in children with loss of symptom control despite high doses of inhaled and/or systemic steroids. The data from the current study help to highlight the similarities and differences between the methods described. However, if, as seems likely, targeting asthma therapy to reduce airway eosinophilia is desirable (1), then we need better markers than Fe_{NO} and induced sputum if this is to be optimally achieved. For example, sputum cytokine pattern, perhaps in combination with Fe_{NO} and sputum eosinophils, may be shown to be useful in future. Until then, children with difficult asthma who are on high doses of steroids may benefit from endobronchial biopsy to prevent overtreatment. However, it must be stressed that serial endobronchial biopsy is unlikely ever to be acceptable. Furthermore, the significance of proximal airway mucosal eosinophilia has been called into question by a recent study demonstrating that patients with asthma in apparent complete remission had ongoing airway wall eosinophilia to a similar degree to that of symptomatic patients with asthma (23).

In summary, these data show that, in a group of highly selected children on high-dose inhaled and systemic steroids, Fe_{NO} and induced sputum do not completely reflect but are a pointer to airway eosinophilia as measured by BAL or endobronchial biopsy. Furthermore, BAL and endobronchial biopsy themselves seem to measure inflammation in different compartments.

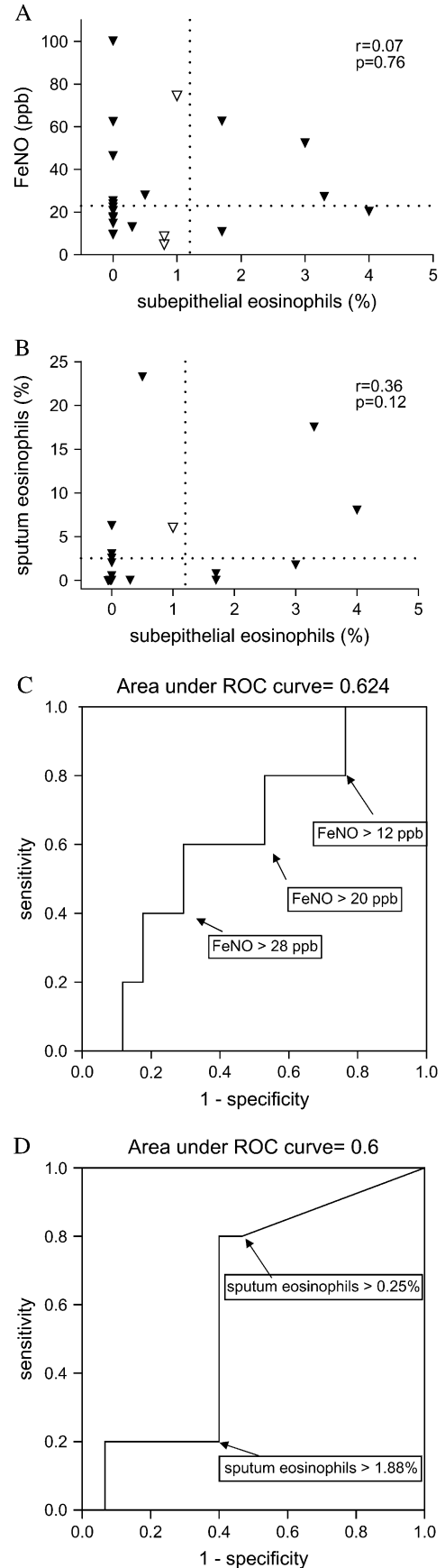


Figure 4. (A) Spearman's correlation between subepithelial eosinophils and Fe_{NO} (for A–B, open symbols indicate patients without systemic steroids; the upper limit of normal is shown by the dashed line). (B) Spearman's correlation between subepithelial eosinophils and sputum eosinophils. (C) ROC curve for Fe_{NO} for predicting subepithelial eosinophils. (D) ROC curve for sputum eosinophils for predicting subepithelial eosinophils.

TABLE 3. PREDICTING ELEVATED SUBEPITHELIAL EOSINOPHILS: SENSITIVITY, SPECIFICITY, POSITIVE PREDICTIVE VALUE, AND NEGATIVE PREDICTIVE VALUE

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)
Sputum eosinophils				
> 0%	80	53	36	89
> 2.5%	20	73	20	73
F _{ENO} > 23 ppb	60	59	30	83
Sputum eosinophils > 0% and F _{ENO} > 23 ppb	40	80	40	80
Sputum eosinophils > 2.5% and F _{ENO} > 23 ppb	20	80	0	71

However, the study shows a relationship between F_{ENO}, sputum eosinophils and BAL eosinophils. A combination of elevated sputum eosinophils and elevated F_{ENO} levels may be used as a predictor for BAL eosinophilia. An absence of sputum eosinophils or a normal F_{ENO} level may help to exclude mucosal eosinophilia measured in endobronchial biopsy. However, better non-invasive markers are needed to guide antiinflammatory therapy, at least in this difficult group of patients, if the goal of treatment is to reduce airway wall eosinophilia, rather than merely treat symptoms.

Conflict of Interest Statement: C.L. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. F.F. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. A.Z. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. A.G.N. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. P.L.H. is an inventor of international patent PCT GB 2005/001966 "Protease inhibitors and their therapeutic applications" owned by Imperial College Innovations. She has no other current relationships with a commercial entity. N.M.W. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. T.T.H. has received research grants in 2005 to 2006 of \$400,000 from GlaxoSmithKline, \$300,000 from Oxagen, \$200,000 from Novartis, and \$100,000 from Millenium. D.N.R.P. has received \$1,600 in 2005 from AstraZeneca for speaking at meetings and attending an advisory board meeting. A.B. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

References

- Green RH, Brightling CE, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavard ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715–1721.
- Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:831–836.
- Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, Khan M, Bush A. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1077–1082.
- Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, Shields MD.

- Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383–387.
- Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1376–1381.
- van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2107–2113.
- Payne D, Bush A. Phenotype-specific treatment of difficult asthma in children. *Paediatr Respir Rev* 2004;5:116–123.
- Lex C, Ferreira F, Payne DNR, Zacharasiewicz A, Nicholson A, Haslam P, Wilson NM, Hansel TT, Bush A. Comparison of noninvasive and invasive methods for assessment of airway inflammation in children with asthma. *Thorax* 2003;58SIII:iii61.
- Payne D, McKenzie SA, Stacey S, Misra D, Haxby E, Bush A. Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma. *Arch Dis Child* 2001;84:423–426.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225–244.
- National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1997. NIH Publication No. 97-4053.
- Baraldi E, de Jongste JC; European Respiratory Society; American Thoracic Society. Measurement of exhaled nitric oxide in children. *Eur Respir J* 2002;20:223–237.
- Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, Shields MD. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383–387.
- Lex C, Payne DN, Li AM, Zacharasiewicz A, Wilson NM, Hansel T, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:318–324.
- Fitch PS, Brown V, Schock BC, Taylor R, Ennis M, Shields MD. Chronic cough in children: bronchoalveolar lavage findings. *Eur Respir J* 2000;16:1109–1114.
- Payne DN, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, Jeffery PK. Airway inflammation in children with difficult asthma: relationships with persistent symptoms and airflow limitation. *Thorax* 2004;59:862–869.
- Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 1994;308:1552.
- Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 2: predictive values. *BMJ* 1994;309:102.
- Altman DG, Bland JM. Statistics notes: diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994;309:188.
- Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1926–1931.
- Silkoff PE, Trudeau JB, Gibbs R, Wenzel S. The relationship of induced inflammatory cells to BAL and biopsy. *Chest* 2003;123:S371–S372.
- Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, Van Krieken JH, Veselic-Charvat M, Sterk PJ. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997;27:769–779.
- van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2107–2113.

Does Sputum Eosinophilia Predict the Response to Systemic Corticosteroids in Children With Difficult Asthma?

Christiane Lex, MD,^{1,2} Gavin Jenkins, PhD,² Nicola M. Wilson, FRCPCH,¹
Angela Zacharasiewicz, MD,^{1,4} Ed Erin, MD,^{2,3} Trevor T. Hansel, PhD, FRCPATH,^{2,3}
Andrew Bush, MD, FRCP, FRCPCH,^{1*} and Donald N.R. Payne, MD, MRCPCH¹

Summary. Little evidence exists to guide the management of children with difficult asthma. The aim of this study was to determine whether children with difficult asthma, associated with sputum eosinophilia, are more likely to benefit from further treatment with high-dose systemic corticosteroids, compared to those without sputum eosinophilia. Induced sputum was obtained from 20 children aged between 8 and 15 years with difficult asthma before and after a systemic corticosteroid trial (prednisolone 40 mg/day for 14 days or a single 80 mg dose of intramuscular triamcinolone). Subjects were defined as “eosinophilic” if the baseline sputum eosinophil percentage was $\geq 2.5\%$ or “non-eosinophilic” if $< 2.5\%$. Clinical response to the corticosteroid trial was assessed using spirometry and clinical data and defined by an increase in pre-bronchodilator forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) $> 9\%$ predicted and/or an overall subjective improvement. Seventeen children had evidence of satisfactory adherence to the systemic corticosteroid treatment; eight of these were “eosinophilic” and nine were “non-eosinophilic” subjects. Following the trial there was a similar clinical improvement in both groups, with FEV₁ increasing in both the “eosinophilic” and “non-eosinophilic” groups (median change in FEV₁ 16 [range 5–54]% vs. 12.5 [1–29]% predicted). Sputum eosinophils fell in the “eosinophilic” group (median 17.5 [range 3–37]% vs. 0 [0–23]%, $P = 0.054$), with no change in the “non-eosinophilic” group (0 [0–2]% vs. 0 [0–1]%, $P = 0.12$). Sputum neutrophils did not change in either the “eosinophilic” (22.5 [5–50]% vs. 25 [0–91]%) or the “non-eosinophilic” group (27.5 [0–96] vs. 44 [9–96]%). In conclusion children with difficult asthma may benefit clinically from high-dose systemic corticosteroids even in the absence of sputum eosinophilia. **Pediatr Pulmonol.** 2007; 42:298–303. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: asthma; children; sputum induction; airway inflammation; eosinophilia; steroid trial.

INTRODUCTION

A small proportion of patients with asthma continues to experience frequent symptoms despite maximal doses of conventional therapy. The management of such patients with difficult or refractory asthma is complex, with little

evidence to guide further treatment.^{1–3} A number of recent studies have begun to examine the pattern of airway inflammation in adults with difficult asthma and to investigate whether or not this information can be used to guide subsequent pharmacological therapy.^{4–7} Ten Brinke et al.⁴ have suggested that the presence of

¹Department of Paediatric Respiratory Medicine, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, United Kingdom.

²Department of Paediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany.

³Clinical Studies Unit, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, United Kingdom.

⁴Department of Paediatric and Adolescent Medicine, Pulmonary and Infectious Diseases, Wilhelminenspital, Vienna, Austria.

Grant sponsor: European Respiratory Society; Grant sponsor: Asthma UK; Grant sponsor: The Society of Paediatric Pneumology (German, Austrian, and Swiss).

*Correspondence to: Prof. Andrew Bush, Department of Paediatric Respiratory Medicine, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, Sydney Street, London SW3 6NP, UK. E-mail: a.bush@rbht.nhs.uk

Received 4 August 2006; Revised 16 October 2006; Accepted 16 October 2006.

DOI 10.1002/ppul.20570

Published online 29 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

persistent eosinophilia in induced sputum may identify adults with difficult asthma in whom further aggressive treatment with high-dose systemic corticosteroids is likely to be beneficial. Similarly, Green et al.⁵ demonstrated that a treatment strategy that involved adjusting the dose of inhaled corticosteroids according to the level of sputum eosinophils, rather than symptoms, resulted in improved asthma control. The same group has reported that sputum neutrophilia appears to be associated with a poorer response to corticosteroid treatment.^{6,7}

A number of cross-sectional, descriptive studies have provided information about the pattern of airway inflammation in children and adolescents with difficult asthma.⁸⁻¹⁰ However, there are no published studies investigating whether knowledge of the underlying inflammatory profile is useful in guiding therapy in this group of patients. Like others, we have demonstrated that performance of sputum induction is feasible and safe in children and adolescents with asthma.^{11,12} In the current study we examined the change in the inflammatory cell profile in induced sputum in a group of children and adolescents with difficult asthma following treatment with high-dose systemic corticosteroids. We aimed to test the hypothesis that patients who have persistent symptoms, associated with sputum eosinophilia, following treatment with high-dose inhaled or oral corticosteroids, are more likely to benefit clinically from further treatment with high-dose systemic corticosteroids, compared to those without sputum eosinophilia.

MATERIALS AND METHODS

Assessment of Patients With Difficult Asthma Using a Corticosteroid Trial

As part of the clinical assessment of children and adolescents referred to the Royal Brompton Hospital for evaluation of difficult asthma, our practice has been to prescribe all patients a trial of high-dose systemic corticosteroids (either oral prednisolone 40 mg/day for 2 weeks or a single dose of intramuscular triamcinolone 80 mg), in order to determine the response to aggressive corticosteroid treatment. The clinical response to the trial is assessed using a combination of lung function, symptom-free days, and overall subjective response. In addition, for this current study, inflammatory cell profiles in induced sputum have been compared before and after the corticosteroid trial.

Subjects

Children and adolescents with difficult asthma who were able to produce an adequate sputum sample both before and after the steroid trial were studied. Asthma was diagnosed according to American Thoracic Society¹³ criteria. Difficult asthma was defined as "symptoms

requiring rescue bronchodilator on at least 3 days/week, despite treatment with $\geq 1,600$ $\mu\text{g/day}$ inhaled budesonide or equivalent, and regular long acting β_2 -agonist (or a previous unsuccessful trial of long acting β_2 -agonist) and/or regular prednisolone."¹⁰ For each patient, the treating physician did not consider non-compliance with regular medication to be a major factor contributing to the poor asthma control. Before the corticosteroid trial, all subjects performed spirometry, before and after bronchodilator (1 mg of salbutamol via a metered dose inhaler with large volume spacer),¹⁴ followed by sputum induction. Subjects then recorded the number of symptom-free days for 2 weeks, after which spirometry and sputum induction were repeated. Serum cortisol was measured in all subjects and serum prednisolone measured in those to whom it was prescribed. Treatment adherence was ensured in those who received intramuscular triamcinolone. Adherence to prednisolone was considered satisfactory if there was detectable prednisolone, with cortisol < 100 nM.¹⁵ Only those subjects with evidence of satisfactory adherence to treatment with systemic corticosteroids were included in the analysis.

The study protocol was covered by approval from the Ethics Committee of the Royal Brompton and Harefield Hospital National Health Service Trust.

Sputum Induction

Sputum induction was performed using nebulized saline and a DeVilbiss 2000 ultrasonic nebulizer (Sunrise Medical, Somerset, PA). For subjects with a post-bronchodilator FEV₁ $\geq 65\%$ predicted, induction was performed using hypertonic (3.5%) saline solution. For those with a post-bronchodilator FEV₁ $< 65\%$ predicted, 0.9% saline was used. The induction protocol was the same for both visits for any given individual. The saline solution was inhaled at 5 min intervals for 20 min. After each inhalation period subjects were encouraged to cough and expectorate any sputum. Spirometry was repeated 30 sec after each induction interval or earlier in the event of troublesome symptoms. The procedure was discontinued if there was a fall in FEV₁ of $> 20\%$ compared with the post-bronchodilator value or if troublesome symptoms or discomfort occurred.

Sputum Processing

Selected sputum (sputum plugs separated from saliva) was processed within 2 hr of sputum induction according to the protocol of Pizzichini et al.¹⁶ In brief, a volume of 0.1% dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Poole, UK) four times the volume of the selected sputum sample was added and samples gently mixed. Phosphate-buffered saline was added to sputum in the same volume as dithiothreitol and the samples filtered through a 48 μm nylon mesh. After centrifugation at 400g (Sorvall

RT6000D, Kendro, Bishop's Stortford, UK) for 10 min at 4°C, the supernatant was aspirated and stored at -70°C. Cell pellets were resuspended in 1 ml phosphate-buffered saline. Cell viability and total cell counts were established by trypan blue exclusion staining (Sigma-Aldrich). Cyto-centrifuged cells were stained with Diff-Quik® (Dade Behring, Eschborn, Germany). Differential cell counts were expressed as a percentage of 400 cells, excluding squamous cells. A sputum sample was considered adequate if cell viability was >40% and if one countable cytospin for estimation of differential cell count, with minimal squamous contamination (<50%) and pulmonary macrophages present, was produced.^{17,18}

Based on data from previous studies, sputum samples were defined as either eosinophilic (eosinophils $\geq 2.5\%$) or non-eosinophilic (eosinophils <2.5%).^{19,20}

Clinical Response to Systemic Corticosteroids

The response to treatment was assessed in a number of ways. A significant improvement in FEV₁ was defined as an increase of more than 9% of the predicted value.^{21,22} The number of symptom-free days in the last week before visit two was recorded and patients were also asked to say whether or not they felt "better" following the corticosteroid trial. A clinical response to the steroid course was defined as a significant improvement in FEV₁ and/or an overall subjective improvement.

Statistical Analysis

In view of the small numbers, non-parametric test were used. Between-group comparisons were made using the Mann-Whitney *U*-test. Paired data were compared using Wilcoxon matched-pairs testing. Proportions were compared using the chi-squared test with Yates correction. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 20 children and adolescents aged between 8 and 15 years with difficult asthma were studied. In three subjects adherence to the corticosteroid trial was considered unsatisfactory (undetectable prednisolone level with cortisol >100 nM). The clinical details of the remaining 17 subjects with satisfactory adherence are shown in Tables 1 and 2. Eight subjects received intramuscular triamcinolone and nine received prednisolone.

There were eight subjects in the "eosinophilic" group and nine in the "non-eosinophilic" group (Table 2). One subject in each group took short-acting bronchodilator within 1 hr of spirometry on visit one. These two subjects were therefore excluded from the analysis of lung function. Baseline FEV₁ was higher in the "non-eosinophilic" group, although this did not reach statistical

TABLE 1—Baseline Clinical Characteristics of Subjects With Difficult Asthma (n = 17)

Male/female	8/9
Age (years)	13 (8–15)
FEV ₁ (% predicted)	61 (40–79)
Post-bronchodilator FEV ₁ (%)	82 (48–100)
Positive response to bronchodilator (increase in FEV ₁ >9% predicted)	13 (out of 15) ¹
Atopic	14
Treatment	
Inhaled corticosteroids (mg/day)	
Budesonide (n = 4)	1.6 (0.4–2.0) ²
Fluticasone (n = 13)	1.0 (0.5–2.0) ³
Long-acting β_2 -agonist	15
Regular systemic corticosteroids	5
Other treatments	
Montelukast	10
Antihistamines	5
Theophylline	4
Nedocromil	2

Data are expressed as median (range) or as absolute numbers.

¹Two subjects took short-acting β_2 -agonist 1 hr before spirometry and were excluded from this analysis.

²One patient taking budesonide 0.4 mg/day and regular oral corticosteroids.

³One patient taking fluticasone 0.5 mg/day and regular oral corticosteroids.

significance. Five out of eight subjects in the "eosinophilic" group were prescribed regular systemic corticosteroids compared to none out of nine in the "non-eosinophilic" group (*P* < 0.05). There was no difference in the baseline neutrophil differential count between the groups.

Regardless of whether subjects received triamcinolone or prednisolone, clinical benefit was seen in all subjects following the corticosteroid trial, in terms of an increase in pre-bronchodilator FEV₁ and/or an overall subjective improvement. There was no difference in the clinical response between the two groups (Table 2). Five out of eight subjects in the "eosinophilic" group continued to have daily symptoms, compared to four out of nine in the "non-eosinophilic" group. Two out of eight "eosinophilic" and five out of nine "non-eosinophilic" subjects had symptoms on ≤ 2 of the last 7 days. The change in pre-bronchodilator FEV₁ following the corticosteroid trial is shown in Table 2 and Figure 1. Sputum eosinophils fell in the "eosinophilic" group (median 17.5 [range 3–37]% vs. 0 [0–23]%, *P* = 0.054), with no change in the "non-eosinophilic" group (0 [0–2]% vs. 0 [0–1]%, *P* = 0.12) (Fig. 2). There was no significant change in the sputum neutrophil percentage in either the "eosinophilic" (22.5 [5–50]% vs. 25 [0–91]%) or the "non-eosinophilic" group (27.5 [0–96]% vs. 44 [9–96]%) (Fig. 3).

Following the corticosteroid trial, 15 out of 17 subjects had a sputum eosinophil count $\leq 1\%$. Six of these 15 subjects continued to have a positive response to

TABLE 2—Clinical Characteristics of Patients With and Without Eosinophilic Inflammation

	Eosinophilic (n = 8)	Non-eosinophilic (n = 9)
Male/female	5/3	3/6
Age (years)	12.5 (8–14)	14 (11–15)
FEV ₁ (% predicted)	55 (40–68)	65 (42–79)
Post-bronchodilator FEV ₁	76 (56–100)	83 (48–90)
Atopic	6	8
Systemic corticosteroids	5	0*
Sputum neutrophils	22.5 (5–50)	27.5 (0–96)
Response to systemic corticosteroid trial		
Triamcinolone/prednisolone prescribed	5/3	3/6
Median increase in pre-bronchodilator FEV ₁ (% predicted) ¹	16 (5–54)	12.5 (1–29)
Number of subjects with an increase in pre-bronchodilator FEV ₁ >9% predicted	6	7
Number with daily symptoms	5	4
Number with symptoms on ≤2 of the last 7 days	2	5
Number with subjective improvement	6	7

Data are expressed as median (range) or as absolute numbers.

¹Two subjects (one in each group) took short-acting β₂-agonist 1 hr before spirometry and were excluded from this analysis.

*P < 0.05.

bronchodilator (increase in FEV₁ >9% predicted) after the corticosteroid trial.

DISCUSSION

In this small subgroup of children and adolescents with difficult asthma, able to produce paired sputum samples,

treatment with high-dose systemic corticosteroids resulted in clinical improvement in at least some parameters in all subjects, regardless of whether or not sputum eosinophilia was present before treatment. This is the first report involving longitudinal data to investigate whether the inflammatory cell profile in induced sputum is helpful in predicting the response to aggressive treatment with high-dose systemic corticosteroids in this group of patients.

The study has a number of limitations. The subjects studied are a highly selected group, namely those with very severe asthma, who were able to produce sputum on two occasions. We tried to rule out poor compliance as a cause for the severity of their asthma by checking dispensed prescriptions and raising the issue of adherence with the children in a non-threatening manner. We

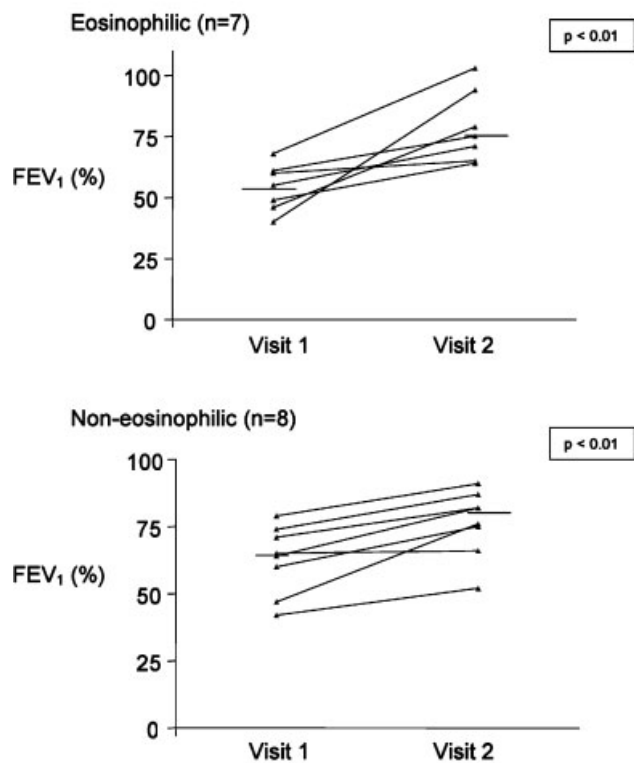


Fig. 1. Change in pre-bronchodilator FEV₁ in the eosinophilic and non-eosinophilic groups following the corticosteroid trial.

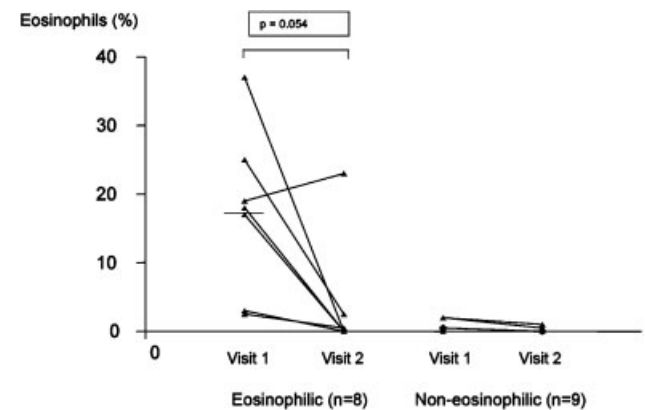


Fig. 2. Change in sputum eosinophils following the corticosteroid trial.

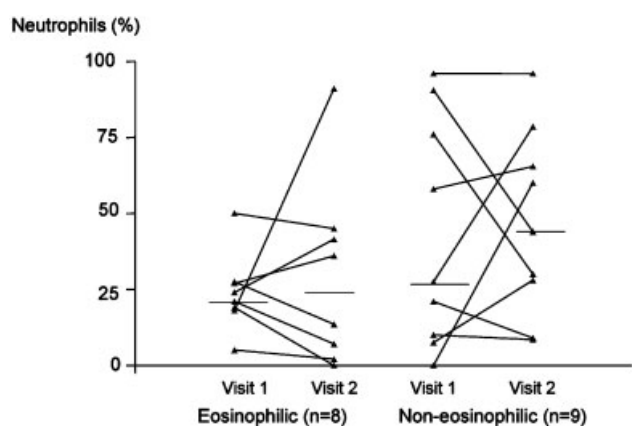


Fig. 3. Change in sputum neutrophils following the corticosteroid trial.

acknowledge that this is not definitive, but in clinical practice, non-adherence is extremely difficult to exclude. The number of patients is small, but it would be exceedingly difficult to obtain larger numbers of children for this sort of study, because many patients with difficult asthma have either severe airway obstruction or bronchial hyperresponsiveness, which precludes sputum induction. We have assigned them a phenotype on the basis of a single sputum test, but, in common with other workers, we do not know whether this phenotypic assignment is stable over time. This clearly means that the results here should be considered as hypothesis generating, rather than definitive. Nonetheless, we believe they suggest important implications for pathophysiology and management.

Subjects were prescribed either prednisolone or triamcinolone. This reflects a change in our clinical protocol that occurred during the study period. Triamcinolone was introduced in preference to prednisolone in order to ensure adherence to treatment.²³ However, subjects who were prescribed oral prednisolone were only included in this study if adherence to treatment was considered satisfactory. We also chose to use two different concentrations of nebulized saline. This was done in order to maximize the opportunities for obtaining a sputum sample, given that a proportion of patients had post-bronchodilator FEV₁ <65% predicted, and is not unlike the practice employed by another center specializing in the management of adults with difficult asthma.²⁴ Another potential limitation of the study is the absence of any data derived from symptom scores or visual analog scales to assess the clinical response to the corticosteroid trial. We chose to use symptom-free days and the patients' overall subjective response to treatment, which reflects our usual clinical practice.

The current study is in agreement with the recent article by ten Brinke et al.⁴ in showing that the majority of subjects with sputum eosinophilia demonstrate a fall in eosinophils, accompanied by an improvement in clinical

and lung function criteria, following systemic corticosteroids. However, the current study adds to the findings of ten Brinke by showing that subjects without sputum eosinophilia also demonstrate a clinical improvement. Our results contradict the findings of Pavord et al.⁷, who have suggested that "non-eosinophilic" asthma is associated with a poorer response to systemic corticosteroids. Regarding treatment with inhaled steroids, Meijer et al.²⁵ and Green et al.⁶ found that sputum eosinophils were useful parameters for predicting steroid response, whereas in the study of Godon et al.²⁶ FEV₁ improved after 1 month of inhaled steroid treatment in all patients with mild steroid-naïve asthma irrespective of the presence of sputum eosinophilia. However, in contrast to these studies, it should be noted that we used very high doses of corticosteroids, such that we may have been well along the plateau of the dose-response curve, and we cannot exclude the possibility that "non-eosinophilic" asthma results in a right shift of the dose-response curve, but with the same plateau. Nonetheless, our data suggest that there may be limitations to the strategy of using sputum eosinophils to monitor asthma,⁵ in the very severest patients. We have reported elsewhere that there is poor agreement between sputum and endobronchial biopsy eosinophil count;²⁷ we speculate that possibly some of our children with absence of sputum eosinophils may have had airway wall eosinophilia as a cause for their ongoing symptoms.

The fact that the majority of subjects in the "eosinophilic" group were already prescribed regular systemic corticosteroids suggests that this group may have had more severe asthma than the non-eosinophilic group, with the presence of ongoing eosinophilia indicating a degree of corticosteroid insensitivity. Alternatively it might indicate suboptimal adherence to prescribed treatment. As in the study by ten Brinke et al.⁴ the reduction in sputum eosinophilia following further treatment with systemic corticosteroids demonstrates that eosinophilic inflammation can be suppressed in the majority of subjects, providing that they receive a sufficient dose of corticosteroids and that adherence is ensured. Treatment with systemic corticosteroids did not result in a consistent increase in sputum neutrophils, and we hypothesize that the high percentage of neutrophils seen in some patients with difficult asthma may not necessarily be a consequence of high-dose corticosteroid treatment. However, a study of this size can only be hypothesis generating, not definitive, and more data are needed to confirm or refute this.

CONCLUSION

The main purpose of this report is to attempt to provide information to assist clinicians treating children and adolescents with difficult asthma. In contrast to the

published studies from the adult literature, the data suggest that children and adolescents may still benefit clinically from treatment with high-dose systemic corticosteroids even in the absence of sputum eosinophilia on a single "one-off" sputum sample prior to treatment. A trial of such treatment (preferably intramuscular triamcinolone) would therefore seem justified in all patients, particularly those in whom there are concerns over the degree of treatment adherence.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the European Respiratory Society (C.L.), Asthma UK (D.P.), and The Society of Paediatric Pneumology (German, Austrian, and Swiss) (A.Z).

REFERENCES

1. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3–22.
2. American Thoracic Society. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341–2351.
3. Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: Clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:594–601.
4. ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma: Effect of parenteral corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:601–605.
5. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavard ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715–1721.
6. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavard ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: Identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002;57:875–879.
7. Pavard ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999;353:2213–2214.
8. Jenkins HA, Cool C, Szeffler SJ, Covar R, Brugman S, Gelfand EW, Spahn JD. Histopathology of severe childhood asthma: A case series. *Chest* 2003;124:32–41.
9. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: An analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:94–100.
10. Payne DN, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, Jeffery PK. Airway inflammation in children with difficult asthma: Relationships with airflow limitation and persistent symptoms. *Thorax* 2004;59:862–869.
11. Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, Bush A. Sputum induction in children with difficult asthma: Safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:318–324.
12. Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, Szeffler SJ. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:575–582.
13. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225–244.
14. American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107–1136.
15. Payne D. Adrenal response to glucocorticoid treatment [letter]. *Lancet* 2000;355:1458.
16. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Lolovich J, Hargraeve FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308–317.
17. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J* 2002;37:S19–S23.
18. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, Clancy RL. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36–41.
19. Gibson PG, Grootendorst DC, Henry RL, Pin I, Rytala PH, Wark P, Wilson N, Djukanovic R. Sputum induction in children. *Eur Respir J* 2002;37:S44–S46.
20. Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998;11:848–853.
21. Waalkens HJ, Merkus PJ, van Essen-Zandvliet EE, Brand PL, Gerritsen J, Duiverman EJ, Kerrebijn KF, Knol KK, Quanjer PH. Assessment of bronchodilator response in children with asthma. Dutch CNSLD Study Group. *Eur Respir J* 1993;6:645–651.
22. Sly PD. Lung Function. In: Silverman M, editor. *Childhood asthma and other wheezing disorders*. London: Chapman and Hall Medical; 1995. pp 115–139.
23. Panicker JR, Kenia P, Silverman M, Grigg J. Intramuscular triamcinolone for difficult asthma. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:421–425.
24. ten Brinke A, de Lange C, Zwinderman AH, Rabe KF, Sterk PJ, Bel EH. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol: Predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749–753.
25. Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, Arends LR, Koeter GH, Kerstjens HA. Accuracy of eosinophils and eosinophilic cationic protein to predict steroid improvement in asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1096–1103.
26. Godon P, Boulet LP, Malo JL, Cartier A, Lemiere C. Assessment and evaluation of symptomatic steroid-naïve asthmatics without sputum eosinophilia and their response to inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 2002;20:1364–1369.
27. Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, Hansel TT, Payne DNR, Bush A. Airway eosinophilia in children with severe asthma: Predictive values of noninvasive tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1286–1291.

Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study

Christiane Lex^{1,2}, Angela Zacharasiewicz^{1,3}, Donald NR Payne¹, Nicola M Wilson¹, Andrew G Nicholson⁴, Sergei A Kharitonov⁵, Peter J Barnes⁵ and Andrew Bush*¹

Address: ¹Department of Paediatric Respiratory Medicine, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, UK, ²Department of Paediatric Cardiology and Pulmonology, Heinrich Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany, ³Department of Paediatric and Adolescent Medicine, Pulmonary and Infectious Diseases, Wilhelminenspital Vienna, Austria, ⁴Department of Histopathology, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, UK and ⁵Department of Thoracic Medicine, Imperial College of Science, Technology and Medicine at the Royal Brompton Hospital and National Heart and Lung Institute, London, UK

Email: Christiane Lex - lex@med.uni-duesseldorf.de; Angela Zacharasiewicz - angela.zacharasiewicz@wienkav.at; Donald NR Payne - Donald.Payne@health.wa.gov.au; Nicola M Wilson - n.wilson@rbht.nhs.uk; Andrew G Nicholson - a.nicholson@rbht.nhs.uk; Sergei A Kharitonov - s.kharitonov@ic.ac.uk; Peter J Barnes - p.j.barnes@ic.ac.uk; Andrew Bush* - a.bush@rbht.nhs.uk

* Corresponding author

Published: 07 April 2006

Received: 09 October 2005

Respiratory Research 2006, **7**:63 doi:10.1186/1465-9921-7-63

Accepted: 07 April 2006

This article is available from: <http://respiratory-research.com/content/7/1/63>

© 2006 Lex et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: It has been suggested that cysteinyl leukotrienes (cysLTs) play an important role in airway remodeling. Previous reports have indicated that cysLTs augment human airway smooth muscle cell proliferation. Recently, cysLTs have been measured in exhaled breath condensate (EBC). The aim of this study was to evaluate the relationship between cysLTs in EBC and another marker of airway remodeling, reticular basement membrane (RBM) thickening, in endobronchial biopsies in children.

Methods: 29 children, aged 4–15 years, with moderate to severe persistent asthma, who underwent bronchoscopy as part of their clinical assessment, were included. Subjects underwent spirometry and EBC collection for cysLTs analysis, followed by bronchoscopy and endobronchial biopsy within 24 hours.

Results: EBC cysLTs were significantly lower in asthmatic children who were treated with montelukast than in those who were not (median (interquartile range) 36.62 (22.60–101.05) versus 249.1 (74.21–526.36) pg/ml, $p = 0.004$). There was a significant relationship between EBC cysLTs and RBM thickness in the subgroup of children who were not treated with montelukast ($n = 13$, $r = 0.75$, $p = 0.003$).

Conclusion: EBC cysLTs appear to be associated with RBM thickening in asthma.

Background

Inflammation and remodeling are characteristics of the

asthmatic airway. Until recently, remodeling was considered to be caused by longstanding inflammation, but this

hypothesis has now begun to be questioned. Structural changes of remodeling have been found in childhood [1-3] and recently it has been shown that reticular basement membrane (RBM) thickening, a characteristic feature of remodeling, is present in children with difficult asthma to a similar extent to that seen in adults with asthma [3]. Studies in children are needed to explore the pathophysiology of airway remodeling in early life. However, bronchoscopy and endobronchial biopsy are not routine procedures in the management of childhood asthma. Therefore, non-invasive methods may help in studying airway remodeling in a similar way to those developed to investigate airway inflammation using exhaled nitric oxide, induced sputum or exhaled breath condensate (EBC).

Measurement of cysteinyl leukotrienes (cysLTs) in EBC could be one such potential non-invasive method of studying airway remodeling. CysLTs have been reported to play an important role in airway remodeling in asthma, with one study indicating that the cysLT₁-receptor antagonist montelukast reduces airway smooth muscle cell hyperplasia and subepithelial fibrosis in ovalbumin-sensitized and -challenged mice [4]. In addition, cysLTs can be detected in EBC, with elevated levels reported in adults and children with asthma [5,6].

We measured EBC cysLTs in a group of children with moderate to severe persistent asthma undergoing bronchoscopy. We investigated whether cysLTs in EBC are lower in those patients taking regular montelukast, in addition to inhaled corticosteroids. In view of a potential role of cysLTs in airway remodeling, we examined the relationship between cysLTs in EBC and RBM thickness in endobronchial biopsies.

Methods

Patients

We recruited 29 children with moderate to severe persistent asthma who underwent bronchoscopy including endobronchial biopsy as part of their clinical assessment. Asthma was diagnosed according to American Thoracic Society (ATS) guidelines [7]. Moderate to severe persistent asthma was characterised by "daily symptoms despite >400 µg of inhaled budesonide (or equivalent)" [8]. 21/29 asthmatic children received additional treatment with systemic corticosteroids before bronchoscopy; of these 14 patients have been included into our difficult asthma protocol receiving a corticosteroid trial with either 2 weeks of prednisolone 40 mg/day (n = 8) or a single intramuscular injection of triamcinolone 80 mg (n = 6) before bronchoscopy [9]. Two patients had been prescribed systemic steroids for worsening of symptoms in the previous 2 weeks and 6 patients were using a long-term maintenance therapy with prednisolone up to 20 mg/day (table 1).

Table 1: Patients' characteristics

Number	29
Age (years)	10.2 (4-15)
Male, n	16
Atopic*, n	21
Duration of symptoms (years)	10.0 (5.0-12.0)
FEV ₁ (% predicted)#	80 (64-91)
Treatment in previous 2 weeks	
Inhaled steroid dosage (budesonide equivalent) (µg/day)	2000 (1000-2000)
Budesonide, n	7
Fluticasone, n	22
Oral and/or i.m. steroids, n	21
Long acting bronchodilator	28
Theophylline, n	1
Montelukast, n	14

Age data are expressed as mean (range). Other data are expressed as median (interquartile range) or absolute numbers (n).

*No data in 3 asthmatic children, # no data in five children who did not cooperate or could not withhold short-acting bronchodilator for 4 hours

Study design

Subjects underwent spirometry and EBC collection, followed by bronchoscopy including endobronchial biopsy within 24 hours. Atopy was diagnosed if serum specific IgE (>0.34 kU/l) was raised or skin prick test was positive (wheal >2 mm larger than negative control) to at least one more antigen (*D. pteronyssinus*, cat, dog, grass pollen, *Aspergillus fumigatus*). Measurements of EBC and RBM thickness were done blind.

The study was approved by the Ethics Committee of the Royal Brompton and Harefield Hospital National Health Service Trust and written informed consent was obtained from all parents and children recruited into the study.

Spirometry

Spirometry (Compact Vitalograph, Vitalograph Ltd, Buckingham, UK) was performed at baseline according to ATS guidelines [10]. Patients were asked to withhold short-acting bronchodilator for 4 hours prior to spirometry, if possible.

Exhaled breath condensate

We collected EBC using a commercially available condenser (EcoScreen, Jaeger, Würzburg, Germany) according to the current ATS/ERS guidelines, as previously described [11,12]. Samples were immediately stored at -80°C. CysLTs (LTC₄, LTD₄ and LTE₄) concentrations were analysed by a specific enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The lower limit for detection was 11.0 pg/ml and the upper limit was 700 pg/ml.

Fiberoptic bronchoscopy and sample processing

Bronchoscopy with endobronchial biopsy was performed under general anesthesia as previously described [13].

Biopsies were taken from the subcarinae of the right lower lobe and processed into paraffin blocks. 5 µm sections were cut and stained with haematoxylin and eosin. Using light microscopy at × 400 magnification, coded sections were assessed for RBM thickness by a single observer (C.L.) using computer-aided image (NIH image 1.55, Maryland, US) as previously described [14]. 40 measurements were done at 20 µm intervals, RBM thickness was expressed as the geometric mean of the 40 measurements.

Statistical analyses

All analyses were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS). Comparison between groups was made using the Fisher's exact test and Mann Whitney U test as appropriate. Correlations were measured using Spearman rank correlation. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Details of the subjects are shown in table 1. CysLTs in EBC were detectable in 24/29 asthmatic patients. Five subjects had values outside the limits of detection (3 were above, 2 below) and could therefore not be included into statistical analysis.

Suitable biopsies for the assessment of RBM thickness were obtained from 27 children. The median (interquartile range (IQR)) value was 8.78 (7.76–10.42) µm. There was no significant relationship between the inhaled steroid dose and RBM thickness ($r = -0.25$, $p = 0.21$) and there was no difference in RBM thickness whether patients received systemic steroids or not ($p = 0.48$).

Analysis of asthmatic subgroups

Ten of 24 subjects from whom we obtained EBC values were taking montelukast (5–10 mg daily according to the patients' age). There was no significant difference in age, atopic status, inhaled steroid dosage, FEV₁ or treatment with systemic steroids between patients who were and were not prescribed montelukast. CysLTs in EBC were significantly lower in asthmatic children treated with montelukast than in those who were not (median (IQR) 36.62 (22.60–101.05) vs. 249.1 (74.21–526.36) pg/ml, $p = 0.004$, figure 1). RBM thickness did not differ significantly between the two groups ($p = 0.923$, figure 2).

Relationship between cysLTs in EBC and RBM thickness in endobronchial biopsies

Both suitable biopsies and measurable cysLTs levels in EBC were obtained in 22 children. There was a trend only for a significant relationship between cysLTs levels in EBC and RBM thickness measured in endobronchial biopsies in the group as a whole ($r = 0.37$, $p = 0.09$) (figure 3). However, there was a significant relationship between these two markers in a subgroup of children who were not

additionally treated with montelukast ($n = 13$, $r = 0.75$, $p = 0.003$) (figure 3).

Discussion

We have shown that exhaled cysLTs are detectable in children with moderate to persistent asthma with significantly lower concentrations in children who were additionally treated with montelukast compared to children who were not treated with montelukast. The principal finding of this study is that cysLTs in EBC correlated significantly with RBM thickness measured in endobronchial biopsies in a subgroup of asthmatic children who were not treated with montelukast. At the present time, we are not aware of any other study which has addressed these questions.

Csoma et al. have reported that cysLTs were detectable in all 13 children with moderate to severe persistent asthma who were included in their study, but no influence of montelukast was investigated since this drug was not given to any of the patients [6]. In our study, we have shown for the first time that the median exhaled cysLTs concentration was significantly lower in children who were treated with montelukast than in children who were not. In keeping with this Volovitz et al. have shown that montelukast treatment was associated with lower levels of cysLTs measured in nasal lavage of asthmatic children [15]. In an adult study Biernacki et al. found that exhaled cysLTs were significantly reduced after 4 weeks of treatment with montelukast [16]. Possible reasons for this are not clear, since this drug inhibits cys-LT₁ receptors which should not affect the synthesis of cysLTs. However, recent evidence suggests that montelukast may have an inhibitory effect on cysLTs synthesis through an inhibitory effect on 5'-lipoxygenase, an essential enzyme in the biosynthesis of leukotrienes in addition to its antagonism of its receptors [17].

Several studies have indicated that cysLTs play a role in the pathophysiology of remodeling [18]. *In vitro* studies have shown that LTD₄ augments epidermal growth factor-induced human airway smooth muscle proliferation [19] and that LTC₄ upregulates collagenase expression and synthesis in human lung fibroblasts [20]. Furthermore animal models have shown that an increase in airway smooth muscle cells observed in allergen-treated Brown Norway rats was reduced by cysLT₁ receptor antagonism [21]. In a recent mouse model Henderson et al. found that montelukast reduces airway smooth muscle cell hyperplasia and subepithelial fibrosis in ovalbumin-sensitized and -challenged mice [4]. In an open follow up study of seven asthmatic children low density areas at high resolution computerized tomography disappeared in six patients four years after additional treatment with montelukast suggesting that subepithelial fibrosis and air trapping may

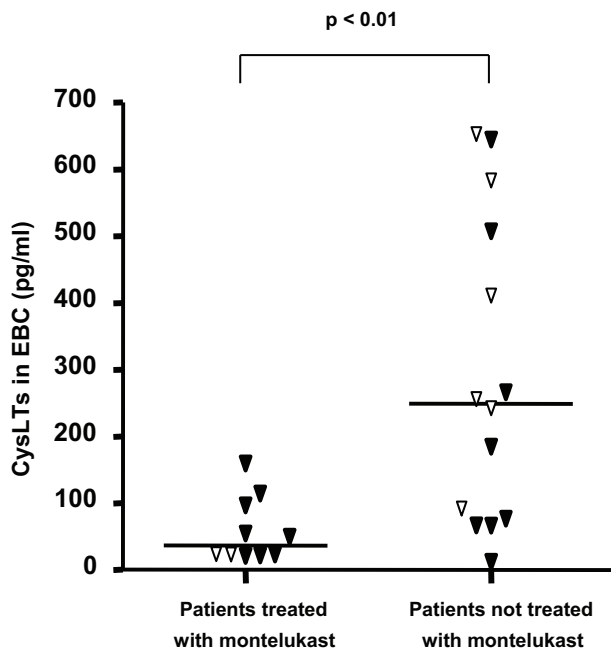


Figure 1

Relationship of exhaled cysteinyl leukotrienes (cysLTs) levels to montelukast therapy. Open symbols indicate patients without systemic steroids. Levels were significantly lower in asthmatic children treated with montelukast than in those who were not (36.62 (22.6–101.05) vs. 249.1 (74.21–526.36) pg/ml, $p = 0.004$).

have been reduced by leukotrienes receptor antagonist treatment [22]. However, to our knowledge there are no human biopsy studies published so far supporting the role of cysLTs in airway remodeling.

In this study we have shown for the first time a possible relationship between cysLTs in EBC and an important feature of airway remodeling, namely RBM thickening, in asthmatic children. However, a significant correlation between cysLTs and RBM thickness was only present in subjects who were not treated with montelukast. This might be explained by the effects of montelukast on the cysLTs production, discussed above. The fact that treatment may perturb a relationship such as the one between cysLTs and RBM thickening is unsurprising. For example, the association between exhaled nitric oxide and eosinophilic airway inflammation measured directly is strongest in subjects not treated with anti-inflammatory treatment, or in asthmatics who are relatively insensitive to the effects of corticosteroids [9,23].

In order to study the relationship between cysLTs and RBM thickness and the use of exhaled cysLTs as a marker

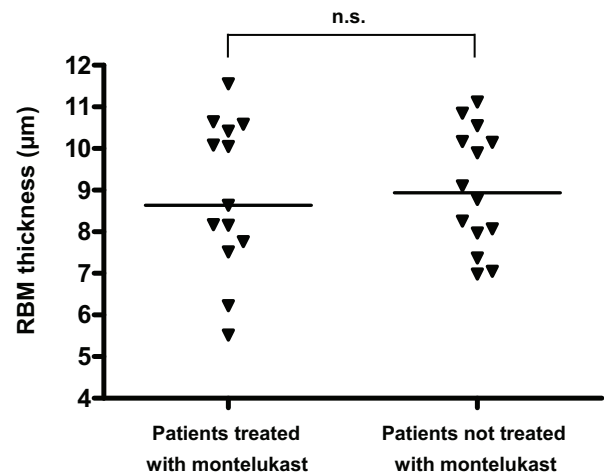


Figure 2

Relationship of reticular basement membrane (RBM) thickness to montelukast therapy. There was no significant difference between children treated with montelukast and those who were not.

of airway remodeling further biopsy studies should be planned. Measurement of exhaled cysLTs and RBM thickness before and after a treatment with montelukast would be useful. However, the design of any study requiring repeat performance of bronchoscopy and endobronchial biopsy in order to obtain longitudinal data would be problematic.

There are a number of limitations to the current study. Firstly, only a relatively small number of a highly selected group of patients, those who underwent bronchoscopy for clinical indications, were tested, so the conclusions cannot be generalised to all children with asthma. The study should be regarded as a pilot study, hypothesis-generating, rather than definitive. Studies involving a larger sample size would be useful, although the numbers of subjects undergoing bronchoscopy and biopsy are always likely to be limited. Secondly, most patients were treated with high doses of inhaled and/or systemic steroids. Therefore, it is possible that cysLTs values in EBC would have been altered by the treatment. However, the influence of corticosteroids on cysteinyl leukotrienes is controversial. Dworski et al. found that treatment with oral prednisolone, while reducing asthma symptoms, had no effect on LTE_4 concentration in bronchoalveolar lavage fluid [24]. Sebaldt et al. found that oral prednisolone had no effect on urinary LTE_4 levels [25]. In contrast Baraldi et al. reported that cysLTs in EBC were reduced after a course of oral steroids given for an asthma exacerbation [26]. However, whether cysLTs in EBC are reduced after a steroid trial independently of an asthma exacerbation could

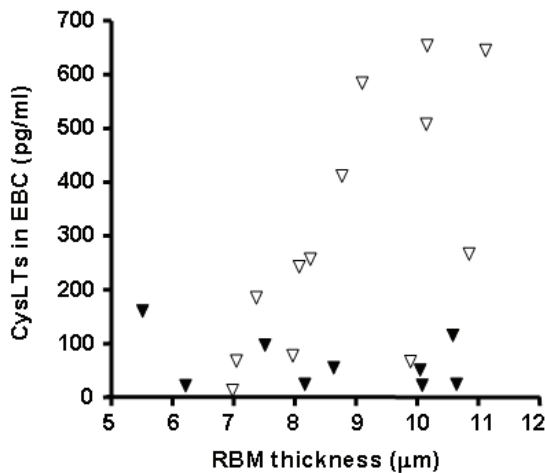


Figure 3
Relationship between exhaled cysteinyl leukotrienes (cysLTs) values and reticular basement membrane (RBM) thickness in endobronchial biopsies. Open symbols indicate patients without montelukast. There was a significant relationship between cysLTs levels in EBC and RBM thickness measured in endobronchial biopsies in the subgroup of patients who were not treated with montelukast ($r = 0.75$, $p = 0.003$).

not be studied. We acknowledge as well that prolonged high dose steroids may affect basement membrane thickness to a degree [27-29]. However, some studies do not support a role for corticosteroids in reducing airway remodeling [30,31]. However, again, the design of a study including patients who are not on steroids but undergo bronchoscopy would be problematic due to ethical considerations.

We acknowledge that our study is of cross-sectional observations, analysed by using coefficients of correlation. This limits the strength of the conclusions which can be drawn,

many respects. Correlation analyses cannot prove either the presence or the direction of causality; this can only be done by appropriately designed, longitudinal studies. Furthermore, as a general point, statistically significant results may not necessarily be clinically relevant. Also, associations which are significant for groups may not be sufficiently sensitive to be used as a clinical tool for decision making in individual patients.

Another weakness is that we were unable to obtain data on the variability of repeated measurements of cysLTs and RBM thickness over time, due to ethical constraints for RBM thickness in particular. We have previously reported within-subject variability for RBM thickness in biopsies [32].

The cysLTs values in EBC were in general higher in our study in comparison to other studies [26,33]. This might be explained by the highly selected nature of the patients in our study. However, it has been noted that comparisons of data obtained in different laboratories are currently difficult because of the lack of standardised procedure for validated analytic techniques [11]. EBC analysis seems to be more reliable for making comparisons between groups, rather than for determining absolute levels of mediators [33].

Conclusion

The goals of asthma therapy include prevention both of inflammation and structural airway wall changes. Whereas we have a number of non-invasive tools to measure inflammation (EBC, induced sputum, exhaled breath), non-invasive assessment monitoring of remodeling is much more difficult. This is the first study to investigate the relationship between cysLTs in EBC and one of the characteristic features of airway remodeling in asthma, RBM thickening. The data demonstrate an association between cysLTs and RBM thickening in those subjects not treated with montelukast. The use of measurements of cysLTs in EBC as a non-invasive marker of RBM thickening may be worth further investigation. If possible, future

Table 2: Corticosteroid therapy according to a treatment with montelukast

	Patients treated with Montelukast (n = 14)	Patients not treated with Montelukast (n = 15)
No systemic steroids	2	6
Prednisolone	7	9
• Maintenance therapy*	4	2
• 2 weeks course of prednisolone 40 mg/day	2	6
• Short course of prednisolone because of worsening of symptoms	1	1
Triamcinolone (one single i.m. injection)	5	1

* one child had triamcinolone and was on maintenance prednisolone therapy

and means that the study is hypothesis generating in studies should include a larger number of children not

treated with montelukast or systemic steroids. The design of such studies will require careful planning, in view of the ethical considerations. However, the validation of non-invasive methods of monitoring asthma in childhood will only be possible through the initial inclusion of invasive methods for comparison.

Competing interests

AB has received funding from MSD, the manufacturers of montelukast for the following: attending academic meetings (European Respiratory Society, American Thoracic Society); for giving invited lectures; and unrestricted educational grants. He has no current financial relationship with the company.

Authors' contributions

CL carried out the design of the study and the acquisition of data, performed the laboratory analysis, the quantification of the bronchial biopsies, the statistical analysis and interpretation of the data and drafted and revised the manuscript. AZ participated in the acquisition and analysis of data and the laboratory analysis. DNRP participated in the acquisition and analysis of the data and quantification of the bronchial biopsies and helped to draft the manuscript. NMW, AGN, SAK and PJB participated in the design and coordination of the study. AB conceived and coordinated the study, performed the bronchoscopies and obtained the endobronchial biopsies, and helped to interpret the data and to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was funded by the European Respiratory Society (CL), Asthma UK (DNRP) and The Society of Paediatric Pneumology (German, Austrian and Swiss) (AZ).

References

- Cutz E, Levison H, Cooper DM: **Ultrastructure of airways in children with asthma.** *Histopathology* 1978, **2**:407-421.
- Cokugras H, Akcakaya N, Seckin , Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F: **Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma.** *Thorax* 2001, **56**:25-29.
- Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK: **Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:78-82.
- Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY: **A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:108-116.
- Montuschi P, Barnes PJ: **Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2002, **109**:615-620.
- Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ: **Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**:1345-1349.
- Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1987, **136**:225-244.
- National Institutes of Health: **National Heart, Lung, and Blood Institute guidelines for the diagnosis and management of asthma.** NIH Publication No. 97-4051. Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1997.
- Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A: **Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**:1376-1381.
- Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **152**:1107-1136.
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, on behalf of the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate: **Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions.** *Eur Respir J* 2005, **26**:523-548.
- Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Li A, Kemp M, Donovan J, Hooper J, Kharitonov SA, Bush A: **Repeatability of sodium and chloride in exhaled breath condensates.** *Pediatr Pulmonol* 2004, **37**:273-275.
- Payne D, McKenzie SA, Stacey S, Misra D, Haxby E, Bush A: **Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma.** *Arch Dis Child* 2001, **84**:423-426.
- Sullivan P, Stephens D, Ansari T, Costello J, Jeffery PK: **Variation in the measurements of basement membrane thickness and inflammatory cell number in bronchial biopsies.** *Eur Respir J* 1998, **12**:811-815.
- Volovitz B, Tabachnik E, Nussinovitch M, Shtaf B, Blau H, Gil-Ad I, Weizman A, Varsano I: **Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, reduces the concentration of leukotrienes in the respiratory tract of children with persistent asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 1999, **104**:1162-1167.
- Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, Barnes PJ: **Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients.** *Chest* 2005, **128**:1958-1963.
- Ramires R, Caiaffa MF, Tursi A, Haeggstrom JZ, Macchia L: **Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **324**:815-821.
- Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR Jr: **Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling.** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**:S18-S34.
- Panettieri RA, Tan EM, Ciocca V, Luttmann MA, Leonard TB, Hay DW: **Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:453-461.
- Medina L, Perez-Ramos J, Ramirez R, Selman M, Pardo A: **Leukotriene C4 upregulates collagenase expression and synthesis in human lung fibroblasts.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1224**:168-174.
- Salmon M, Walsh DA, Koto H, Barnes PJ, Chung KF: **Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodelling.** *Eur Respir J* 1999, **14**:633-641.
- Pifferi M, Carameella D, Ragazzo V, de Marco E, Pietrobella A, Boner AL: **Montelukast and airway remodeling in children with chronic persistent asthma: an open study.** *Pediatr Allergy Immunol* 2004, **15**:472-473.
- Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL: **Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children.** *Eur Respir J* 1999, **13**:1386-1390.
- Dworski R, Fitzgerald GA, Oates JA, Sheller JR: **Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:953-959.
- Sebaldt RJ, Sheller JR, Oates JA, Roberts LJ 2nd, FitzGerald GA: **Inhibition of eicosanoid biosynthesis by glucocorticoids in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:6974-6978.
- Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, Piacentini G, Zacchello F, Zanconato S: **Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations.** *Thorax* 2003, **58**:505-509.
- Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J: **Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 1999, **104**:356-363.
- Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JH, Vandenbroucke JP, Sterk PJ: **Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an addi-**

- tional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**:1043-1051.
29. Miller M, Cho JY, McElwain K, McElwain S, Shim JY, Manni M, Baek JS, Broide DH: **Corticosteroids prevent myofibroblast accumulation and airway remodeling in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **290**:L162-169.
 30. Boulet LP, Turcotte H, Laviolette M, Naud F, Bernier MC, Martel S, Chakir J: **Airway hyperresponsiveness, inflammation, and sub-epithelial collagen deposition in recently diagnosed versus long-standing mild asthma. Influence of inhaled corticosteroids.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:1308-1313.
 31. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q: **Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression.** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**:1293-1298.
 32. Payne DN, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, Jeffery PK: **Airway inflammation in children with difficult asthma: relationships with persistent symptoms and airflow limitation.** *Thorax* 2004, **59**:862-869.
 33. Mondino C, Ciabattini G, Koch P, Pistelli R, Trove A, Barnes PJ, Montuschi P: **Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children.** *J Allergy Clin Immunol* 2004, **114**:761-767.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

