

소아 천식 환자의 호기농축시료에서 염증매개물질 측정의 의의

한윤기, 박준영, 김미나, 김윤희, 박현빈, 김민정, 이경은, 이희선, 허원일, 홍정연, 김경원, 손명현, 김규언
연세대학교 의과대학 소아과학교실 및 알레르기 연구소

Increased inflammatory mediator in exhaled breath condensate from asthmatic children

Yoon Ki Han, Jun Young Park, Mi Na Kim, Yoon Hee Kim, Hyun Bin Park, Min Jung Kim, Kyung Eun Lee, Hee Seon Lee, Won Il Heo, Jeong Yeon Hong, Kyung Won Kim, Myung Hyun Sohn, Kyu-Earn Kim

Department of Pediatrics, Severance Hospital, Institute of Allergy, Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: There has recently been increasing interest in the use of exhaled breath condensate (EBC) as a simple noninvasive means for understanding the physiology of asthma. The aim of this study was to evaluate the levels of leukotriene B₄ (LTB₄) and eosinophil cationic protein (ECP) in the EBC of asthmatic children.

Methods: We measured LTB₄ and ECP levels in EBC from children aged 6–14 years, including healthy children (n=25) and asthmatic children (n=25). We also measured serum LTB₄ and serum ECP. Pulmonary function tests and methacholine challenge tests were performed on all subjects.

Results: Exhaled LTB₄ levels were increased significantly in patients with asthma compared to normal subjects (7.1 ± 3.7 pg/mL vs. 2.2 ± 1.7 pg/mL, $P < 0.05$). Serum LTB₄ levels were not significantly different in patients with asthma compared to normal subjects (674.7 ± 484.1 pg/mL vs. 487.1 ± 272.0 pg/mL, $P = 0.156$), and no significant correlations were found between exhaled and serum LTB₄ concentrations in children with asthma ($r = 0.052$, $P = 0.758$). Exhaled ECP levels were not significantly different in patients with asthma compared to normal subjects ($P = 0.419$). Serum ECP levels were significantly increased in patients with asthma compared to normal subjects (44.37 ± 32.14 μg/L vs. 16.40 ± 13.23 μg/L, $P = 0.001$).

Conclusion: We found significantly elevated LTB₄ levels in the EBC of asthmatic children. Our results suggest that EBC may be one of the supportive tools to measure airway inflammation in children with asthma. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2014;2:332-336)

Keywords: Asthma, Exhaled breath condensate, Leukotriene B₄, Eosinophil cationic protein

서론

천식은 반복적인 천명, 호흡곤란 또는 만성 기침 등의 증상을 보이면서 만성적인 기도 폐쇄 및 기도 손상과 기도 개형을 특징으로 하는 염증성 폐질환이다.¹⁻³⁾ 이러한 천식의 병태생리에는 비만 세포와 호산구에 의해 생성되는 염증성 매개물질(leukotriene B₄ [LTB₄], leukotriene C₄ [LTC₄], leukotriene D₄ [LTD₄], leukotriene E₄ [LTE₄]), Th2 세포 관련 사이토카인(interferon-γ [IFN-γ], tumor necrosis

factor-α [TNF-α], interleukin [IL] 2, IL-4, IL-5, IL-10), 중성구 등의 다른 종류의 다양한 세포와 염증성 매개물질들이 관여한다.³⁻⁵⁾ 특히 천식 기도의 염증은 점막부종, 상피탈락, 기저막 아래의 섬유화의 과정을 거치며 이 과정에서 호산구와 T 세포의 침윤, 비만 세포 수의 증가 등이 두드러진 역할을 하는 것은 잘 알려져 있고, 천식 발작과 중증 천식에서 기도 내 중성구 또한 활성화되고 수의 증가도 관찰된다.⁵⁾

천식 가이드라인에서는 천식 증상의 빈도, 천식 악화 빈도 및 1

Correspondence to: Kyung Won Kim
Department of Pediatrics, Severance Hospital, Institute of Allergy, Brain Korea 21 Plus Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2050, Fax: +82-2-393-9118, E-mail: kwkim@yumc.yonsei.ac.kr
Received: June 5, 2014 Revised: August 30, 2014 Accepted: September 2, 2014

© 2014 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

초간노력성호기량(forced expiratory volume, FEV₁) 등의 폐기능을 근거로 중증도를 평가하고 치료 반응을 추적 관찰하도록 제시하고 있고,⁶⁾ 실제 임상에서도 많이 이용되고 있다. 그러나 천식 증상이나 폐기능이 직접적으로 만성적인 기도 염증을 반영하지 못하므로 이러한 기도 염증을 측정하는 방법들이 제시되고 있다. 이러한 방법으로는 기관지경을 이용한 기관지 생검을 통하여 직접적인 염증을 확인하는 방법, 간접적인 방법으로 폐포세척술, 유도객담 검사를 통하여 얻어진 시료를 통하여 염증을 확인하는 방법 및 호기산화질소농도(exhaled nitric oxide)를 측정하는 방법 등이 있다. 호기농축시료(exhaled breath condensate, EBC)는 기도를 감싸고 있는 에어로졸화된 액체와 휘발성 물질을 포함하고 있어 폐의 염증 활성도를 측정할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 또한 호기농축시료를 이용한 기도 염증 평가 방법은 침습적인 방법들과는 달리 어린 나이에서도 쉽게 반복적으로 측정할 수 있는 장점이 있으며 부작용도 없어 단순하고 안전한 방법이라는 장점이 있다. 이전 연구에서 성인 천식 환자에서의 호기농축시료 분석 결과 대조군보다 LTE₄, LTB₄의 수치가 높았었다.⁷⁾

LTB₄는 비만 세포, 대식 세포, 중성구, 호산구에서 생성되며 평활근의 수축에 직접적으로 관여하지는 않고 효과도 미미하지만 중성구의 강한 화학 주성 인자이고 또한 중성구의 활성도를 증가시켜 국소 부종과 점막 분비물을 증가시켜 기도를 좁게 만드는 역할을 한다.^{5,8)} LTB₄는 소아 천식 환자의 폐포 세척액에서 증가되었다는 연구는 있지만⁹⁾ 소아의 호기농축시료에서는 연구된 바 없었다. 혈청 eosinophil cationic protein (ECP)는 호산구에서 유리되는 단백질로 강한 세포 독성을 갖고 있어 기도 상피에 손상을 주며 천식의 염증 반응 시에 증가하여 중증도를 평가하는 표지자로 이용되어 왔다.¹⁰⁾ 천식 환자의 유도객담에서의 ECP 증가에 대한 연구는 있었지만^{11,12)} 소아의 호기농축시료에서는 연구된 바 없었다.

본 연구에서는 소아 천식 환자에서 호기농축시료를 이용하여 간접적으로 기도 염증을 평가할 수 있는 LTB₄와 ECP를 측정하여 대조군과 비교해 봄으로써 호기농축시료 측정의 임상적인 의의와 유용성에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

세브란스병원 소아청소년과에 내원한 만 6세에서 14세 사이의 50명 환아를 대상으로 하였다. 천식군은 기침, 천명, 호흡곤란 등 천식이 의심되어 내원하여 천식으로 처음 진단받은 25명을 대상으로 하였고, 이들은 최근 4주 이내에 전신 스테로이드, 흡입 스테로이드 또는 류코트리엔 조절제 등의 약물 치료력이 없음을 확인하였다. 천식의 진단은 미국흉부학회(American Thoracic Society) 지침에 따라 최근 12개월 동안 감기와 동반되지 않은 기침이나 천명, 호흡

곤란 등의 전형적인 증상을 보이면서 메타콜린 기관지유발검사에서 1초간노력성호기량이 20% 감소되는 농도(provocation concentration causing a 20% fall in FEV₁)가 16 mg/mL 미만 또는 기관지 확장제 투여 후 1초간노력성호기량이 투여 전보다 12% 이상 증가를 보인 경우로 정의하였다.¹²⁾ 정상 대조군은 정기적인 신체검진이나 예방접종을 위하여 내원한 환아 중 췌장염이나 반복적, 만성적 염증질환이 없는 환아를 선별하였고 이들은 적어도 최근 2주간 호흡기 감염의 병력이 없었다. 전체 대상군에서 호기농축시료가 수집되었고, 폐기능검사 및 메타콜린 기관지유발검사를 시행하였으며, 말초혈액 호산구 수 및 혈청 총 IgE가 측정되었다. 전체 대상자 중 38명에서 혈청 LTB₄를 측정하였고, 42명에서 혈청 ECP를 측정하였다. 본 연구는 대상아들의 보호자들에게 연구의 목적과 방법을 설명하고 동의서를 받은 후 시행되었다.

2. 연구 방법

1) 호기농축시료의 수집

호기농축시료는 일회용 collection kit (RTube, Respiratory Research, Charlottesville, VA, USA)를 사용하였다. RTube는 polypropylene으로 만들어진 수집관으로 호기농축시료 수집 전에 -20°C로 냉각시킨 알루미늄 관으로 덮게 되며, one-way valve를 통해 흡입구와 연결되어 있다. 이 흡입구를 통해 냉각된 수집관 안으로 10분간 평상 호흡을 하였을 때 얻어지는 응결된 검체를 수집하며, 수집된 호기 호흡 응축액은 분석 전까지 -80°C에 즉시 저장하였다.¹³⁾

2) 혈청 총 IgE 측정, 호기농축시료 및 혈청 내 ECP 측정, 말초혈액 호산구 수의 측정

혈청 총 IgE와 호기농축시료 및 혈청 내 ECP는 형광효소면역분석법(AutoCAP system, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden)에 의해 시행하였다. 말초혈액 호산구 수는 NE-8000 system (Sysmex, Kobe, Japan)을 이용하여 계수하였다.

3) 호기농축시료 및 혈청 LTB₄ 농도

호기농축시료 및 혈청 LTB₄ 농도는 상품화된 human LTB₄ ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다. Horseradish peroxidase-labeled LTB₄ antibody가 코팅된 microtitration well에서 EBC와 혈청을 1시간 동안 incubation하였다. 50 μL의 LTB₄ conjugate solution (R&D systems)을 첨가하고 incubation 후에 wash buffer (R&D systems)로 4회 세척한 후, 200 μL의 substrate solution (R&D systems)을 첨가하고 다시 incubation하였다. 50 μL의 stopping solution (0.2M sulfuric acid)을 첨가하여 반응을 종결시키고 30분 안에 microplate reader (VersaMax, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA)로 optical density 450 nm를 측정하였다.

4) 폐기능검사 및 메타콜린 기관지유발검사

폐기능검사는 Jaeger MasterScreen PFT (Jaeger, Wurzburg, Germany)을 이용하여 미국흉부학회 지침에 따라 기관지 확장제를 투여 전후로 측정하여 유량-용적 곡선을 얻었고, 메타콜린(Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 흡입 유발시험은 표준화 방법으로 시행하였다.^{13,14)}

5) 통계 분석

자료의 분석은 IBM SPSS Statistics ver. 20.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하였다. 천식군과 대조군 간 임상적 지표들의 평균 및 표준편차를 구하였고 독립표본 *t*-검정(independent *t*-test)으로 통계적 유의성을 조사하였다. 정규성을 보이지 않는 변수(호기농축시료와 혈청 내의 LTB₄, 호기농축시료와 혈청 내의 ECP)는 상용 로그 값으로 변환 후에 분석을 시행하였다. 호기농축시료 내의 LTB₄와 혈청 내의 LTB₄의 연관성 분석에는 천식군과 대조군을 포함한 전체 50명의 환아를 대상으로 Spearman correlation을 이용하였다. *P*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특성

천식군과 대조군에서 남녀비와 나이는 유의한 차이를 보이지 않았다. 혈액 내 호산구 수(*P* = 0.262)와 혈청 총 IgE (*P* = 0.060)는 유의한 차이를 보이지 않았다. 폐기능검사상 1초간노력성호기량의 노력성폐활량에 대한 비율(FEV₁/forced vital capacity) (*P* = 0.045)만이 천식군에서 대조군보다 유의하게 낮았다. 1초간노력성호기량 (*P* = 0.052), 노력성호기중간 유량(forced mid expiratory flow) (*P* = 0.092)은 모두 천식군과 대조군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2. 천식군과 대조군에서 호기농축시료 내 LTB₄와 혈청 내 LTB₄의 비교

호기농축시료 내 LTB₄는 천식군(mean ± SD, 7.1 ± 3.7 pg/mL)에서 대조군(2.2 ± 1.7 pg/mL)에 비해 의미 있게 높았다(*P* = 0.03) (Fig. 1A). 혈청 내 LTB₄는 천식군(674.7 ± 484.1 pg/mL)과 대조군(487.1 ± 272.0 pg/mL)이 유의한 차이를 보이지 않았다(*P* = 0.156) (Fig. 1B).

3. 혈청 내 LTB₄와 호기농축시료 내 LTB₄와의 관계

혈청 내 LTB₄는 호기농축시료 내 LTB₄와 유의한 상관관계를 보이지 않았다(*r* = 0.052, *P* = 0.758) (Fig. 2).

4. 천식군과 대조군에서 호기농축시료 내 ECP와 혈청 내 ECP의 비교

호기농축시료 내 ECP는 천식군과 대조군이 유의한 차이를 보이지 않았다(*P* = 0.419) (Fig. 3A). 혈청 내 ECP는 천식군(mean ± SD, 44.37 ± 32.14 µg/L)에서 대조군(16.40 ± 13.23 µg/L)에 비해 의미

Table 1. Clinical characteristics (n=50)

Characteristic	Asthma (n=25)	Control (n=25)	<i>P</i> -value
Age (yr)	9.3±2.0	9.7±2.4	0.527
Male sex	15 (60)	16 (64)	
Eosinophil count (/µL)	462.61 ± 305.69	359.57 ± 308.83	0.262
Serum total IgE (U/mL)	760.15 ± 859.25	344.11 ± 544.12	0.060
FEV ₁ (% of predicted value)	94.51 ± 16.42	98.06 ± 8.84	0.052
FEV ₁ /FVC	83.99 ± 9.41	88.67 ± 6.40	0.045
FEF _{25%-75%} (% of predicted value)	74.58 ± 27.83	87.15 ± 20.96	0.092

Values are presented as mean ± standard deviation or number (%). FEV₁, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; FEF_{25%-75%}, forced mid expiratory flow.

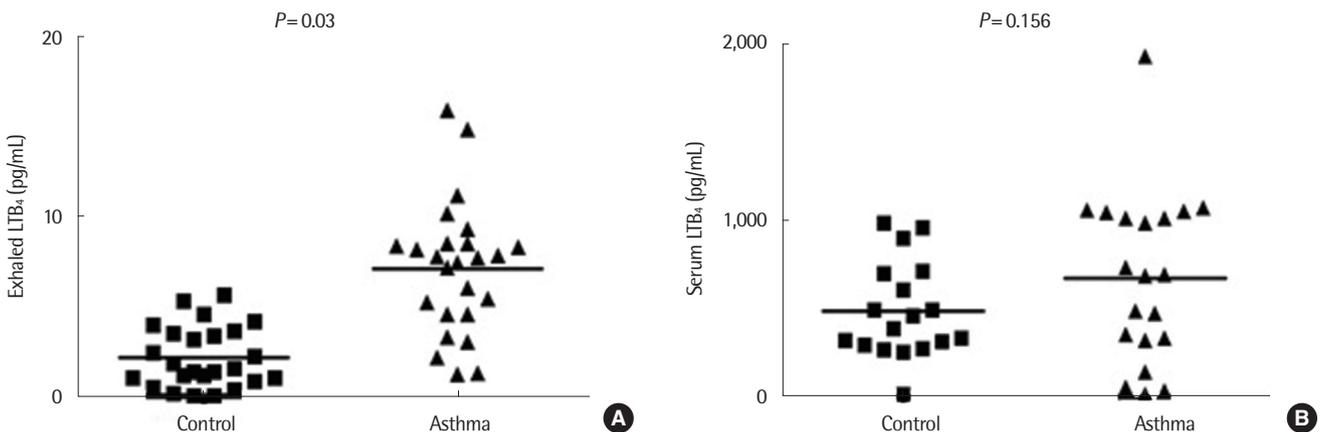


Fig. 1. (A) Comparison of concentrations of leukotriene B₄ (LTB₄) in exhaled breath condensate between asthma and control groups. LTB₄ in asthma group (mean ± standard deviation [SD], 7.1 ± 3.7 pg/mL) was significantly higher than control group (mean ± SD, 2.2 ± 1.7 pg/mL) (*P* = 0.03). (B) Comparison of concentrations of serum LTB₄ between asthma and control groups. There was no significant difference between two groups (*P* = 0.156).

있게 높았다($P=0.001$) (Fig. 3B).

고 찰

본 연구에서는 호기농축시료의 LTB_4 농도는 천식군에서 대조군에 비해 유의하게 증가됨을 확인하였다. 그러나 혈청 LTB_4 는 천식군과 대조군 사이에 차이가 없었고, 호기농축시료의 LTB_4 농도와 상관관계를 보이지 않았다. 반면 ECP는 혈청에서는 천식군에서 의미 있는 증가를 보였으나 호기농축시료에서는 두 군 사이에 차이가 없었다.

호기농축시료는 휴대용 RTube를 이용하여 간편하게 수집가능하며 기도 염증을 반영할 것이라고 기대 되었기 때문에 leukotrienes, 8-isoprostane, prostaglandins, hydrogen peroxide, nitric ox-

ide-derived products, hydrogen ions, 여러 사이토카인의 측정이 시도되었으나 표준화에 어려움이 있었다. 현재 호기농축시료 pH만이 임상적인 의미를 부분적으로 인정받고 있는데 이는 호기농축시료에서 수집되는 단백질의 양이 적고 개인 차가 많아 여러 가지 염증매개물질, 특히 비휘발성 물질들의 측정이 잘 안되거나 표준화가 어렵기 때문이다.¹⁴⁾

반면에 혈청에서의 LTB_4 는 천식군과 대조군에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이전 연구에서도 혈액 응고가 혈청 LTB_4 에 영향을 미쳐 천식 환자의 염증 평가 방법으로는 적절치 않음을 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 또한 그 수집 방법에 있어서 수집 즉시 $-80^{\circ}C$ 에 저장을 해야 염증매개물질의 정확한 측정이 가능하지만 임상에서 검사 직후 시행하기 어려운 점이 있다.¹³⁾ 그러나 본 연구에서는 호기농축시료 LTB_4 는 천식군에서 대조군에 비해 의미 있게 증가 되어 있었음을 확인하였고, 이는 천식 환자의 기관지 생검, 기관지 폐포 세척액, 유도 객담에서 LTB_4 가 증가한다는 이전 연구와 상응하는 결과였다.⁷⁾ 반면에 혈청에서의 LTB_4 는 천식군과 대조군에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았고 호기농축시료 LTB_4 와 혈청 LTB_4 사이에도 관련성을 보이지 않았다. 이는 혈액 응고가 혈청 LTB_4 에 영향을 주어 혈청에서는 정확한 농도를 측정하기 어렵기 때문이며 혈청 LTB_4 는 천식 환자의 염증 평가 방법으로는 적절치 않음을 뒷받침한다.¹⁶⁾

ECP는 활성화된 호산구의 과립에서 분비되는 단백질의 한 종류로 호산구의 활성도를 간접적으로 측정할 수 있는 생물학적 지표이며 염증성 매개물질로서 천식의 후기 반응에 중요한 역할을 한다.¹⁷⁾ 혈청 ECP는 알레르기질환과 천식에서 진단과 치료 효과를 평가하고 질병의 악화를 예측하는 데 임상적으로 유용하게 사용되고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 특히 아토피성 천식에서 더 높게 측정되며 천식의 정도가 심할수록 높게 측정 된다는 보고도 있다.²⁰⁾ 본 연구에서도 천식군에서 대조군보다 혈청 ECP 농도가 유의하게 높아 이전 보고와 같은 결과가 나왔으나 호기농축시료의 ECP 농도는 천식군과 대조군에서 유의

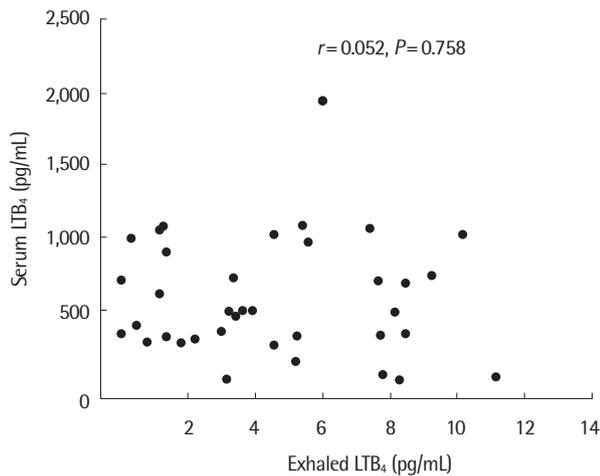


Fig. 2. Correlations between the concentrations of leukotriene B_4 (LTB_4) in exhaled breath condensate (EBC) and in serum. No significant correlations were shown between concentrations of LTB_4 in EBC and in serum ($r=0.052$, $P=0.758$).

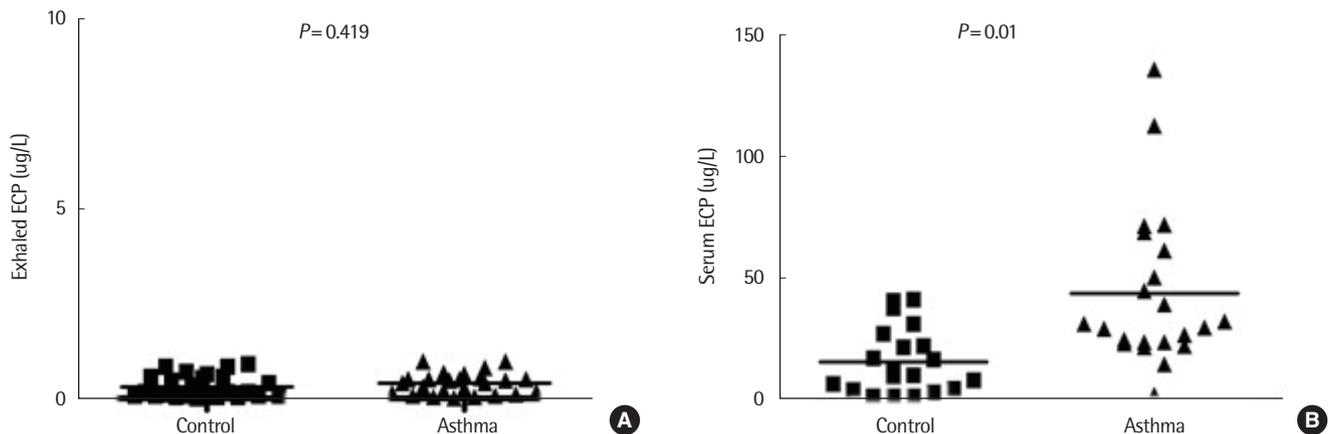


Fig. 3. (A) Comparison of concentrations of eosinophil cationic protein (ECP) in exhaled breath condensate (EBC) between asthma and control groups. There was no significant difference between two groups ($P=0.419$). (B) Comparison of concentrations of serum ECP between asthma and control groups. Serum concentration of ECP in asthma group (mean \pm standard deviation [SD], $44.37 \pm 32.14 \mu g/L$) was significantly higher than control group (mean \pm SD, $16.40 \pm 13.23 \mu g/L$) ($P=0.01$).

한 차이를 보이지 않았다. 천식 환자의 기관지 폐포 세척액이나,²¹⁾ 유도 객담에서는 ECP 수치가 증가하는 데 반해,¹⁴⁾ 호기농축시료 ECP 농도는 거의 측정되지 않았다. 아주 작은 양의 비휘발성 물질을 포함하는 호기농축시료에서 ECP 농도를 측정하는 것은 천식 환자의 기도 염증을 측정하는 방법으로 유용하지 않은 것으로 사료된다.

본 연구는 대상 환자 수가 50명인 선행연구로 임상적인 유용성에 대하여 결론 짓기 어렵다. 좀 더 많은 환자를 대상으로 기도 염증을 반영하는 호기산화질소 농도나 유도 객담 검사 등과의 비교 분석이 필요하다. 또한 본 연구에 모집된 천식 환자들은 모두 유지치료를 하지 않은 상태로 내원한 경증 또는 중등증 천식 환자로 천식의 중증도에 따른 LTB₄ 농도를 분석하기에 어려움이 있었다. 이전 연구에서 호기농축시료 lipoxin A₄ (LXA₄)는 천식의 중증도가 심해짐에 따라 LXA₄ 수치가 낮아진다고 보고되어²²⁾ 중증도에 따라 LTB₄ 농도에도 변화가 있을 가능성이 있다. 추후 호기농축시료 LTB₄ 농도에 대한 중증도, 치료 후 추적 관찰에 따른 변화 등에 대한 연구가 필요하다.

결론적으로, 호기농축시료에서 측정된 LTB₄ 농도가 소아 천식 환자에서 증가되어 있음을 확인하였고 이는 간편하게 수집 가능한 호기농축시료에서 LTB₄가 기도 염증을 반영하는 보조적인 표지자로서의 가능성을 보인 선행연구로 의미가 있다.

REFERENCES

1. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:28-34.
2. Rosias PB, Dompeling E, Dentener MA, Pennings HJ, Hendriks HJ, Van Iersel MP, et al. Childhood asthma: exhaled markers of airway inflammation, asthma control score, and lung function tests. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:107-14.
3. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Li CY, Yung E, Lam CW, et al. Analysis of growth factors and inflammatory cytokines in exhaled breath condensate from asthmatic children. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137:66-72.
4. Zanconato S, Carraro S, Corradi M, Alinovi R, Pasquale MF, Piacentini G, et al. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113: 257-63.
5. 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;166:1345-9.
6. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Leman-ske R, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy*

- 2012;67:976-97.
7. Montuschi P, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:615-20.
8. Kostikas K, Gaga M, Papatheodorou G, Karamanis T, Orphanidou D, Loukides S. Leukotriene B₄ in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest* 2005;127:1553-9.
9. Krawiec ME, Westcott JY, Chu HW, Balzar S, Trudeau JB, Schwartz LB, et al. Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1338-43.
10. Tomassini M, Magrini L, De Petrillo G, Adriani E, Bonini S, Balsano F, et al. Serum levels of eosinophil cationic protein in allergic diseases and natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1350-5.
11. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Pavia T, Bartoli ML, Cardini C, et al. Are sputum eosinophil cationic protein and eosinophils differently associated with clinical and functional findings of asthma? *Clin Exp Allergy* 2014; 44:673-80.
12. Kim KW, Jee HM, Park YH, Choi BS, Sohn MH, Kim KE. Relationship between amphiregulin and airway inflammation in children with asthma and eosinophilic bronchitis. *Chest* 2009;136:805-10.
13. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. *Ther Adv Respir Dis* 2007;1:5-23.
14. Scheideler L, Manke HG, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev Respir Dis* 1993;148:778-84.
15. Fujimoto K, Kubo K, Matsuzawa Y, Sekiguchi M. Eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma. *Chest* 1997;112:1241-7.
16. Seggev JS, Wiessner JH, Thornton WH Jr, Edes TE. Comparison of serum and plasma leukotriene B₄ levels in normal and asthmatic subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75:365-8.
17. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986;39:177-253.
18. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawaczzyk M, Peterson C, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1172-86.
19. Koh GC, Shek LP, Goh DY, Van Bever H, Koh DS. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med* 2007; 101:696-705.
20. Wolthers OD. Eosinophil granule proteins in the assessment of airway inflammation in pediatric bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:248-54.
21. Kim KW, Lee KE, Kim ES, Song TW, Sohn MH, Kim KE. Serum eosinophil-derived neurotoxin (EDN) in diagnosis and evaluation of severity and bronchial hyperresponsiveness in childhood asthma. *Lung* 2007; 185:97-103.
22. Kazani S, Planaguma A, Ono E, Bonini M, Zahid M, Marigowda G, et al. Exhaled breath condensate eicosanoid levels associate with asthma and its severity. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:547-53.