

# Lungenfunktion, Lung Clearance Index und bronchiale Entzündung bei Kindern und Jugendlichen mit Bronchiolitis obliterans

## Lung Function, Lung Clearance Index und Bronchial Inflammation in Children and Adolescents with Bronchiolitis obliterans

### Autoren

N. Belachew, S. Jerkic, F. Michel, R. Schubert, S. Zielen, M. Rosewich

### Institut

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose

eingereicht 20.11.2018

akzeptiert nach Revision 6.2.2019

### Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0853-0253> |

Online-Publikation: 20.3.2019 |

Pneumologie 2019; 73: 399–406

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0934-8387

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Stefan Zielen, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main  
Stefan.Zielen@kgu.de

### ZUSAMMENFASSUNG

**Einleitung** Die Bronchiolitis obliterans (BO) ist eine sehr seltene, chronische Lungenerkrankung, die vereinzelt nach schweren Atemwegsinfektionen oder als Folge von Stammzell- und Lungentransplantation auftritt. Ziel der Arbeit war es, die Lungenfunktion und die bronchiale Entzündung bei BO-Patienten im Jugend- und Kindesalter zu untersuchen. Zudem sollte das Potenzial des LCI in der Diagnostik dieser Patienten untersucht werden.

**Methoden** Es wurden 16 BO-Patienten (Alter: Median 16,7; 9,6–25,3 Jahre) und 17 gesunde Probanden (Alter: Median 16,6; 7,6–25,0 Jahre) untersucht. Neben der Untersuchung der Lungenfunktion (FVC, FEV<sub>1</sub>, MEF<sub>25</sub>, RV und RV/TLC) mittels Bodyplethysmografie erfolgte eine Reversibilitätstestung nach Gabe von 400 µg Salbutamol. Die Bestimmung des LCI erfolgte mittels Multiple Breath Washout (MBW)-Methode. Zusätzlich wurde die Zellverteilung und das Zytokinprofil (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α) mittels Cytometric Bead Array (CBA) im induzierten Sputum analysiert.

**Ergebnisse** FVC, FEV<sub>1</sub> und MEF<sub>25</sub> der BO-Patienten waren signifikant niedriger, das RV und die RV/TLC jedoch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine bronchiale Reversibilität zeigte sich bei 3 Patienten. Der LCI war bei

den BO-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Median 10,24 vs. 7,1) und korrelierte signifikant mit dem MEF<sub>25</sub> ( $p < 0,0001$ ). Im induzierten Sputum fand sich eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl, der neutrophilen Granulozyten sowie von IL-6 und IL-8 ( $p < 0,01$ ).

**Schlussfolgerung** Die Lungenfunktion ist bei Kindern und Jugendlichen mit BO stark eingeschränkt. Zudem erwies sich der LCI als sensitiver und reproduzierbarer Marker zur Beurteilung der obstruktiven Beeinträchtigung der kleinen Atemwege. Im induzierten Sputum ist eine von Neutrophilen dominierte bronchiale Entzündung nachweisbar.

### ABSTRACT

**Introduction** Bronchiolitis obliterans (BO) is a rare and severe pulmonary disease which can occur due to airway infection or as a result of stem cell or lung transplantation. Our goal was to study the lung function and airway inflammation among BO patients. Furthermore, we examined the potential of the lung clearance index (LCI) for BO diagnostics among that group.

**Methods** 16 BO patients (age: 16.7; 9.6–25.3 years) and 17 healthy controls (age: 16.6; 7.6–25.0 years) participated in the study. Lung function parameters (FVC, FEV<sub>1</sub>, MEF<sub>25</sub>, RV und RV/TLC) as well as airway reversibility after administration of 400 µg salbutamol was investigated. The lung clearance index was determined using the multiple-breath wash-out method (MBW). Additionally, induced sputum was analyzed for cytology and cytokine levels (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α) using the cytometric bead array (CBA).

**Results** BO patients had significantly lower FVC, FEV<sub>1</sub> and MEF<sub>25</sub> but increased RV and RV/TLC. Airway reversibility was observed in 3 patients. The LCI was significantly higher among BO patients compared to the healthy control group (median 10.24 vs. 7.1). Apart from a massive airway inflammation indicated by elevated numbers of total cells and neutrophils, the CBA analysis showed increased levels of IL-6 and IL-8 ( $p < 0.01$ ).

**Discussion** In BO patients, lung function in childhood and adolescence is severely impaired. Furthermore, we were able to demonstrate the sensitivity and reproducibility of LCI and its value for the evaluation of small airway obstruction. In induced sputum, a neutrophil-dominated airway inflammation is detectable.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>BAL</b>	Bronchoalveoläre Lavage
<b>BO</b>	Bronchiolitis obliterans
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array
<b>CF</b>	Cystische Fibrose
<b>COPD</b>	Chronisch obstruktive Bronchitis
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Einsekundenkapazität
<b>FVC</b>	Funktionelle Vitalkapazität
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-8</b>	Interleukin-8
<b>LCI</b>	Lung Clearance Index
<b>MBW</b>	Multiple Breath Washout
<b>MEF<sub>25</sub></b>	Mittlerer expiratorischer Fluss bei 25 % der forcierten Vitalkapazität
<b>NET</b>	Neutrophil extracellular traps
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RV</b>	Residualvolumen
<b>RV/TLC</b>	Residualvolumen/Totale Lungkapazität
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Der Begriff „Bronchiolitis obliterans“ wurde historisch v. a. in der Pathologie zur Beschreibung zweier distinktiver Erkrankungsmuster im Bereich der kleinen Atemwege herangezogen [1]. Eines dieser Muster zeichnet sich durch die Entwicklung von intraluminales Granulationsgewebe aus und wurde als „Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie“ 1985 erstmals von Epler beschrieben [2]. In jüngerer Literatur findet sich dafür auch die Bezeichnung „Cryptogenic Organizing Pneumonia“ [3]. Das zweite Muster ist durch eine massive subepitheliale Inflammation sowie eine fibrotische Verengung der Bronchiolen charakterisiert und wird daher auch als „oblitative“ oder „constrictive Bronchiolitis“ bezeichnet [4]. Im Zuge der Entzündung und des fibrotischen Prozesses kommt es durch Obstruktion und/oder Verlegung der kleinen Atemwege zu einer chronischen Flusslimitierung [5]. Die mit der Bronchiolitis obliterans (BO) einhergehende Symptomatik wurde 1901 von Lange anhand zweier postinfektiöser Krankheitsfälle beschrieben [6]. Aufgrund der geringen Inzidenz und der Schwere des Krankheitsbildes erfüllt die BO die auf europäischer Ebene beschlossenen Anforderungen für die Einstufung als „seltene Erkrankung“. Sie wird daher als solches auch im „Orphan disease“-Register für seltene Erkrankungen geführt.

Aufgrund der zahlreichen Ätiologien, die in Bezug auf die BO diskutiert werden, wird eine gemeinsame pathophysiologische Endstrecke angenommen, sodass „Insulte“ unterschiedlicher Genese zu vergleichbaren mikroskopischen, physiologischen und klinischen Veränderungen führen, die man bei BO-Patienten beobachten kann [1, 7]. Besonders gefürchtet wird die BO als Komplikation nach Lungen- und Knochenmarktransplantation. Die postinfektiöse BO betrifft hauptsächlich Patienten im Kindes- und Jugendalter [8]. Als typische Erreger wurden dabei v. a. Adenoviren, Influenza-A-Viren, Masernviren und Mycoplasma pneumoniae identifiziert, wobei den Adenoviren hinsicht-

lich der Häufigkeitsverteilung v. a. in Südamerika die größte Rolle zukommt. Eine verlässliche Diagnose der BO lässt sich nur unter Betrachtung und Berücksichtigung mehrerer Befunde zielführend stellen [9–11]. Eine besondere Rolle spielen dabei die Anamnese, die klinische Untersuchung, die Lungenfunktionstestung sowie radiologische Befunde [12]. Die histologische Sicherung durch eine Lungenbiopsie ist zwar nach wie vor Goldstandard, spielt jedoch aufgrund ihrer großen Invasivität in der klinischen Praxis eine untergeordnete Rolle [13, 14]. Zusätzlich kann die Diagnose BO durch eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) gestützt werden. Bei Untersuchung der zellulären Verteilung sowie des Zytokinprofils ergibt sich typischerweise das Bild einer neutrophilen Entzündung [15]. Durch das nicht invasive Vorgehen bei der Sputuminduktion stellt diese Untersuchung eine wertvolle Alternative zur BAL dar [16].

Mit der Erkenntnis, dass die Früherkennung und die dadurch mögliche Vermeidung bzw. Verzögerung von irreversiblen Atemwegsschädigungen bei einer Vielzahl von Atemwegserkrankungen von entscheidender Bedeutung ist, intensiviert sich die Suche nach sensitiveren Messmethoden zur Erfassung der kleinen Atemwege. Die Weiterentwicklung der Wash-out-Analyse in den letzten zwei Jahrzehnten führte zur Bestimmung des Lung Clearance Index (LCI) mittels Multiple Breath Washout (MBW). Neben der hohen Sensitivität wird der LCI insbesondere durch die Tatsache attraktiv, dass dessen Messung – im Gegensatz zu den meisten klassischen Lungenfunktionsparametern – weitgehend mitarbeitersunabhängig ermittelt werden kann. Der LCI ist nur einer der Marker, die im Rahmen eines MBW ermittelt werden und somit Aufschluss über die Effizienz der Gasmischung und Ventilationsverteilung in der Lunge geben können. Der Grundgedanke beim MBW ist dabei, dass eine Verengung der Atemwege, bspw. aufgrund von Entzündungen, Mukusretention oder strukturellen Schäden am Lungengerüst, zu einer unregelmäßigen Ventilation führt und somit die Gasmischung in der Lunge behindert. Die Behinderung der Ventilationsverteilung wird durch die vermehrte Anzahl an Atemzügen, die nötig ist, um den Tracer bis zu den vordefinierten Endpunkten auszuwaschen, als LCI quantifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lungenfunktion, insbesondere die Wertigkeit des LCI, und die bronchiale Entzündung im Sputum bei BO-Patienten im Jugend- und Kindesalter zu untersuchen.

## Patienten und Methodik

Die BO-Patienten wurden aus dem Patientenkollektiv der pneumologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main rekrutiert. Die Diagnose „Bronchiolitis obliterans“ wurde in der Altersgruppe zwischen 6 und 26 Jahren bei 6924 Patienten dabei lediglich 36-mal gestellt. Bei 24 Patienten konnte die Diagnose BO nach eingehender Prüfung von Krankengeschichten, Lungenfunktionsdaten und CT-Befunden verifiziert werden [9]. Diese Patienten wurden eingehend von Rosewich et al. aus unserer Arbeitsgruppe 2015 beschrieben [9]. Von diesen 24 Patienten konnten 16 Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Zusätzlich wurde eine alters- und geschlechtsentsprechende Kontrollgruppe untersucht. Es erfolgte in beiden Grup-

pen eine mündliche und schriftliche Aufklärung. Nach Einwilligung der Patienten, und bei minderjährigen Patienten auch deren Eltern, erfolgte der Einschluss in die Studie. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt am Main genehmigt und bei clinicaltrials.gov mit der Nummer NCT02627833 registriert. Die Patientenrekrutierung und Studiendurchführung fand im Zeitraum von Juli 2013 bis Mai 2014 statt.

**Ausschlusskriterien** Patienten vor Beginn des 6. Lebensjahres und nach Abschluss des 27. Lebensjahres, mit bekannter systemischer oder bronchialer Entzündung, mit anderen chronischen Krankheiten oder Infektionen (z. B. HIV, Tbc, Malignom), Schwangerschaft sowie mit bekanntem Alkohol-, Drogen- und/oder Medikamentenmissbrauch wurden für diese Studie nicht berücksichtigt. Zudem wurden Patienten und Probanden ausgeschlossen, die unfähig waren, die Tragweite der Studie zu erfassen oder bereits in einer anderen Studie involviert waren.

## Patientencharakteristika

Es wurden 16 Patienten mit BO (8 männliche und 8 weibliche) im Alter von 9 bis 25 Jahren (Median: 16,7; Range 9,6–25,3) und 17 Kontrollen (11 männliche und 6 weibliche) zwischen 7 und 25 Jahren (Median: 16,6; 7,6–25,0) eingeschlossen. Eine Übersicht über die klinischen Charakteristika, Lungenfunktionsdaten und LCI-Ergebnisse aller Studienteilnehmer findet sich in ► **Tab. 1**.

## Lungenfunktion und induziertes Sputum

Alle hier präsentierten Ergebnisse wurden innerhalb einer Visite erhoben. Zunächst wurden eine Anamnese und eine klinische Untersuchung durchgeführt. Danach erfolgte die Lungenfunktionsuntersuchung vor und nach Bronchospasmolyse mit 400 µg Salbutamol sowie die Bestimmung des Lung Clearance Index. Anschließend wurde Sputum induziert. Zur Durchführung der Lungenfunktionsmessung wurde der MasterScreen Bodyplethysmograph (Viasys Healthcare GmbH, Höchberg) verwendet.

**Bestimmung des LCI** Zur Bestimmung des LCI wurde das EasyOne Pro System der nnd Medizintechnik AG (Zürich, Schweiz) verwendet, das für seine Messungen Stickstoff als Tracer nutzt. Den Studienteilnehmern wurde im Rahmen des Multiple-Breath-Washouts über ein Mundstück hundertprozentiger Sauerstoff verabreicht, um den intrapulmonal befindlichen Stickstoff auszuwaschen. Simultan wurde mittels Ultraschall-durchflussmessung der Stickstoffgehalt in der ausgeatmeten Luft gemessen. Die Messung wurde als abgeschlossen angesehen, sobald die Konzentration des Tracers auf unter 1/40 der Ausgangskonzentration (Stickstoffkonzentration <2,5%) gefallen war. Während des Multiple-Breath-Washouts befanden sich die Studienteilnehmer in aufrechter Sitzposition. Das Mundstück wurde dabei vom Studienteilnehmer selbst (bei sehr jungen Studienteilnehmern gegebenenfalls mit Unterstützung) im 90°-Winkel zum Kopf gehalten. Die Messungen wurden bis zum

► **Tab. 1** Lungenfunktion und LCI.

	Kontrollen	BO-Patienten	p-Wert
<b>FVC [%]</b>	95,7 (79,3–119,0)	77,5 (49,8–108,9)	<0,05
<b>FEV<sub>1</sub> [%]</b>	97,0 (83,3–114,9)	63,5 (21,9–92,3)	<0,0001
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC [%]</b>	91,8 (72,7–102,7)	67,9 (38,2–92,6)	<0,0002
<b>MEF<sub>25</sub> [%]</b>	105,3 (44,9–137,1)	28,0 (11,5–88,5)	<0,0001
<b>RV [%]</b>	128,7 (95,1–173,1)	181,1 (115,6–196,9)	<0,001
<b>RV/TLC [%]</b>	131,9 (100,2–152,6)	169,7 (132,0–255,7)	<0,0001
<b>LCI</b>	7,37 (6,08–8,33)	10,24 (6,75–19,79)	<0,001

Erhalt von mindestens 2 und maximal 3 gültigen Versuchen wiederholt. Ein Versuch wurde als gültig angenommen, wenn der Studienteilnehmer die Testung ohne Schlucken, Husten, Absetzen des Mundstückes und unter Beibehaltung einer regelmäßigen Ruheatmung vollenden konnte. Bei 3 gültigen Versuchen wurde ein Mittelwert gebildet und die 2 näher zum Mittelwert liegenden LCI-Werte berücksichtigt. In den restlichen Fällen wurde der Mittelwert aus den 2 gültigen Versuchen gebildet.

**Sputuminduktion** Zur Induktion des Sputums wurde der Ultraschallvernebler (OMRON NE-U17, OMRON HEALTHCARE Co., GER) verwendet. Das Sputum wurde in drei 7-minütigen Provokationsstufen mit ansteigender Konzentration hypertoner Kochsalzlösung (3%, 4%, 5%) und stets gleicher Verneblungsgeschwindigkeit (Stufe 4 von 7) gewonnen. Die Aufarbeitung des induzierten Sputums erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Pizzichini et al. [16]. Diese Methode wurde von unserer Arbeitsgruppe mehrfach ausführlich beschrieben [17, 18]. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, wobei zwischen lebenden, toten und Plattenepithelzellen differenziert wurde. Die mittels Zytopspin hergestellten vier Objektträger eines jeden Studienteilnehmers wurden nach Pappenheim gefärbt. Die Auszählung fand unter 100-facher mikroskopischer Vergrößerung und stets bis zum Erreichen von 400 Zellen statt [17]. Der Anteil an neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Lymphozyten und Makrophagen wurde in Prozent angegeben und pro ml berechnet. Plattenepithelzellen wurden nicht berücksichtigt. Die Proben wurden zur Auswertung anonymisiert, um eine Verblindung zu gewährleisten.

Die Messung der Zytokine erfolgte via Cytometric Bead Array (CBA) [19]. Alle Ergebnisse wurden als Median und Spannweite (Range) angegeben. Der Vergleich zwischen den beiden Kohorten erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests unter expliziter Angabe der p-Werte, welche bei p < 0,05 als statistisch signifikant angenommen wurden. Die Kalkulationen wurden

mittels GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA) und Microsoft Excel durchgeführt. Zur Ermittlung von Korrelationen zwischen 2 verschiedenen Parametern wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient errechnet.

## Ergebnisse

### Bodyplethysmografie und Reversibilitätstestung

In ▶ **Tab. 1** sind die Lungenfunktionsparameter aufgelistet. FVC, FEV<sub>1</sub> und MEF<sub>25</sub> der BO-Patienten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger, RV und RV/TLC signifikant erhöht.

Nach Reversibilitätstestung mit 400 µg Salbutamol zeigten 3 der 16 Patienten (18,75 %) eine relevante Reversibilität (Verbesserung der FEV<sub>1</sub> > 12,5 %) im Vergleich zur Referenz-Lungenfunktion.

### LCI-Messung

In der BO-Patientengruppe lagen die LCI-Werte mit 10,24 (6,75–19,79) signifikant über denen der gesunden Kontrollgruppe mit 7,37 (6,08–8,33). In ▶ **Abb. 1** sind die LCI-Werte beider Kohorten dargestellt. Der mittlere Variationskoeffizient der 3 gültigen Messversuche lag bei 5,9 % in unserer gesunden Kontrollgruppe (Alter: 16,6; 7,6–25,0) und bei 5,0 % in unserer BO-Gruppe (Alter: 16,7, 9,6–25,3).

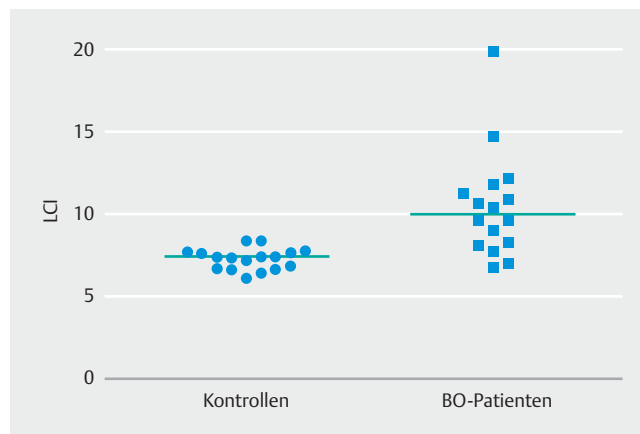
### Induziertes Sputum

Die Leukozyten-Gesamtzahl war im induzierten Sputum bei Patienten mit BO ( $72,5 \times 10^4$  Zellen/ml) im Vergleich zu den Kontrollen ( $29,7 \times 10^4$  Zellen/ml) signifikant erhöht. Die Zellverteilung zeigt ▶ **Tab. 2**. Es fand sich eine signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten bei den Patienten mit BO (Median 86,0 % [59,0–99,0]) vs. Kontrollen (13,5 %, 1,0–49,0, ▶ **Abb. 2**). Der Anteil der Makrophagen bei den BO-Patienten (Median 13,0 % [1,0–40]) war entsprechend signifikant niedriger als bei den Kontrollen (86,0 %, 48,0–99,0). Kein Unterschied zeigte sich in der Lymphozytenzahl sowie bei den eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Der Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  wurde im Sputum der Patienten und der Kontrollgruppe mittels CBA gemessen (▶ **Tab. 3**). Beim Vergleich beider Kohorten zeigten sich signifikante Unterschiede für IL-6 und IL-8 ( $p < 0,01$ ), während für TNF- $\alpha$  und für IL-1 $\beta$  keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden.

### Korrelation des LCI mit Lungenfunktion und Biomarkern

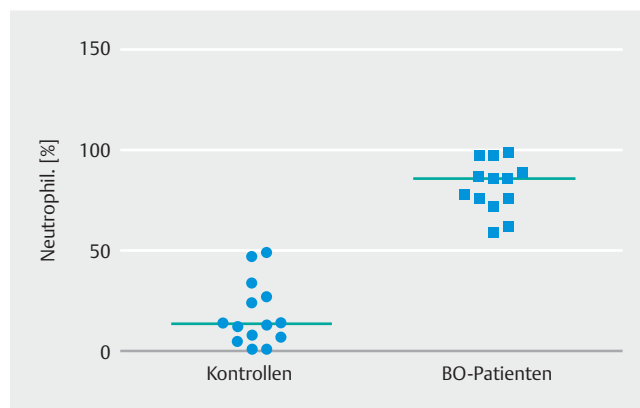
Die Korrelationsanalyse zeigte einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen den Lungenfunktionsparametern FEV<sub>1</sub>, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC, MEF<sub>25</sub> und dem LCI. Eine signifikante positive Korrelation fand sich für RV, RV/TLC mit den LCI-Ergebnissen. Bei Betrachtung der Zytologie fiel ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen LCI und dem Anteil an neutrophilen Granulozyten auf, während eine signifikante negative Korrelation zwischen LCI und Alveolarmakrophagen im Sputum beobachtet werden konnte. Die Gesamtzelllast korrelierte ebenfalls signifikant und positiv mit dem LCI. Auch die pro-in-



▶ **Abb. 1** LCI-Messung bei Kontrollen und BO-Patienten.

▶ **Tab. 2** Zellzahl und Zellverteilung im induzierten Sputum.

	Kontrollen	BO-Patienten	p-Wert
<b>Makrophagen abs.</b>	344,0 (192,0–396,0)	50,0 (2,0–160,0)	<0,0001
<b>Makrophagen [%]</b>	86,0 (48,0–99,0)	13,0 (1,0–40,0)	<0,0001
<b>Neutrophile abs.</b>	54,0 (2,0–196,0)	348,0 (236,0–398,0)	<0,0001
<b>Neutrophile [%]</b>	13,5 (1,0–49,0)	86,0 (59,0–99,0)	<0,0001
<b>Lymphozyten abs.</b>	2,0 (0,0–4,0)	2,0 (0,0–4,0)	–
<b>Lymphozyten [%]</b>	1,0 (0,0–1,0)	1,0 (0,0–1,0)	–
<b>Gesamtzellzahl (<math>\times 10^4</math> Zellen/ml)</b>	29,7 (5–66)	72,5 (5–1294)	<0,05



▶ **Abb. 2** Neutrophile bei Kontrollen und BO-Patienten.

flammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, und TNF- $\alpha$  wurden mit den LCI-Werten korreliert. Dabei konnte ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und LCI fest-

► **Tab. 3** Biomarker im induzierten Sputum.

Biomarker	Kontrollen	BO-Patienten	p-Wert
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	168 (36–841)	530 (44–5863)	n. s.
IL-6 (pg/ml)	65 (0–250)	374 (30–5417)	<0,001
IL-8 (pg/ml)	2640 (366–13018)	10144 (1423–162452)	<0,01
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	14 (0–37)	16 (0–123)	n. s.

► **Tab. 4** Korrelation des LCI mit Lungenfunktion, Zytologie und Biomarker.

Lungenfunktion/Zytologie/ Biomarker	LCI	r	p-Wert
FEV <sub>1</sub> [%]	LCI	–0,714	<0,0001
VC [%]	LCI	–0,4033	<0,05
FEV <sub>1</sub> /FVC [%]	LCI	–0,701	<0,001
MEF <sub>25</sub> [%]	LCI	–0,734	<0,0001
RV [%]	LCI	0,4367	<0,05
RV/TLC [%]	LCI	0,5693	<0,001
Alveolarmakrophagen abs.	LCI	–0,525	<0,01
Neutrophile abs.	LCI	0,529	<0,01
Gesamtzellzahl ( $\times 10^4$ )	LCI	0,515	<0,01
IL-1 $\beta$	LCI	0,506	<0,01
IL-6	LCI	0,609	<0,001
IL-8	LCI	0,5623	<0,001
TNF- $\alpha$	LCI	0,057	n. s.

gestellt werden. Eine Korrelation mit TNF- $\alpha$  war nicht nachweisbar. ► **Tab. 4** zeigt die Korrelationen.

## Diskussion

Die BO ist eine schwerwiegende chronische Entzündung, die in seltenen Fällen postinfektiös nach Adenovirus-, Influenza- und Mycoplasma pneumoniae-Infektion auftritt. Da bisher einheitliche Kriterien für eine frühzeitige Diagnose der Krankheit und eine evidenzbasierte Therapie fehlen, sind verlässliche und sensitive Parameter notwendig, um die Obstruktion und Entzündung der Bronchiolen frühzeitig zu erfassen. Entsprechend war es die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung, Patienten mit BO umfassender als bisher üblich zu charakterisieren. Die Lungenfunktionsuntersuchung zeigte erwartungsgemäß signifikant eingeschränkte Werte für FVC, FEV<sub>1</sub>, Tiffeneau-Index und MEF<sub>25</sub> bei signifikant erhöhtem RV und RV/TLC. Diese Ergebnisse stimmen mit denen früherer Untersuchungen überein

[9]. Typischerweise findet sich bei der BO ein verminderter MEF<sub>25</sub>-Wert in Kombination mit einem erhöhten RV bzw. RV/TLC als Hinweis für eine Erkrankung der kleinen Atemwege (small airway disease – SAD). Es kommt zu einem sog. „air trapping“, wie es auch bei der Cystischen Fibrose (CF) und der COPD vorkommt [19]. Hinweise, dass die BO ähnlich wie die CF in den kleinen Atemwegen beginnt, sind nicht neu [23–25]. Neue Untersuchungen zeigen, dass die Bestimmung des LCI mit der MBW die Beteiligung der kleinen Atemwege sensitiver anzeigt. Der LCI wurde bereits in einer Reihe von Studien unter Einbeziehung aller Altersgruppen, v. a. bei Patienten mit CF, untersucht [37–42]. Interessanterweise konnte die schwedische Studiengruppe um Gustafsson 2003 [39] einen erhöhten LCI bei 22 von 33 CF-Patienten mit normaler Spirometrie nachweisen, was für die höhere Sensitivität des LCI im Vergleich zur Spirometrie spricht. Dieses Ergebnis fand in Folgestudien mehrfach Bestätigung [38, 40, 41].

Auch unsere Untersuchung ergab signifikant höhere LCI-Werte unter den BO-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine deutlich höhere Sensitivität des LCI gegenüber der Spirometrie für strukturell fassbare Pathologien im CT konnten mehrere Untersucher nachweisen [43]. In diesem Kontext ist anzumerken, dass die kleinen Atemwege zwar einen Großteil der Gasaustauschfläche stellen, dafür jedoch nur einen sehr geringen Fluss haben und zu weniger als 10% zum Gesamt-Atemwegswiderstand beitragen [44]. Es ist also nicht verwunderlich, dass es zu einem erheblichen strukturellen Schaden in den Atemwegen kommen kann, bevor klassische Lungenfunktionsparameter wie der FEV<sub>1</sub> beeinträchtigt werden [45]. Unsere Korrelationsberechnungen zeigten eine signifikante negative Korrelation des LCI mit dem MEF<sub>25</sub> sowie eine signifikante positive Korrelation mit dem RV und RV/TLC. Parameter wie der MEF haben jedoch nachweislich eine geringe Reproduzierbarkeit [46]. Der LCI zeichnet sich im Gegensatz dazu durch seine verlässliche Reproduzierbarkeit aus, die mehrfach nachgewiesen wurde [36]. In vorangegangenen Studien konnte für die Messversuche innerhalb einer Visite ein mittlerer Variationskoeffizient von 3,2% unter gesunden Erwachsenen und von 7,8% bei Kindern mit CF errechnet werden [38, 41]. Fuchs et. al. konnten zudem unter der Verwendung der gleichen MBW-Technologie wie wir innerhalb einer Visite einen mittleren Variationskoeffizienten von 5,1% bei der Untersuchung von Kindern und Jugendlichen im Alter von 5,3–20,3 Jahren nachweisen [47]. Dieses hohe Maß an Reproduzierbarkeit konnten auch wir in unserer Studie bestätigen (Kontrollgruppe: 5,9%; BO-Gruppe: 5,0%). Damit ist die Reproduzierbarkeit des LCI höher als bei den meisten anderen Lungenfunktionsparametern [48]. Unsere Ergebnisse liefern somit nicht nur einen weiteren Hinweis für die Vermutung, dass die BO in den kleinen Atemwegen beginnt, sondern zeigen, dass der LCI auch bei BO-Patienten in Sachen Verlässlichkeit den klassischen Lungenfunktionsparametern überlegen ist.

Ogleich die LCI-Bestimmung wertvolle Informationen liefern kann, hat auch diese ihre Limitationen. So erlaubt die hohe Sensitivität des Markers zwar eine sehr gute Früherkennung, doch nimmt die Bestimmung bei Patienten mit signifikanter Atemwegsobstruktion deutlich mehr Zeit ein und bietet

nur eine eingeschränkte Aussagekraft [36]. Während unserer Messungen machten wir zudem die Erfahrung, dass das Risiko eines vorzeitigen Versuchsabbruchs bei prolongierter Messung durch die Wahrscheinlichkeit der vermehrten Speichelbildung und den Hustenreiz steigt. Zusätzlich ergibt sich beim MBW gegenüber der Spirometrie und Bodyplethysmografie ein weiterer praktischer Nachteil. Ein Messdurchgang bei einem gesunden oder nur mild erkrankten Kind dauert i. d. R. mehr als 5 Minuten. Bei Erwachsenen können die Messvorgänge das Doppelte dieser Zeit einnehmen [36]. Berücksichtigt man die Tatsachen, dass zum einen 3 Messdurchgänge durchgeführt werden sollten sowie zum anderen eine Wartezeit von mindestens 15 Minuten zwischen den einzelnen Durchgängen lag, um die ursprünglichen Gasverhältnisse in der Lunge vor jeder Messung wiederherzustellen [54], ergibt sich eine Gesamtmindestdauer von bis zu 1 Stunde pro Patient, was die regelmäßige Durchführbarkeit im ambulanten Alltag deutlich einschränkt.

Eine weitere Möglichkeit, die BO-Patientengruppe näher zu untersuchen, ergibt sich aus der Reversibilitäts-Testung. Über die Reversibilität der BO nach Gabe von  $\beta_2$ -Sympathomimetikern findet sich in der Literatur keine einheitliche Meinung. Die BO wird in einigen Quellen in Abgrenzung zum Asthma bronchiale als nicht reversible Erkrankung beschrieben [27, 28]. In der Studie von Teixeira konnte jedoch zumindest eine bis zu 24 Stunden anhaltende deutliche Reduktion der Atemwegobstruktion sowie Besserung der Luftretention nach Tiotropium-Inhalation festgestellt werden [29]. Bei einzelnen Individuen müssen sicherlich auch deren tagesabhängige Konstitution und Compliance eine einflussnehmende Rolle zugesprochen werden. Bei uns zeigten 3 von 16 Patienten (18,7%) eine signifikante Reversibilität, sodass diese Patienten von einer anti-obstruktiven Therapie profitieren könnten.

Die Untersuchung des induzierten Sputums ist eine nicht invasive Alternative zur BAL. Die Sputuminduktion ermöglichte uns neben der Evaluation der zellulären Entzündung auch die gezielte Messung von ausgewählten Biomarkern mittels CBA zu untersuchen. Unsere Sputum-Untersuchungen ergaben bei den BO-Patienten erwartungsgemäß eine massiv erhöhte Gesamtzelllast mit ausgeprägter Neutrophilie. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten im Sputum der Patienten lag im Median bei 86,0%. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [9]. Zusätzlich konnten Eckrich et al. nachweisen, dass die von Neutrophilen dominierte bronchiale Entzündung über 6–8 Wochen konstant nachweisbar ist [10].

IL-8 wird u. a. von Epithelzellen gebildet und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Die gleichzeitige Erhöhung von IL-8 und Neutrophilen verwundert also nicht, sondern bestätigt die anhaltende Entzündung in den Atemwegen der Patienten. Die Entzündungsaktivität kann nicht durch einen akuten Infekt erklärt werden, denn laut Studienprotokoll war die Abwesenheit eines akuten Infektes Voraussetzung für den Einschluss in die Studie. Da die Diagnose der BO bei den Patienten unterschiedlich lange, bei manchen Patienten schon mehr als 10 Jahre zurücklag, lassen diese Ergebnisse eindeutig auf eine chronische neutrophile Entzündung bei BO schließen. Die persistierende Aktivität der Neutrophilen und die Stimulation durch IL-8 steigern die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

(ROS), Myeloperoxidase und neutrophiler Elastase. Dies führt zu oxidativem Stress und begünstigt Gewebeerstörung, Bronchiektasien und einen Rückgang der Lungenfunktion. Eine Erhöhung des oxidativen Stresses konnte bei Patienten mit postinfektiöser BO und BO nach Stammzelltransplantation nachgewiesen werden [55, 56]. Neutrophile Granulozyten sind bei Aktivierung außerdem in der Lage, „neutrophil extracellular traps“ (NETs) zu bilden. Diese NETs bestehen aus dekondensiertem Chromatin, welches mit antimikrobiellen Proteinen wie neutrophiler Elastase, Myeloperoxidase und  $\alpha$ -Defensinen übersät ist [57]. NETs sind nützlich bei der Abwehr von Bakterien, können jedoch auch körpereigene Epithel- oder Endothelzellen in den Zelltod treiben [58]. Diese destruktive Wirkung wurde bei Erkrankungen mit ausgeprägter chronischer Neutrophilendominierter Inflammation wie z. B. CF und COPD nachgewiesen und korrelierte stets mit einer schlechteren Lungenfunktion [59, 60]. Ob NETs bei der Pathogenese der BO ebenfalls eine Rolle spielen und im Sputum erhöht sind, ist eine interessante Frage für weitere Forschungsarbeiten, zumal es mit inhalativ applizierter DNase einen vielversprechenden Therapieansatz zur Eindämmung der NET-Aktivität gäbe [61].

## Schlussfolgerung

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Lungenfunktion bei BO stark eingeschränkt ist und typischerweise eine Entzündung der kleinen Atemwege nachweisbar ist. Die Messung des LCI kann die Obstruktion der kleinen Atemwege sehr gut erfassen. Im induzierten Sputum findet sich eine von Neutrophilen dominierte bronchiale Entzündungsaktivität.

## Danksagung

Die Arbeit wurde unterstützt von der Stiftung Starke Lunge.

## Interessenkonflikt

Die Autoren haben folgende Interessenkonflikte außerhalb des Manuskripts: Stefan Zielen erhielt Honorare für Vorträge und Beratungen von folgenden Unternehmen: AstraZeneca; Sanofi-Aventis GmbH; Boehringer Ingelheim; Allergy Therapeutics; bene-Arzneimittel GmbH; Vifor Pharma Deutschland GmbH; Novartis AG; GlaxoSmithKline GmbH; ALK-Abelló Arzneimittel GmbH; Lofarma GmbH; IMS Health GmbH & Co. und Biotest Pharma GmbH.

Martin Rosewich erhielt Honorare für Vorträge von folgenden Unternehmen: Novartis AG, GlaxoSmithKline, Allergopharma GmbH, Sanofi-Aventis GmbH und Allergitherapeutika.

Ralf Schubert erhielt Honorare von Biotest Pharma GmbH und Vifor Pharma Deutschland GmbH.

Keine Interessenkonflikte haben die Autoren Silvija Jerkic, Nebiyat Belachew und Felix Michel.

## Literatur

- [1] Barker AF, Bergeron A, Rom WN et al. Obliterative bronchiolitis. *N Engl J Med* 2014; 370: 1820–1828
- [2] Epler GR, Colby TV, McLoud TC et al. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *N Engl J Med* 1985; 312: 152–158

- [3] Alasaly K, Muller N, Ostrow DN et al. Cryptogenic organizing pneumonia. A report of 25 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1995; 74: 201–211
- [4] Schlesinger C, Meyer C, Veerarahavan S et al. Constrictive (obliterative) bronchiolitis: diagnosis, etiology, and a critical review of the literature. *Ann Diagn Pathol* 1998; 2: 321–334
- [5] Kurland G, Michelson P. Bronchiolitis obliterans in children. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 193–208
- [6] Lange W. Über eine eigentümliche Erkrankung der kleinen Bronchien und Bronchiolen. *Arch Klin. Med* 1901; 70: 342–364
- [7] Hardy K, Schidlow D, Zaeri N. Obliterative bronchiolitis in children. *Chest* 1988; 93: 460–466
- [8] Smith K, Fan L. Insights into post-infectious bronchiolitis obliterans in children. *Thorax* 2006; 61: 462–463
- [9] Rosewich M, Zissler UM, Kheiri T et al. Bronchiolitis Entzündung bei Kinder und Jugendlichen mit Bronchiolitis obliterans. *Cytokine* 2015; 73: 156–162
- [10] Eckrich J, Herrmann E, Voss S et al. Short-Term Variation of Lung Function and Airway Inflammation in Children and Adolescents with Bronchiolitis Obliterans. *Lung* 2016; 194: 571–579
- [11] Rosewich M, Eckrich J, Zielen S. Long-term lung function in postinfectious bronchiolitis obliterans. *Thorax* 2015; 70: 792
- [12] Moonnumakal S, Fan L. Bronchiolitis obliterans in children. *Curr Opin Pediatr* 2008; 20: 272–278
- [13] Mauad T, Dolnikoff M. Histology of childhood bronchiolitis obliterans. *Ped Pulmonol* 2002; 33: 466–474
- [14] Estenne M, Maurer JR, Boehler A et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 297–310
- [15] Koh Y, Jung D, Koh JY et al. Bronchoalveolar cellularity and interleukin-8 levels in measles bronchiolitis obliterans. *Chest* 2007; 131: 1454–1460
- [16] Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A et al. 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] Schulze J, Voss S, Zissler U et al. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge. *Respir Res* 2012; 13: 78
- [18] Koc-Günel S, Schubert R, Zielen S et al. Cell distribution and cytokine levels in induced sputum from healthy subjects and patients with asthma after using different nebulizer techniques. *BMC Pulm Med* 2018; 18: 115
- [19] Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010; 50: 152–157
- [20] Cazzato S, Poletti V, Bernardi F et al. Airway inflammation and lung function decline in childhood post-infectious bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 381–390
- [21] Aguerre V, Castaños C, Pena HG et al. Postinfectious bronchiolitis obliterans in children: clinical and pulmonary function findings. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 1180–1185
- [22] Hansen JE, Sun XG, Wasserman K. Spirometric criteria for airway obstruction: Use percentage of FEV1/FVC ratio below the fifth percentile, not < 70%. *Chest* 2007; 131: 349–355
- [23] Hansell DM, Rubens MB, Padley SP et al. Obliterative bronchiolitis: individual CT signs of small airways disease and functional correlation. *Radiology* 1997; 203: 721–726
- [24] Kennedy VE, Todd JL, Palmer SM. Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2013; 13: 552–561
- [25] Tiddens HA, Donaldson SH, Rosenfeld M et al. Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 107–117
- [26] McFadden E Jr, Linden D. A reduction in maximum mid-expiratory flow rate. A spirographic manifestation of small airway disease. *Am J Med* 1972; 52: 725–737
- [27] Teper A, Kofman C, Maffey AF et al. Lung function in infants with chronic pulmonary disease after severe adenoviral illness. *J Pediatr* 1999; 134: 730–733
- [28] Wyatt SE, Nunn P, Hows JM et al. Airway obstruction associated with graft versus host disease after bone marrow transplantation. *Thorax* 1984; 39: 887–894
- [29] Teixeira M, Rodrigues J, Leone C et al. Acute bronchodilator responsiveness to tiotropium in postinfectious bronchiolitis obliterans in children. *Chest* 2013; 144: 974–980
- [30] Ellsner A, Vogelmeier C. The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 168–176
- [31] Scholma J, Slesbos DJ, Boezen HM et al. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2221–2225
- [32] Devouassoux G, Drouet C, Pin I et al. Alveolar neutrophilia is a predictor for the bronchiolitis obliterans syndrome, and increases with degree of severity. *Transpl Immunol* 2002; 10: 303–310
- [33] Pease J, Sabroe I. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am J Respir Med* 2002; 1: 19–25
- [34] Govindaraju V, Michoud M, Al-Chalabi M et al. Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C957–965
- [35] Berube J, Bourdon C, Yao Y et al. Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal* 2009; 21: 448–456
- [36] Horsley A. Lung clearance index in the assessment of airways disease. *Respir Med* 2009; 103: 793–799
- [37] Lum S, Gustafsson P, Ljungberg H et al. Early detection of cystic fibrosis lung disease: multiple-breath washout versus raised volume tests. *Thorax* 2007; 62: 341–347
- [38] Horsley AR, Gustafsson PM, Macleod KA et al. Lung clearance index is a sensitive, repeatable and practical measure of airways disease in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 2008; 63: 135–140
- [39] Gustafsson P, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003; 22: 972–979
- [40] Aurora P, Gustafsson P, Bush A et al. Multiple breath inert gas washout as a measure of ventilation distribution in children with cystic fibrosis. *Thorax* 2004; 59: 1068–1073
- [41] Aurora P, Bush A, Gustafsson P et al. Multiple-breath washout as a marker of lung disease in preschool children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 249–256
- [42] Schaedel C, de Monestrol I, Hjelte L et al. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Ped Pulmonol* 2002; 33: 483–491
- [43] Gustafsson P, De Jong P, Tiddens HA et al. Multiple-breath inert gas washout and spirometry versus structural lung disease in cystic fibrosis. *Thorax* 2008; 63: 129–134
- [44] Macklem P, Mead J. Resistance of central and peripheral airways measured by a retrograde catheter. *Appl Physiol* 1967; 22: 395–401
- [45] Brody A, Klein J, Molina PL et al. High-resolution computed tomography in young patients with cystic fibrosis: distribution of abnormalities and correlation with pulmonary function tests. *J Pediatr* 2004; 145: 32–38

- [46] Timonen KL, Randell JT, Salonen RO et al. Short-term variations in oscillatory and spirometric lung function indices among school children. *Eur Respir J* 1997; 10: 82–87
- [47] Fuchs S, Gappa M. Lung clearance index: clinical and research applications in children. *Paediatr Respir Rev* 2011; 12: 264–270
- [48] Hankinson J, Stocks J, Peslin R. Reproducibility of lung volume measurements. *Eur Respir J* 2003; 22: 972–979; 1998; 11: 787–790
- [49] Kraemer R, Blum A, Schibler A et al. Ventilation inhomogeneities in relation to standard lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 371–378
- [50] Kraemer R, Delosea N, Ballinari P et al. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1211–1220
- [51] Lum S, Stocks J, Stanojevic S et al. Age and height dependence of lung clearance index and functional residual capacity. *Eur Respir J* 2013; 41: 1371–1377
- [52] Aurora P, Kozłowska W, Stocks J. Gas mixing efficiency from birth to adulthood measured by multiple-breath washout. *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 148: 125–139
- [53] Robinson P, Latzin P, Verbanck S et al. Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single-breath tests. *Eur Respir J* 2013; 41: 507–522
- [54] Wanger J, Clausen JL, Coates A et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005; 26: 511–522
- [55] Mallol J, Aguirre V, Espinosa V. Increased oxidative stress in children with post infectious Bronchiolitis Obliterans. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2011; 39: 253–258
- [56] Madill J, Aghdassi E, Arendt BM et al. Oxidative stress and nutritional intakes in lung patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplant Proc* 2009; 41: 3838–3844
- [57] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532–1535
- [58] Cortjens B, van Woensel JBM, Bem RA. Neutrophil Extracellular Traps in Respiratory Disease: Guided anti-microbial traps or toxic webs? *Paediatr Respir Rev* 2017; 21: 54–61
- [59] Marcos V, Zhou-Suckow Z, Onder Yildirim A et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm* 2015. doi:10.1155/2015/408935
- [60] Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir Res* 2015; 16: 59
- [61] Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 2013; 4: 1