

Üç-Altı Yaş Arası Çocuklarda Astım Fenotipleri ile Bronşiyal Hiperreaktivite İlişkisi

The Relationship Between Bronchial Hyperreactivity and Asthma Phenotypes in Children Between 3-6 Years Old

• Aysel ÜNLÜSOY AKSU¹, • İpek TÜRKTAŞ², • Arzu BAKIRTAŞ², • Mehmet Sadık DEMİRSOY²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye



ÖZ

Amaç: Okul öncesi yaş grubunda, tekrarlayan vizing atakları olan çocukların büyük bir kısmı astımdır. Bu çocukların bir kısmında da vizing atakları geçicidir. Bu çocuklar arasında, pratikte klinik ve laboratuvar bulgularına dayanarak ayırım yapmak kolay olmamaktadır. Çalışmada; 3-6 yaş arası, tekrarlayan vizing atakları olan çocuklarda, hava yolu duyarlılığı farklarını araştırarak, fenotipler arasında ayırıcı tanıya yardımcı olabilecek bir parametre bulmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji ve Astım Bölümü'nde, tekrarlayan hışıltı atakları nedeniyle izlenen hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Epizodik (viral) vizingli ve persistan vizingli hastalar olarak iki grup oluşturulmuştur. Her iki gruba metakolin ve adenozin 5'-monofosfat (AMP) ile bronş provokasyon testleri uygulanmıştır.

Bulgular: Yetmiş dört hastanın % 36.5'i (n=27) epizodik vizingli, %63.5'i (n=47) persistan vizingli çocuklardır. Bronş provokasyon testlerine bronkokonstriksiyon yanıtı alınan çocukların sayısı; persistan vizing grubunda, epizodik viral vizing grubuna göre daha fazla bulunmuştur (p<0.001). Transkutan oksijen basıncında %15'lik azalmaya yol açan (PC₁₅PtcO₂) metakolin dozunun persistan vizingli çocuklarda, epizodik viral vizingli çocuklara göre daha düşük olması; hava yolu duyarlılığının persistan vizingli çocuklarda daha şiddetli olduğunu göstermiştir. Ancak PC₁₅PtcO₂ AMP dozu açısından 2 grup arasında fark saptanmamıştır. Her 2 grup için de, PC₁₅PtcO₂ metakolin ve PC₁₅PtcO₂ AMP arasında ilişki bulunmamıştır. Epizodik ve persistan vizingli çocukların ayırımı için PC₁₅PtcO₂ sınır değer, ROC eğrisi kullanılarak, metakolin için %87.2 duyarlılık, %55 seçicilik ile 0.24 mg/ml bulunmuştur. Pozitif olabilirlik oranı (positive LR) 1.94; negatif olabilirlik oranı (negative LR) ise 0.23 bulunmuştur. Adenozin 5'-monofosfat için hesaplanan eğri altında kalan alan anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: Direkt (metakolin) ve indirekt (AMP) bronş provokasyon testleri; klinik pratikte okul öncesi yaş grubunda, astım fenotipine uyan ve uymayan çocukları belirlemede yeterli değildir.

Anahtar Sözcükler: Adenozin 5'-monofosfat, Astım, Bronşiyal hiperreaktivite, Metakolin, Vizing fenotipleri

ABSTRACT

Objective: Most of the preschool-age children who have recurrent wheezing episodes are asthmatic and some of them are episodic wheezers. It is not easy to distinguish the asthmatic children among the wheezers based on clinical and laboratory findings. We aimed to differentiate the asthma phenotypes by investigating airway hyperreactivity differences in children between 3-6 years old.

Material and Methods: Children who were followed up for recurrent wheezing at the department of Pediatric Allergy and Asthma were included in the study. They were classified as episodic (viral) wheezers and persistent wheezers. Bronchial provocation tests with methacholine and adenosine 5'-monophosphate were performed in both groups.

Results: Among the 74 patients, 36.5% (n=27) of the children were episodic and 63.5% (n=47) of the children were persistent wheezers. The number of bronchoconstriction responders to bronchial provocation tests was higher in the persistent wheezers than in the episodic viral wheezers (p<0.001). The methacholine dose that caused a 15% decrease in transcutaneous oxygen pressure (PC₁₅PtcO₂) was lower in the persistent wheezers than in the episodic wheezers. The degree of airway hyperresponsiveness was therefore more severe in the persistent wheezers. However, there was no difference between the two groups in terms of the dose of PC₁₅PtcO₂ AMP. There was no correlation between the PC₁₅PtcO₂ methacholine and PC₁₅PtcO₂ AMP in either group. The optimal cut-off to discriminate the episodic and

persistent wheezers was 0.24 mg/ml for PC₁₅PtcO₂ methacholine by ROC curves, with a sensitivity of 87.2% and a specificity of 55%. The positive likelihood ratio (LR) of PC₁₅PtcO₂ methacholine was 1.94, and the negative LR was 0.23. The area under the curve was found to be insignificant for adenosine 5'-monophosphate.

Conclusion: Neither direct (methacholine) nor indirect (AMP) challenge tests are capable of discriminating asthma phenotypes in preschool-age children.

Key Words: Adenosine 5'- monophosphate, Asthma, Bronchial hyperreactivity, Methacholine, Wheezing phenotypes

GİRİŞ

Çocukluk astımı genellikle 5 yaşından önce viral üst solunum yolu infeksiyonları sırasında ortaya çıkan bir bronşiolit atağı ile başlar (1). Astım için genetik yatkınlığı olan çocuklarda, bu durum her viral infeksiyon sırasında tekrarlamaya başlar (1). İlk bronşiolit atağı ile gelen hastalarda dikkatli bir öykü ve muayene ile risk faktörleri gözden geçirilip, astım olasılığı değerlendirilir. Pratikte, astım tanısı koyduracak kesin bir kriter yoktur. Halbuki uzun takipli kohort çalışmalar bu yaşta risk faktörleri, prognoz ve tedavisi farklı en az 2 fenotip olduğunu ortaya koymuştur (1-3). Ancak bu ayırım; hastaları doğumdan itibaren uzun süre izleyip, en az 7 yaşına geldiklerinde geriye doğru yapılan epidemiyolojik bir değerlendirmeye mümkün olabilmektedir (3). Bunun nedeni başlangıçta fenotipler arasında benzerlikler ve zaman içinde birbirine geçişler olmasıdır (3). Günümüzde, tekrarlayan vizing atakları olan küçük çocuklar arasında, astım fenotipinde olanları ayırmakta kullanabileceğimiz basit bir klinik gösterge ya da test yoktur. Her ne kadar akut vizing ataklarının tedavisi farklı değilse de, uzun süreli profilaktik tedavinin sadece gerçek astımlı hastalara uygulanması önerilmektedir (1,3). Bu nedenle, gerçek astımlı küçük çocukları ayırmaya çalışmak, tedaviyi planlamak ve prognozu öngörmek açısından gereklidir.

Geçici (viral) vizing fenotipi olan hastalar hemen her viral solunum yolu infeksiyonu sırasında atak geçirirlerse de ara dönemlerde tamamen iyidirler. Üç-dört yaşından sonra solunum yolları gelişip büyüdükçe; viral infeksiyonları artık atak gelişmeden, üst solunum yolu infeksiyonu şeklinde geçirmeye başlarlar (2,3). Bu fenotip altında toplanan çocukların atopik bünyeli olmadığı ve solunum yollarında eozinofilik inflamasyon bulunmadığı anlaşılmıştır (4). Persistan vizing (infantil astım) fenotipindeki hastaların solunum fonksiyonları doğumda normal ya da normale yakındır (2). Kohort çalışmalar, eozinofilik inflamasyon ve bronşiyal hiperreaktivite ile ilişkili klasik astım tablosunun ilk 5 yaşta başladığını göstermiştir (1,2,4). Yakınmaları sadece viral enfeksiyonlar sırasında ortaya çıkan "epizodik (viral) vizing" fenotipindeki çocukların aksine, atak aralarında da koku, toz, duman, efor gibi tetikleyicilerle yakınmaları olan persistan astım fenotipine uyan hastalar "çoklu-tetikleyicilerle giden astım" olarak da tanımlanırlar (1,3). Böyle hastalara, çok hafif şiddette bile olsa atopik dermatit (egzema) genellikle eşlik edebilir (1). Atopi saptamak infantil dönemde çok kolay olmasa da, bunun için total IgE düzeyi ya da RAST (radio allerge sorbent test) metodu ile spesifik IgE düzeyleri bakılabilir (1,2). Ailede astım veya alerjik rinit öyküsü olması, atak sırasında periferik kanda >%4 eozinofili saptanması astım fenotipi lehinedir (1,3).

İnfanat solunum fonksiyon testleri; akım-volüm eğrileri aracılığıyla solunum yolu obstrüksiyonunun lokalizasyonunu saptamada ve bronkodilatatör yanıtını araştırmakta yardımcıdır (2,5). Ancak pahalı aletler gerektirmesi, sedasyon altında yapılması, uzun zaman alması ve henüz standartların belirlenmemiş olması nedeniyle rutin pratikte kullanılmamaktadır.

Astım tanısı ile eşanlamlı olmasa da, bronşiyal hiperreaktivite (BHR) her yaştaki semptomatik astımlı hastada bulunduğundan, astımın en karakteristik ve en önemli tanısız özelliklerinden biri olarak kabul edilir (1,6). Çalışmalar BHR'nin astım prognozunu belirlediğini, hatta astım gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (6,7). Buna rağmen; kistik fibrozis, bronşektazi, bronkopulmoner displazi gibi birçok kronik akciğer hastalığında ve alerjik rinitte de bronş duyarlılığı artmıştır (1). BHR'nin genetik bir temeli olduğu kesinlik kazanmasına rağmen, bunun doğumsal ya da kazanılan bir özellik olup olmadığı halen tartışılmaktadır (6). Bazı araştırmalarda ilk vizing atağından önce BHR saptanan bebeklerde ileride astım gelişme riskinin daha yüksek olduğu görülürken; başka çalışmalarda da en az iki vizing atağı geçiren bebeklerde BHR geliştiği saptanmıştır (6,7). Çocuklarda BHR gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biri de atopik bünyedir (6). Buna rağmen, her atopik insanda BHR yoktur ya da her BHR'li kişinin atopik bünyeli olmadığı bilinmektedir (6). Günümüzde BHR'nin nedeni ve atopi ile arasındaki ilişki kesin olarak aydınlatılamamıştır. Astımın bir başka temel özelliği olan solunum yolu inflamasyonunun da BHR gelişiminden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (6). Ancak yapılan araştırmalar inflamasyonun BHR için mutlaka gerekli ve yeterli bir özellik olmadığını göstermiştir (8). Bu nedenle, BHR gelişimi için hedef organ yanıtında da değişme olması gerektiği düşünülmektedir. Bu hipoteze göre, kronik inflamasyon bir uyarıcı olarak bronş duvarlarında "remodeling" olarak adlandırılan kronik yapısal değişikliklerin ortaya çıkması için anahtar rol oynamaktadır (8). "Remodeling" ortaya çıktıkça, özellikle bronş düz kas kütlesi arttıkça kas kontraktilesinde de değişiklikler başlamakta, bu durum hedef organ yanıtını değiştirip, solunum yollarını akut uyarıcılara karşı aşırı yanıt veren bir hale getirmektedir (8).

Bronşiyal hiperreaktivite tanısında kullanılan bronş provokasyon testlerinde metakolin, histamin, adenozin, hipotonik ya da hipertonic aerosoller gibi farmakolojik agonistler; egzersiz, soğuk ve kuru hava gibi fiziksel uyarıcılar kullanılmaktadır (9). Bu testlerin her biri "non-spesifik hiperreaktivite" yi gösterir. Kişinin ev tozu akarı, polen gibi duyarlı olduğu herhangi bir alerjen ve meslekle ilgili duyarlığa neden olan ajanların inhalasyonu ile yapılan testlerde de "spesifik hiperreaktivite" saptanmaktadır (1).

Provokasyon testlerinde kullanılacak uyanarlardan bazıları (metakolin, histamin, prostoglandinler, lökotrienler), bronş düz kas hücrelerini hedef alarak burada bulunan reseptörleri uyarır ve bronşların doğrudan daralmasına yol açar (direkt yol) (9). Örneğin, metakolin; bronş düz kas hücrelerindeki muskarinik M3 reseptörleri üzerinden etki ederek, refleks yolla doğrudan bronkokonstriksiyonu uyarır (9). Metakolin ile normal insanlarda 8-16 mg/ml'ye kadar bronkospazm ortaya çıkmazken, BHR'li insanlarda her zaman 8 mg/ml altında bronkospazm başlar (9). Buna karşın, bazı uyanarlar (egzersiz, ökapnik soğuk ve kuru hava hiperventilasyonu, hipotonik ya da hipertonic serum fizyolojik inhalasyonu, AMP, propranolol, bradikinin, sülfür dioksit, metabisüfit, vb) bronş düz kaslarını dolaylı yoldan etkileyip bronkokonstriksiyona yol açar (indirekt yol) (9). Bu tür uyanarlar; inflamatuvar hücreler, nöronal hücreler ve bronş epitel hücreleri üzerinden proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olarak, solunum yolu düz kas hücrelerini etkiler (9). Metakolin testi özgüllüğü düşük olsa da, negatif bulunduğu astım tanısını dışlamada yararlı bir testtir (1,9). Buna karşın, indirekt yolla etki eden uyanarlarla yapılan provokasyon testleri; astım için hem daha özgül olmakta, hem de hastalığın şiddeti ile daha iyi korelasyon göstermektedir (9). Solunum yollarının inflamatuvar durumunu göstermede, indirekt uyarı testlerinin, direkt uyarı testlerinden daha iyi olduğu bildirilmektedir (10). Bu nedenle, bu indirekt testler astımın diğer kronik akciğer hastalıklarından ayrılmasında da yararlı olabilmektedir (10).

Altı yaşından küçük astımlı çocuklarda BHR, sedasyon ve ko-operasyon gerektirmeden kullanılan parsiyel transkutan oksijen basıncı (PtcO₂) ölçümü ile kolayca belirlenebilir (11). Küçük çocuklarda PtcO₂'de %15'lik azalmaya yol açan bronkokonstriktör uyanarın konsantrasyonu (PC₁₅PtcO₂), bronş aşırı duyarlılığının saptanmasında kullanılır (11). Büyük çocuklarda yapılan bronş provokasyon testlerinde olduğu gibi, burada da metakolin ve AMP uyanar olarak kullanılabilir (10).

Çalışmamızda; atopik bünyesi bulunmayıp, atakları intermittan seyirle tekrarlayan çocuklarla, persistan alerjik astım fenotipine uyan 3-6 yaş arası çocuklarda; metakolin ve AMP testleri ile hava yolu aşırı duyarlılığı farkları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji ve Astım Bölümü'nde; yaşları 34-72 ay arasında olup, tekrarlayan hisilti atağı nedeniyle izlenen çocuklar bu çalışmaya dahil edilmiştir. İlk taramada bronkopulmoner displazi, bronkomalazi, gastro-özafageal reflü ve kistik fibrozisli hastalar çalışmaya alınmamıştır. Ayrıca; prematür doğum, gebelikte annenin sigara kullanımı, mekanik ventilatör uygulanma öyküsü olan çocuklar da çalışmaya alınmamıştır. Tekrarlayan hisilti atakları dışında sağlıklı olan 87 hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastaların son 6 ayda en az 2 hisilti atağı geçirmiş olması ve akut atak tedavisine iyi yanıt veren hastalar olmasına dikkat edilmiştir. Hastaların total

IgE ve eozinofil düzeylerini karşılaştırmak için, benzer yaşta astım ve alerjik hastalığı olmayan 7 çocuk kontrol grubumuzu oluşturmuştur. Bu çocuklar, poliklinikten demir eksikliği anemisi nedeniyle kan tetkiki istenen hastalar arasından seçilmiştir.

Hastaların vizing fenotiplerinin belirlenmesi ve grupların oluşturulabilmesi için; bronş provokasyon testi öncesinde 87 hastanın aileleriyle görüşülerek ayrıntılı öykü alınmış ve bölümdeki takip dosyaları incelenmiştir. Bu dosyalar, ilk başvuruda ve her üç ayda bir yapılan kontrollerde ayrıntılı olarak alerji uzmanı ve yandal asistanı tarafından doldurulmuştur. Dosyalardan; atakların tekrar sıklığı, atak aralarındaki durum, fizik inceleme bulguları, eşlik eden başka hastalıklar ve deri testi sonuçları kaydedilmiştir. Bu incelemeler sonrasında; aile öyküsü ve dosya bilgileri uyumlu olmayan ya da tüm veriler ışığında fenotiplendirme yapılamayan 13 hasta, çalışma için uygun bulunmayarak değerlendirmeye alınmamıştır. Kalan 74 hasta çalışmaya dahil edilip; epizodik (viral) vizingli ve persistan vizingli hasta grubu olarak iki gruba ayrılmıştır.

Bronş Provokasyon Testleri

Metakolin (asetil-β-metilkolin klorid) ve adenozin 5'-monofosfat (AMP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Almanya) solüsyonları günlük olarak hazırlanıp; metakolin için 0.031–16 mg/ml; AMP için 0.39–400 mg/ml aralığında katlanan konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu solüsyonlar oda sıcaklığında 2 ml hacminde hazırlanarak, 0.13 ml/sn hızında çalışan bir kompresöre (Pulmo Aide kompresör, DeVilbiss, ABD) bağlanan nebülizatör (DeVilbiss 646 nebülizer, Somerset, PA, ABD) aracılığıyla aerosol olarak ayrı ayrı inhale ettirilmiştir. Okul öncesi yaş grubundaki çocuklar için önerilen bronş provokasyon testi protokolü kullanılmıştır (11). Bu protokole uygun olarak, hastalar test süresince transkutan oksijen monitörü (TCO₂M transkutan monitör, Novamatrix Tıp Sistemleri, Wallingford, ABD) ile izlenmişlerdir. Monitörün algılayıcısı; ısı 44°C'ye ayarlandıktan sonra, kullanım kitapçığında çocuklar için önerilen yer olan göğüs duvarı ön yüzüne yerleştirilmiştir. Parsiyel transkutan oksijen basıncı (PtcO₂) ölçümü, 20–30 dakika içinde sabit bir değere gelmiş ve bu bazal değer olarak kaydedilmiştir. Yüz maskesi aracılığı ile önce serum fizyolojik, ardından metakolin ya da AMP 2 dakikalık tidal solunum yöntemi ile inhale ettirilmiştir (12). Provokasyon solüsyonlarının dozları 5 dakika aralıklarla dört kat artırılarak, PtcO₂ değeri ilk ölçülen bazal değer %10'una düşene kadar nebülizasyon sürdürülmüştür. Takiben bronkokonstriktör uyanarın dozu ikişer kat artırılarak; PtcO₂ ilk ölçülen bazal değer %15'ine düşene kadar veya maksimum doza ulaşılan kadar teste devam edilmiştir. Her bir konsantrasyon basamağında, 3 dakika süreyle PtcO₂ değerleri takip edilerek en düşük bulunan değer kaydedilmiştir. Parsiyel transkutan oksijen basıncında bazal değer %15'i kadar düşme sağlayan konsantrasyon (PC₁₅PtcO₂) değeri logaritmik olarak standart formül üzerinden hesaplanmıştır (12). Test sırasında güvenlik için hastalar pulse-oksimetre (Nellcor Puritan Bennett, Inc. Pleasanton, CA, ABD) ile izlenmiş ve uyanarların her konsantrasyon basamağında akciğerler dinlenerek bulgular kaydedilmiştir.

Parsiyel transkutan oksijen basıncında bazal değerlerin %15'i kadar düşme sağlayan konsantrasyon ($PC_{15}PtcO_2$); metakolin düzeyi için <16 mg/ml olması hava yolu aşırı duyarlılığı açısından sınır değer olarak kabul edilmiştir (12). Ancak $PC_{15}PtcO_2$ AMP sınır değeri için standart bir öneri olmadığından, hem erişkin hem de çocuk hastalarda genel olarak kabul edilen sınır değer ≤ 200 mg/ml olduğundan; bizim çalışmamızda da $PC_{15}PtcO_2$ AMP için sınır değer olarak kabul edilmiştir (13).

Bronş provokasyon testinden 24 saat öncesine kadar, bronkodilatatör tedaviler kesilmiştir. Çalışmaya katılan çocukların en az 2 ay olmak üzere düzenli inhaler kortikosteroid, lökotrien reseptör antagonisti veya antihistaminik ilaçlar kullanmamış olmasına; en az 6 haftadır akut solunum yolu enfeksiyonu veya akut astım atağı geçirmemiş olmasına dikkat edilmiştir. Metakolin ve AMP uyarı testleri, aynı hastada 1 hafta içinde yapılmıştır. Önce metakolin uyarı testi yapılmış, aynı gün serum total IgE düzeyi ve eozinofil sayımı için kan alınmıştır. Daha sonra AMP uyarı testi yapılmıştır. Tüm testler sabah 08:30-10:30 arasında, hastalar oturur pozisyondayken yapılmıştır. Provokasyon işlemi süresince, çocuklara çizgi film izletilmiştir.

Deri Testi

Deri testleri prik (delme) test yöntemi ile hastaların sırtlarından yapılmıştır. Testte standardize alerjenler kullanılmıştır: [Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, çimen polenleri karışımı, yabancı ot polenleri karışımı, tahıl polenleri karışımı, ağaç polenleri karışımı, hamamböceği, Alternaria, Cladosporium, Aspergillus, kedi ve köpek epitelleri (Stallergens, Fransa)]. Histamin hidroklorid 10 mg/ml pozitif, allerjen sulandırıcı solüsyon da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontolden 3 mm daha büyük endurasyon çapı pozitif kabul edilmiştir. Bir veya daha fazla alerjene cevap veren çocuklar atopik bünyeli olarak tanımlanmıştır.

Serum Ig E ve kan eozinofil düzeyi ölçümleri:

Serum total IgE düzeyleri otomatik immünoassay (Beckman Coulter, Fullerton, CA, ABD) kullanılarak "chemiluminescence" yöntemiyle, IU/mL biriminde ölçülmüştür. Periferik kan eozinofil sayımı hematolojik otoanalizör ile yapılmıştır (Cell-Dyne 4000, Abbott).

Etik kurul onayı

Çalışmamıza Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 53 sayılı kararı ile onay alınmıştır.

İstatistiksel analiz

Verilerin analizi Windows SPSS v14.01 (lisans no:9869264) paket programı ile yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale uygun olup olmadığı "Shapiro Wilk testi" ile araştırılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; sürekli değişkenler için ortanca (minimum - maksimum) şeklinde, geometrik olarak artan değişkenler için geometrik ortalama (geometrik standart sapma) biçiminde gösterilmiştir.

Gruplar arasında AMP ve metakolin geometrik ortalamaları yönünden farkın önemliliği "Student's t testi" ile değerlendirilmiştir.

Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkın önemliliği; bağımsız grup sayısı iki olduğunda "Mann Whitney U testi" ile, ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise "Kruskal Wallis testi" ile değerlendirilmiştir. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farkın görülmesi halinde, çoklu karşılaştırma testi kullanılarak anlamlı farka neden olan gruplar belirlendi. Nominal değişkenler "Pearson'un Ki-Kare" veya "Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi" ile değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenler arasında anlamlı birlikteliğin olup olmadığı "Pearson'un Korelasyon testi" ile incelenmiştir.

Grupları ayırt etmede, AMP ve metakolin ölçümlerinin etkili olup olmadığı; ROC eğrisi altında kalan alan hesaplanarak değerlendirilmiştir. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması halinde, alternatif teste ilişkin en iyi kesim noktası "Youden İndeksi" kullanılarak saptanmıştır. Ayrıca; bu noktaya ilişkin duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif olabilirlik [positive-negative likelihood ratios (LR)] oranları hesaplanmıştır.

Sonuçlarda, $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya katılan hastaların % 36.5'i (n=27) epizodik vizingli, %63.5'i (n=47) persistan vizingli çocuklardır. Yaş ortalamaları 46 ay olan 7 çocuk da, total IgE ve eozinofil düzeylerini karşılaştırmak için kontrol grubu olarak seçilmiştir. Epizodik vizingli çocukların yaş ortalaması 53 ay, persistan vizingli çocukların yaş ortalaması 50 aydır. Gruplar arasında yaş ortalamalarına göre istatistiksel fark yoktur ($p=0.246$). Semptomların başlama yaşı epizodik vizingli hastalarda ortalama 11 ayken; persistan vizingli hastalarda daha geç, ortalama 18 aydır ($p=0.014$). Hastalık süresi epizodik vizingli hastalarda ortalama 36 ay; persistan vizingli hastalarda ortalama 27 ay olarak belirlenmiştir ($p=0.024$). Tüm hastalarda metakolin ve AMP bronş provokasyon testleri herhangi bir yan etki görülmeden tamamlanmıştır. Hastaların genel özellikleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Persistan vizingli çocukların %100'ünde, epizodik vizingli çocukların %74.1'inde metakolinin 16 mg/ml altındaki dozları ile bronkospazm oluşmuştur (Tablo II, Şekil 1A). İki grubun metakolin provokasyon testine yanıt veren hasta sayıları arasındaki bu fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Epizodik vizing grubundaki 7 çocukta (% 9.5), en yüksek metakolin dozunda (16 mg/ml) bile yanıt alınmamıştır.

Epizodik vizingli çocukların üçte ikisinden fazlası (%77.8); persistan vizingli çocukların da üçte birine yakını (%31.9) AMP provokasyonuna en yüksek dozda (400 mg/ml) bile yanıt vermemişlerdir (Tablo II, Şekil 1B). Adenozin 5'-monofosfat testine yanıt veren persistan vizingli hasta sayısı, epizodik vizingli hasta sayısından istatistiksel olarak daha fazladır ($p < 0.001$). Adenozin 5'-monofosfat ile bronkokonstriksiyon yanıtı oluşan hastaların hepsinde, aynı zamanda metakoline de yanıt alınmıştır.

Tüm hastalar göz önüne alındığında; metakolin provokasyon testi $PC_{15}PtcO_2$ değerinin geometrik ortalaması 0.5 mg/ml (0.04-9.19), AMP provokasyon testi $PC_{15}PtcO_2$ 'i de 14.25 mg/ml (0.59-342.89) olarak bulunmuştur. Metakolin testi ile ölçülen

havayolu duyarlılığı; persistan vizingli hastalarda, epizodik vizingli hastalara göre daha şiddetli bulunmuştur (sırasıyla 0.37 mg/ml, 1.08 mg/ml; $p=0.008$; Tablo II). Buna karşın, AMP testi ile ölçülen hava yolu duyarlılığı şiddeti gruplar arasında farklı bulunmamıştır ($p=0.474$, Tablo II).

Tablo I: Çalışma gruplarındaki çocukların genel özellikleri.

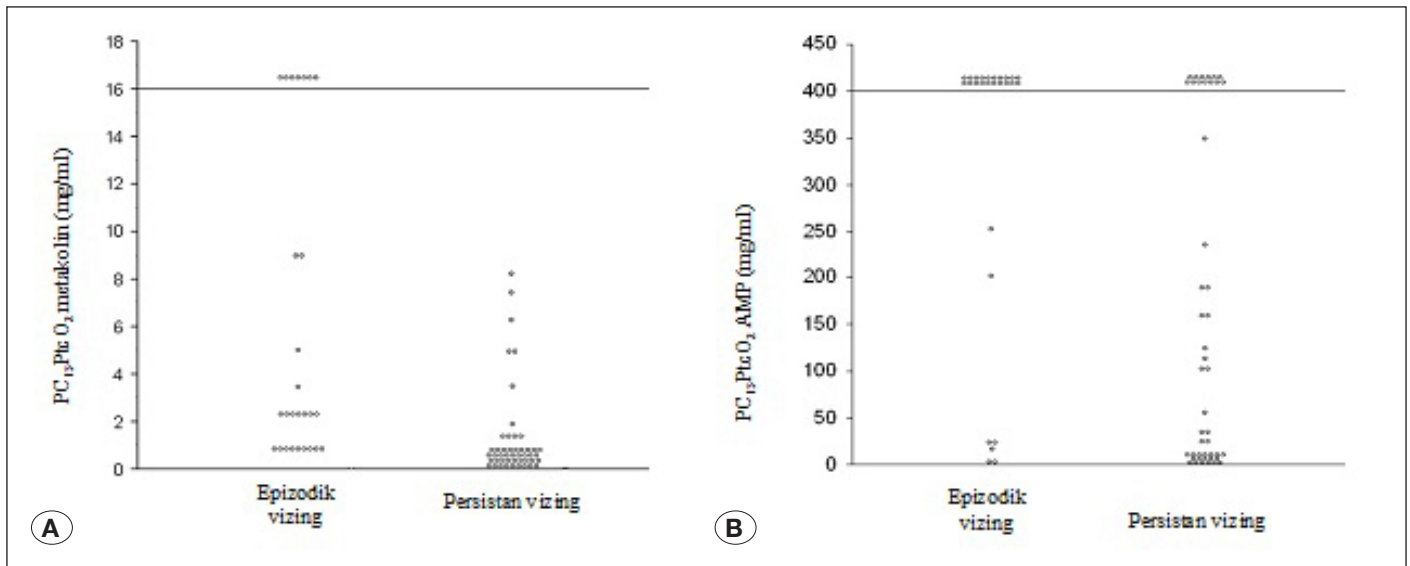
	Epizodik (viral) Vizing (n=27)	Persistan Vizing (n=47)	Kontrol Grubu (n=7)	p
Yaş, (ay)	53 (33-70)	50 (34-72)	46 (31-56)	0.246*
Erkek/Kız, (n)	18/9	27/20	6/1	0.278†
Doğum ağırlığı ortalamaları, (gr)	3280	3500	3200	0.334*
Semptomların başlama yaşı, (ay)	11 (2-48)	18 (3-54)	-	0.014‡
Hastalık süresi, (ay)	36 (10-60)	27 (2-64)	-	0.024‡
Ailede astım öyküsü, n (%)	2 (7.4)	10 (21.3)	-	0.191§
Deri testi pozitifliği, n (%)	0 (0)	25 (53.2)	-	<0.001†

*Kruskal Wallis testi, †Pearson'un Ki-Kare testi, ‡Mann Whitney U testi, §Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi.

Tablo II: Hastaların laboratuvar bulguları.

	Epizodik Vizing (n=27)	Persistan Vizing (n=47)	p
Metakolin testine yanıt, n (%)	20 (74.1)	47 (100)	<0.00*
$PC_{15}PtcO_2$ metakolin mg/ml geometrik ortalama (standart sapma)	1.08 (4.35)	0.37 (4.50)	0.008†
AMP testine yanıt, n (%)	6 (22.2)	32 (68.1)	<0.001‡
$PC_{15}PtcO_2$ AMP mg/ml geometrik ortalama (standart sapma)	24.38 (6.54)	12.76 (9.05)	0.474†
Ortalama total Ig E, (IU/mL)	46.4 (2.48-399)	42.6 (2.32-1548)	0.173§
Ortalama eozinofil sayısı, (mm ³)	172 (55-345)¶	279 (63-1130)¶,**	0.002§

*Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi, †Student's t testi, ‡Pearson'un Ki-Kare testi, §Kruskal Wallis testi, ¶Epizodik vizing ile persistan vizing grupları arasındaki fark anlamlı ($P=0,008$), **Persistan vizing ile kontrol grupları arasındaki fark anlamlı ($p<0,001$).



Şekil 1: A) Çalışma gruplarındaki $PC_{15}PtcO_2$ metakolin. **B)** Çalışma gruplarındaki $PC_{15}PtcO_2$ AMP.

Epizodik vizingli hastalarda, $PC_{15}PtcO_2$ AMP ve $PC_{15}PtcO_2$ metakolin düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır ($r=0,028$, $p=0,953$). Persistan vizingli hastalarda da, $PC_{15}PtcO_2$ AMP ve $PC_{15}PtcO_2$ metakolin düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır ($r=0,028$, $p=0,876$).

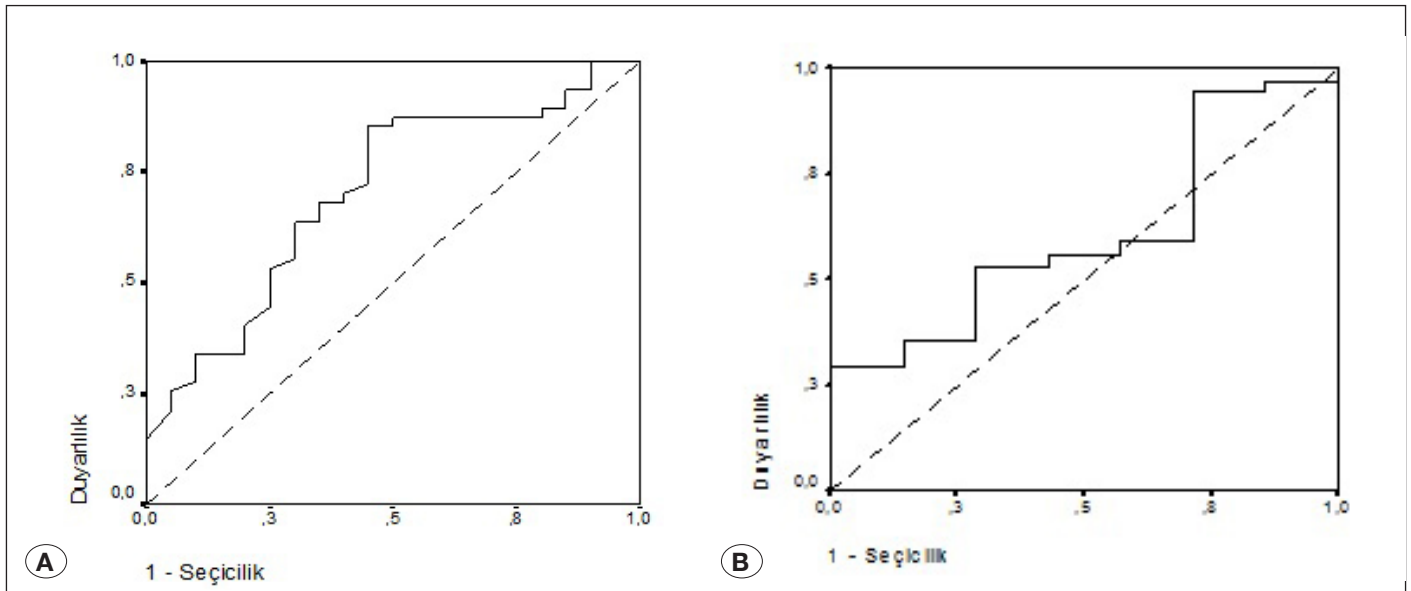
Metakolin için hesaplanan eğri altında kalan alan 0.70 olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.009$; %95 güven aralığı: 0.56–0.83). Adenozin 5'-monofosfat için hesaplanan eğri altında kalan alan 0.60 olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.386$; %95 güven aralığı: 0.39–0.81). Logaritmik olarak hesaplanan $PC_{15}PtcO_2$ metakolin ve $PC_{15}PtcO_2$ AMP için ROC eğrileri Şekil 2A, B'de gösterilmiştir. Eğriye göre en yüksek duyarlılık ve seçiciliğin olduğu sınır değer hesaplanmıştır. $PC_{15}PtcO_2$ metakolin için %87.2 duyarlılık, %55 seçicilik ile, en uygun sınır değer 0.24 mg/ml bulunmuştur. Pozitif olabirlik oranı (positive LR) 1.94, negatif olabirlik oranı (negative LR) ise 0.23'tür.

Persistan vizingli hastaların periferik kan ortalama eozinofil sayıları, epizodik vizingli hastalara göre yüksek olup; aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.008$). Aynı şekilde persistan vizingli hastaların periferik kan eozinofil sayıları, kontrol grubuna göre de yüksek olup; istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Epizodik vizingli hastalarda; eozinofil sayısı ile AMP uyarı testine hava yolu cevabı ($r=0.433$; $p=0.391$) ve ayrıca metakolin uyarı testine hava yolu cevabı ($r=0.061$; $p=0.83$) arasında ilişki saptanmamıştır. Aynı şekilde persistan vizingli hastalarda eozinofil sayısı ile AMP testine yanıt ($r=0.034$; $p=0.83$) ve metakolin testine yanıt ($r=0.157$; $p=0.347$) arasında önemli ilişki saptanmamıştır.

Persistan vizing, epizodik vizing ve kontrol grupları arasında ortalama serum total IgE düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($P=0.173$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda; astım fenotipine uyan hastalardan oluşan persistan vizingli gruptaki çocukların hepsinde metakolin ile yapılan provokasyon testinin pozitif olduğu görülmüştür. Bu, tüm grupta non-spesifik bronşiyal hiperreaktivite bulunduğunu göstermektedir. Aynı test, astımla ilişkili olmayıp, geçici vizing fenotipine uyan epizodik (viral) vizingli diğer gruptaki hastalarda da %74 gibi yüksek bir oranda pozitif çıkmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Castro-Rodriguez ve ark. (14) çalışmasında da atopisi olmayan 6 yaşından küçük çocuklarda transkutan O_2 metakolin ile ölçülen BHR prevalansı benzer bulunmuştur. Birçok çalışmada küçük çocuklarda metakoline yanıt oranının, daha büyük çocuklara ve erişkinlere göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (14). Yaşla BHR arasındaki bu ilişkinin öncelikle vücut kitlesine bağlı olabileceği düşünülmüştür (2). Bronş provokasyon testinde kullanılan metakolin gibi bir uyaran madde tüm hastalarda aynı doz ve katlarında kullanılmaktadır. Küçük çocuklarda dağılım kitlesi daha az olduğu için, bronkospazmın daha düşük provokatif dozlarda görülebileceği ileri sürülmektedir (2). Bir başka görüş, yaş ilerledikçe akciğerlerin büyümesi ve buna bağlı olarak solunum fonksiyonlarının artması sonucu bronş duyarlılığının azaldığını, bu nedenle küçüklerde daha yüksek oranda pozitiflik bulunduğunu ileri sürmektedir (15). Mochizuki ve ark. (16) da astımlı çocuklarda metakolin yanıtının yedi yaşına kadar arttığı, daha sonraki yaşlarda azaldığını göstermiştir. Ancak, bu sonuçların tam tersi başka araştırmalar da vardır. Palmer ve ark. (17) aynı hastaların 1 aylık ve 6 yaşındaki yanıtları arasında ilişki olmadığını saptamıştır. Bu araştırmacılar, hava yollarında hiperreaktiviteye neden olan faktörlerin her yaşta farklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. İki grubu oluşturan hastalarımız arasında yaş farkı olmadığı halde; epizodik (viral) vizingli grupta, normal yanıt alınan çocuklar olmuştur. Astım



Şekil 2: A) Epizodik vizing ile persistan vizing gruplarını ayırt etmede metakoline ait ROC eğrisi. **B)** Epizodik vizing ile persistan vizing gruplarını ayırt etmede AMP'ye ait ROC eğrisi.

fenotipindeki grupta bulunan tüm hastalar ise metakoline yanıt vermiştir. Bu da semptomatik her astımlı hastada BHR olduğu şeklindeki genel bilgiyi doğrulamaktadır. Hiç astım semptomu olmayıp, solunum yolu duyarlılığı bulunan hastaların (asemptomatik BHR) uzun süreli izleminde astım ortaya çıktığı bilinmektedir (6,7,12). Delacourt ve ark., (18) yaş ortalamaları 16 ay olan 83 astımlı çocuğu 9 yıl boyunca düzenli aralıklarla izlemişlerdir. Erken dönemde metakolinle saptadıkları bronş aşırı duyarlılığının, hastalarında ileri dönemde gelişen persistan astım ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir. Bir başka çalışmada da; BHR şiddeti ile $[FEV_1$ 'de (birinci saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm) bazal değere göre %20 düşmeye neden olan provokatif doz ($FEV_1 PC_{20}$)] solunum fonksiyon testleriyle ölçülen FEV_1 , FEV_1/FVC (birinci saniyedeki zorlu ekspiratuar volümün, zorlu vital kapasiteye oranı) ve FEF_{25-75} (zorlu ekspiratuar akım hızı) arasında doğru ilişki bulunmuştur (19).

Metakolin, doğrudan hava yolu düz kas hücreleri ve sinir uçlarını etkiler. Astımda mukozal inflamasyon ve epitel harabiyeti nedeniyle açığa çıkmış sinir uçları bulunması, artmış metakolin yanıtını açıklayabilir (20). Kronik süpüratif akciğer hastalıklarında da benzer solunum yolu inflamasyonu bulunduğu için metakolin testi pozitif bulunabilmektedir (6). Avital ve ark.'nın (21) çalışmasında; 6 yaşından büyük 51 astım, 21 kronik akciğer hastalığı olan ve 19 normal sağlıklı çocuğa metakolin testi yapılmıştır. Bu araştırmada; metakolin testi ile hem astım hem de kronik akciğer hastalığı olan çocukların, sağlıklı kontrollerden %82-92 duyarlılık ile ayrılabilirdiği görülmüştür. Buna rağmen; metakolin testi, astım ve kronik akciğer hastalıkları arasında ayırım yapılmasına yardımcı olmamıştır. Çalışmamızda metakolin testinde, ayırıcı sınır değer 0.24 mg/ml bulunmuş olup, duyarlılığı %87, özgüllüğü %55'tir. Pozitif olabilirlik oranı (positive LR) 1.94; negatif olabilirlik oranı (negative LR) 0.23'tür. Metakolin testinin, astımı diğer akciğer hastalıklarından ayırt ettirici gücünün düşük olması, astımlı küçük çocukları saptamak amacıyla kliniklerde kullanımının pratik olmayacağını göstermektedir.

Delacourt ve ark.; (22) en az 3 vizing atağı geçirmiş 2 yaşından küçük 129 çocuğa, transkutan oksijen basıncı yöntemiyle metakolin ile bronş provokasyon testi yapmışlardır. Bu çalışmacılar hastalarının semptom şiddeti ile, bronş yanıtlarının şiddeti arasında ilişki bulmamışlardır. Aynı hastaların 2 yıl sonraki değerlendirilmesinde %31'inin, 4 yıl sonraki değerlendirmede ise %20'sinin ataklarının devam ettiği görülmüştür. 18 ay sonra hastaların yaş ortalamaları 30 ay olduğunda tekrarlanan metakolin bronş provokasyon testinde vizingi devam edenleri, düzelenlerden ayırmada bu testin önemi olup olmadığını araştırmak için ROC analizi yaptıklarında; metakolin testi için sınır değer %69 duyarlılık, %59 özgüllük ile 2.3 mg/ml bulunmuştur (22). Büyük çocuk ve erişkinlerde yapılan çalışmalarda da, metakolin testinin persistan astım için duyarlı, fakat özgül bir test olmadığı görülmüştür (9).

Okul öncesi yaş grubunda, sadece kronik öksürükle giden öksürük varyant astım ve klasik astımlı hastaların metakolin ve AMP hava yolu yanıtları karşılaştırılmıştır (23). Klasik astımlı

hastalarda AMP'ye yanıt oranı %67.7, öksürük varyant astımlı hastalarda ise %38.9 bulunmuştur (23). Aynı şekilde, bu yanıtın şiddeti ($PC_{15} PtcO_2$), klasik astımlılarda öksürük varyant astımlı hastalara göre daha yüksek olduğu görülmüştür (23). Buna karşın, 2 grup arasında metakoline yanıt oranı ve yanıtın şiddeti açısından fark olmadığı görülmüştür (23). Çalışmamızda; astımlı gruptaki hastalarda daha fazla sayıda AMP yanıtı alınmışsa da, epizodik (viral) vizingli ve astımlı çocukların ayırt edilmesinde AMP'ye yanıt şiddeti istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Çalışmamızda, 200 mg/ml altındaki AMP dozlarında yanıt verenler ROC eğrileri ile değerlendirildiğinde; epizodik (viral) vizingli ve astımlı çocukları ayırt edecek sınır bir AMP konsantrasyon değeri olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, AMP testinin de iki grubu ayırt ettirebilecek bir test olmadığı anlaşılmıştır. Halbuki, başka kronik akciğer hastalıkları bu testle astımdan ayrılabilir. Bu durum, hastalıkların altta yatan histopatolojilerinin farklı olmasıyla açıklanmaktadır. Okul öncesi dönemde yapılan bronkoalveolar lavaj ve az sayıdaki biyopsi çalışmaları, epizodik (viral) vizingli çocuklarda hava yolu inflamasyonunun astımdan farklı olduğunu göstermiştir (4,24). Bu hastalarda astımdaki gibi eozinofilik bir inflamasyon bulunmamakta, "remodeling" bulgularına da rastlanmamaktadır (4,24). Astımlı çocuklarda, klinik tanı olmadan önce bile kronik eozinofilik hava yolu inflamasyonu ve "remodeling" olabilmektedir (25). Ancak bu histopatolojinin tam olarak ne zaman, hangi yaş aralığında geliştiği bilinmemektedir. Özellikle 3 yaşından önce klinik olarak astım özelliklerini taşıyan, hatta hava yolu obstrüksiyonu ve atopisi olan hastalarda bile klasik astım histopatolojisi olmadığı bilinmektedir (24). Eğer bizim astım fenotipine uyan grubumuzdaki hastaların bir kısmında da klasik histopatoloji tam olarak gelişmediyse; AMP uyarı testi gibi indirekt bir yöntemle, gruplar arasında ayırıcı tanı yapılamaması kaçınılmazdır. Hastalarımıza hava yolu inflamasyonunu doğrudan gösterecek bronkoalveolar lavaj ya da biyopsi gibi invaziv tetkikler yapamadığımız için, bu hipotezi kesinleştirmemiz zordur. Bu konuyla ilgili bir başka açıklama da, çalışma gruplarımızdaki çocukların fenotipik sınıflandırılmasının çok doğru yapılamadığı şeklindedir. Fenotipik sınıflamanın, her ne kadar aynı alerji uzmanı tarafından ve başından beri aynı yerde takip edilen hastalarda yapılmış olması, bazı hastaların yanlış gruba alınmış olma olasılığını dışlamamaktadır. Bu nedenle de AMP testi beklenen sonucu vermemiş olabilir. Hastalarımızın yaşları göz önüne alındığında; bu yaşlarda fenotipler arasında benzerlikler, "overlap" olarak adlandırılan üst üste binmeler olabileceği kaçınılmaz bir durumdur. Bu nedenle daha baştan fenotipik gruplandırma hatası olmuşsa, zaten beklenen sonuç da alınamayacaktır. Bir başka açıklama, AMP'nin etki mekanizması üzerinden yapılabilir. Adenozin 5-monofosfat provokasyon testinde ortaya çıkan bronkospazm, sadece mast hücre degranülasyonuna bağlı değildir. Erişkinlerde yapılan araştırmalar, AMP hava yolu yanıtının şiddeti ile bronş düz kaslarında bulunan mast hücre yoğunluğu arasında ilişki olmadığını göstermiştir (26). Bu nedenle, afferent vagal yolların da AMP ile oluşan bronkospazmdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (26). AMP testi ile ilgili veriler biriktikçe, AMP

testinin astım tanısında daha spesifik bir test olduğu görüşünün değişebileceği açıktır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar; AMP testi sonuçlarının atopi ile de ilişkili olduğunu göstermiştir. Kim ve ark.nın (13) çalışmasında; okul öncesi yaş grubundaki atopik bünyeli çocuklarda AMP cevabı %83.9, atopik olmayan çocuklarda %32.4 olarak bulunmuştur. Aynı yaş grubunda yapılan bir başka çalışmada da; AMP'ye yanıt veren hastalarda atopik dermatit, alerjik rinit sıklığı ve serum IgE düzeyleri, yanıtı olmayan hastalara göre yüksek bulunmuştur (27). Bizim çalışmamızda da, persistan vizing grubunda AMP'ye daha fazla yanıt alınmasının nedeni, bu gruptaki hastaların çoğunun atopik olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Kan eozinofil sayımı, invaziv olmayan inflamasyon göstergelerinden biridir. Çalışmamızda; persistan vizingli çocukların kan eozinofil sayı ve yüzdesi, epizodik viral vizingli çocuklara göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek bulunmuştur. Fakat her iki grupta da, kan eozinofil sayımı ile PC₁₅PtcO₂ metakolin veya PC₁₅PtcO₂ AMP arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Çalışmamıza ağır astımı olan hastalar dahil edilmediği için kan eozinofil sayıları daha düşük olabileceği düşünülmüştür. Choi ve ark. (28) çalışmasında, 4-6 yaş arası okul öncesi çocuklarda kan eozinofil sayısı ve eozinofilik katyonik protein düzeyi ile metakolin konsantrasyonu arasında anlamlı korelasyon bulunmamışken, AMP konsantrasyonu ile korele bulunmuştur (28). Pizzichini ve ark. (29) çalışmasında; erişkin astımlı hastalarda semptom skorları, solunum fonksiyonları ve metakolin bronş provokasyon testleri ile balgam eozinofil sayısı arasında, kan eozinofil sayısına göre daha önemli ilişki olduğu saptanmıştır. Periferik kan eozinofil düzeyinin solunum yolu inflamasyonunu yansıtmada, balgam ve bronkoalveoler lavaja göre daha dolaylı bir göstergedir. Astımlı hastalarda; AMP testi sonuçlarıyla, biyopsi ya da bronkoalveoler lavaj gibi hava yolunun invaziv örnekleme ile gösterilen eozinofilik inflamasyonu arasındaki ilişkiyi doğrudan yansıtan bir çalışma yoktur. Van den Berge ve ark. (30) çalışmasında, PC₂₀ AMP ve PC₂₀ metakolin ile 120 erişkin astımlı hastanın balgam eozinofil sayısı arasındaki ilişki araştırılmıştır (30). Bu çalışmada; PC₂₀ AMP'nin, PC₂₀ metakolin'e göre balgam eozinofil sayısı ile daha önemli ilişki gösterdiği bulunmuştur. Tüm bu gözlemler, PC₂₀ AMP'nin hava yollarındaki eozinofilik inflamasyonu yansıtabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu konu halen çok tartışmalıdır ve daha ayrıntılı klinik çalışmaları yapılması gerektiği ortadadır (20).

Çalışmamızda; klinik olarak astım ve epizodik viral vizing tanısı almış, aynı yaşta çocuklar direkt ve indirekt yolla etki gösteren bronş provokasyon testleri ile ayırt edilememişlerdir. İndirekt bronş provokasyon testleri, astım ve diğer kronik inflamatuvar akciğer hastalıkları arasındaki histopatolojik farklılıkları daha iyi yansıttığı için ayırıcı tanıda işe yarasa da, bizim sonuçlarımıza göre bu test, okul öncesi yaş grubunda vizing fenotiplerini tam olarak ayırt edememektedir (9). Astım, küçük çocuklarda tanısı en çok atlanan hastalıktır. Bu konuda yeterli kanıtlar elde edilene kadar pratik hayatta tanı koyarken; öykü, fizik inceleme ve tedaviden tanıya gitme şeklindeki basamaklar kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2018. Section 2. Children 5 years and Younger. Available from: www.ginasthma.org
2. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The group health medical associates. N Engl J Med 1995;332:133-8.
3. Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: An evidence-based approach. Eur Respir J 2008;32:1096-110.
4. Stevenson EC, Turner G, Heaney LG, Schock BC, Taylor R, Gallagher T, et al. Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. Clin Exp Allergy 1997;27:1027-35.
5. Castile R. Novel techniques for assessing infant and pediatric lung function and structure. Pediatr Infect Dis J 2004;23 Suppl 11:S246-53.
6. Mochizuki H, Shigeta M, Arakawa H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A. Bronchial hyperresponsiveness before and after the diagnosis of bronchial asthma in children. Pediatrics 2000;106:1442-6.
7. Turner SW, Young S, Goldblatt J, Landau LI, Le Souëf PN. Childhood asthma and increased airway responsiveness: A relationship that begins in infancy. Am J Respir Crit Care Med 2009;179:98-104.
8. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. Allergol Int 2007;56:341-8.
9. Cockcroft DW, Davis BE. Diagnostic and therapeutic value of airway challenges in asthma. Curr Allergy Asthma Rep 2009;9:247-53.
10. Joos GF, O'Connor B. ERS Task Force Indirect airway challenges. Eur Respir J 2003; 21:1050-68.
11. Phagoo SB, Wilson NM, Silvermann M. Repeatability of methacholine challenge in asthmatic children measured by change in transcutaneous oxygen tension. Thorax 1992;47:804-8.
12. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:309-29.
13. Kim DK, Choi SH, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchial responsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate in atopic and non-atopic preschool children with recurrent wheezing. Clin Exp Allergy 2007;37:15-21.
14. Castro-Rodriguez JA, Navarrete-Contreras P, Holmgren L, Sanchez I, Caussade S. Bronchial hyperreactivity to methacholine in atopic versus nonatopic asthmatic schoolchildren and preschoolers. J Asthma 2010;47:929-34.
15. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:1253-8.
16. Mochizuki H, Shigeta M, Kato M, Maeda S, Shimizu T, Mirokawa A. Age-related changes in bronchial hyperreactivity to methacholine in asthmatic children. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:906-10.
17. Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Landau LI, Lesouëf PN. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:37-42.
18. Delacourt C, Benoist MR, Le Bourgeois M, Waernessyckle

- S, Rufin P, Brouard JJ, et al. Relationship between bronchial hyperresponsiveness and impaired lung function after infantile asthma. *PLoS One* 2007;2:e1180.
19. Yang E, Kim W, Kwon BC, Choi SY, Sohn MH, Kim KE. Relationship among pulmonary function, bronchial hyperresponsiveness, and atopy in children with clinically stable asthma. *Lung* 2006;184:73-9.
20. Zanen P. PC₂₀ Adenosine 5'-Monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC₂₀ methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:730.
21. Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or paediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1995;50:511-6.
22. Delacourt C, Benoist MR, Waernessyckle S, Rufin P, Brouard JJ, De Buc J, et al. Relationship between bronchial responsiveness and clinical evolution in infants who wheeze. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1382-6.
23. Bakirtas A, Turktas I. Methacholine and adenosine 5'-monophosphate challenges in preschool children with cough-variant and classic asthma. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:973-9.
24. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:858-64.
25. Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:43-51.
26. Liesker JJ, Ten Hacken NH, Rutgers SR, Zeinstra-Smith M, Postma DS, Timens W. Mast cell numbers in airway smooth muscle and PC20AMP in asthma and COPD. *Respir Med* 2007;101:882-7.
27. Bakirtas A, Turktas I. Airway hyper-responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in preschool-age children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:428-34.
28. Choi SH, Kim DK, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchial responsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate in young children with asthma: Their relationship with blood eosinophils and serum eosinophil cationic protein. *Allergy* 2007;62:1119-24.
29. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:539-44.
30. Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HAM, Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, et al. PC₂₀ Adenosine 5'-Monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC₂₀ methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1546-50.