



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Medicina dello Sviluppo e Scienze
della Programmazione

INDIRIZZO: Malattie Rare

CICLO: XXI

“Valutazione longitudinale della funzionalità respiratoria e dei marcatori di flogosi e stress ossidativo delle vie aeree in una coorte di bambini con displasia broncopolmonare”

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore :Ch.mo Prof. Eugenio Baraldi

Dottorando : Dott.ssa Gea Bonetto

RIASSUNTO

Premesse: La broncodisplasia è stata descritta per la prima volta a metà degli anni '60 come complicanza della ventilazione meccanica e della ossigenoterapia ad elevate concentrazioni in bambini nati prematuri. Da allora è divenuta la causa più frequente di malattia respiratoria cronica nei bambini. I miglioramenti nell'assistenza perinatale non hanno portato infatti ad una significativa riduzione dell'incidenza di tale patologia sebbene la sopravvivenza di neonati ad età gestazionali sempre più basse abbia modificato il quadro epidemiologico della BPD che colpisce oggi soprattutto neonati più immaturi e di peso estremamente basso (<1000 grammi). La displasia broncopolmonare si associa a significativa morbidità respiratoria nei primi anni di vita, che va tuttavia riducendosi nel tempo. Le anomalie funzionali tendono invece a persistere più a lungo, fino alle soglie dell'età adulta. Soggetti nati prematuri che non hanno sviluppato displasia broncopolmonare possono avere manifestazioni cliniche e funzionali analoghe, seppur spesso di minore gravità. Non è noto se le alterazioni funzionali dei soggetti nati prematuramente possano presentare un fattore di aumentato rischio per lo sviluppo di broncopneumopatia cronica ostruttiva in età adulta e non sono stati identificati con chiarezza i meccanismi fisiopatologici sottesi alle alterazioni funzionali; in particolare non è noto se esse rappresentino unicamente una sequela dell'insulto iniziale con incompleta maturazione polmonare ed inefficace riparazione del danno, o se vi siano ancora processi infiammatori attivi. Recentemente sono state sviluppate nuove tecniche per l'analisi non invasiva della flogosi polmonare, come la valutazione dell'ossido nitrico esalato (FE_{NO}) e l'analisi del condensato dell'aria espirata (EBC). Esse risultano particolarmente preziose per gli studi di follow-up nei bambini in cui l'età dei pazienti e la necessità di misure ripetute rendono inaccettabili le metodiche invasive come la broncoscopia. I

bambini con pregressa broncodisplasia, ad esempio, presentano manifestazioni cliniche simili ai pazienti asmatici, ma i valori ridotti di ossido nitrico esalato, marcatore di flogosi eosinofila, lasciano supporre l'implicazione di diversi meccanismi fisiopatologici. A nostra conoscenza non sono ancora stati eseguiti studi sui marcatori dosabili nel condensato dell'aria espirata in pazienti nati prematuri.

L'approfondimento delle premesse dello studio è svolto nella revisione:

La displasia broncopulmonare dall'infanzia all'età adulta: decorso clinico e funzionalità respiratoria. (Prospettive in Pediatria 2009;39:109-114)

Scopo: La ricerca si propone di esaminare la prognosi funzionale a medio-lungo termine in un gruppo di pazienti con broncodisplasia. Si propone inoltre di analizzare i marcatori di infiammazione e di stress ossidativo nell'aria esalata. I risultati verranno confrontati con quelli di un gruppo di pazienti con prematurità senza broncodisplasia e con un gruppo di controlli sani nati a termine.

Risultati e conclusioni sono riportati in due elaborati:

-Childhood course of lung function in survivors of bronchopulmonary displasia .(JAMA 2009;302:1418-1420): Un' ostruzione grave delle vie aeree a 2 anni di vita (espressa come VmaxFRC) sembra identificare i pazienti con diagnosi di broncodisplasia a maggior rischio di alterazione della crescita polmonare e mancato recupero funzionale con peggior prognosi respiratoria a distanza. I pazienti con minor compromissione dei flussi a 2 anni mostrano invece un miglioramento della funzionalità negli anni, suggerendo la possibilità di un recupero funzionale. Dai dati acquisiti emerge inoltre che anche la prematurità in sé possa avere ripercussioni a distanza sulla funzionalità polmonare, sebbene usualmente di entità minore rispetto alla prematurità associata a broncodisplasia.

-Preterm birth is associated with flow limitation and increased exhaled 8-isoprostane levels in adolescence: Adolescenti nati pretermine mostrano alterazioni della funzionalità respiratoria e tali alterazioni sono più spiccate nei pazienti con diagnosi di broncodisplasia. L'8-isoprostano, marcatore di stress ossidativo è risultato aumentato di circa tre volte nel condensato dell'aria espirata dei soggetti con anamnesi di prematurità, con e senza broncodisplasia, rispetto ai soggetti sani. E' questo il primo studio della letteratura che riporta dei dati che suggeriscono la possibile presenza di un'inflammatione attiva delle vie aeree in pazienti nati prematuri. Tali risultati lasciano supporre che le alterazioni funzionali descritte con limitazione al flusso delle vie aeree possano essere espressione non solo degli esiti del danno iniziale, ma anche di un aumentato stress ossidativo persistente nel tempo e aprono la possibilità allo studio di nuove terapie.

SUMMARY

Background: Bronchopulmonary dysplasia (BPD) was described for the first time in 1967 in preterm children who had been exposed to mechanical ventilation and high-concentration oxygen therapy. Since then BPD has become the first cause of chronic lung disease in children. The improvement realized in the preterm intensive care did not lead to a reduction in incidence of BPD; the increased survival of very low gestational age preterm has produced instead a deep change in the epidemiology of bronchopulmonary dysplasia, which now develops mainly in extremely-low birth weight infants (<1000 g). BPD causes high respiratory morbidity during the first years of life, but afterwards intensity and frequency of symptoms decrease. Lung function abnormalities, however, persist until adolescence. Preterm newborns without bronchopulmonary dysplasia may have similar clinical and functional manifestations, though usually less severe, to those

of BPD patients. It is unknown whether respiratory function anomalies of patients with history of preterm delivery may represent a prognostic factor for chronic obstructive pulmonary disease with aging.

The mechanisms behind the residual lung function impairment are unknown, and it is unclear if they represent only a sequela of the initial damage with incomplete maturation of the lung and unsuccessful recovery of the injury, or there are still active inflammatory processes ongoing. Recent advances in respiratory medicine have developed non invasive techniques to assess the biochemistry of the deep lung, such as exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate analysis. These techniques are especially appealing for follow-up studies in children, in which the young age of the patients and the multiple measurements make invasive test unsuitable. In particular BPD survivors often behave like children with asthma, but the low exhaled nitric oxide (FE_{NO}), marker of eosinophilic inflammation, reported in these patients suggest that distinct pathological pathways are involved.

To our knowledge this is the first study reporting of EBC compounds of patients with a history of preterm delivery.

A review of the literature has been made in:

La displasia broncopolmonare dall'infanzia all'età adulta: decorso clinico e funzionalità respiratoria. (Prospettive in Pediatria 2009;39:109-114)

Aim: Aim of the project is to evaluate mid-long term respiratory prognosis in a group of patients with bronchopulmonary dysplasia. Beside the pulmonary function we will also analyse exhaled inflammatory and oxidative stress markers in order to investigate possible damage pathways. Results will be compared with two control groups: healthy subjects and preterm children without history of BPD.

Results and conclusion: are discussed in two articles

-Childhood course of lung function in survivors of bronchopulmonary displasia.(JAMA 2009;302:1418-1420): Severe early airflow obstruction at 2 years identified survivors of BPD at greater risk of disrupted lung growth during their childhood, suggesting a guarded long-term respiratory prognosis. Patients with better airflow at 2 years showed an improvement in lung function in later childhood, suggesting some degree of functional recovery. In addition, our findings suggest that preterm delivery without BPD may also affect long-term lung function, although to a lesser extent than in patients with BPD.

-Preterm birth is associated with flow limitation and increased exhaled 8-isoprostane levels in adolescence: Adolescents with a history of prematurity has a pulmonary function derangement, more severe in BPD survivors. Exhaled 8-isoprostane, marker of oxidative stress, is increased about threefold in EBC of children born preterm, with or without BPD compared to healthy children. To our knowledge this is the first study reporting increased levels of markers of lung inflammation in patients delivered preterm. These data suggest that the lung function impairment may represent not only a sequela of the initial damage with unsuccessful recovery and that an increased lung oxidative stress is still ongoing in adolescence. Further study are necessary to determine a potential role for antioxidant therapy in these patients.

PREMESSE

La displasia broncopolmonare (BPD) è la principale sequela respiratoria della prematurità e la più frequente causa di malattia polmonare cronica dell'infanzia (1). Il termine broncodisplasia comparve per la prima volta sul New England Journal of Medicine nel 1967, coniato da Northway e coll. per descrivere una nuova patologia respiratoria che colpiva neonati prematuri affetti da sindrome da distress respiratorio, sottoposti a ventilazione meccanica ed ossigenoterapia ad elevate concentrazioni. Tale condizione veniva definita clinicamente come persistenza di ossigenodipendenza a 28 giorni di vita, associata a sintomi respiratori e ad anomalie radiografiche, quale conseguenza di tre elementi patogenetici principali: immaturità polmonare, insulto creato dall'ossigenoterapia e dalla ventilazione meccanica, inadeguatezza dei fenomeni riparativi (2).

Negli anni più recenti, nonostante il diffondersi di misure atte a prevenire il distress respiratorio (steroidi prenatali, terapia sostitutiva con surfattante) e lo sviluppo di tecniche di ventilazione meno aggressive, l'incidenza della broncodisplasia non è tuttavia diminuita, data la sopravvivenza di neonati di età gestazionale e peso neonatale progressivamente inferiore (3-5).

In funzione del tipo, durata, tempo di esposizione all'insulto possono esserci diversi quadri di danno polmonare. La BPD può essere infatti caratterizzata principalmente da fenomeni espressione di danno polmonare acuto quali infiammazione, fibrosi, alternanza di aree atelettasiche e cistiche, a cui si vanno invece sostituendo, negli anni più recenti, nelle forme presentate dai bambini ventilati meno aggressivamente, ma di età gestazionale più bassa, interruzione dei normali processi di alveolarizzazione con riduzione del numero ed aumento delle dimensioni degli spazi alveolari associata a disorganizzazione del letto vascolare polmonare (1,3,6).

Nel primo anno di vita i bambini nati prematuramente hanno un aumentato rischio di wheezing ricorrente e di ospedalizzazione in corso di infezione ed il sottogruppo dei bambini con BPD è particolarmente esposto a ricadute più frequenti e gravi, in considerazione della compromissione di base della funzionalità respiratoria (7). Anche durante l'età prescolare e scolare l'incidenza di wheezing e tosse ricorrente è maggiore nei bambini nati prematuramente, in particolare in quelli con BPD (8,9). In età scolare la maggior parte dei bambini conduce una vita senza limitazioni, sebbene sia segnalata un'incidenza maggiore di tosse, respiro sibilante, iperreattività bronchiale ed un uso aumentato, rispetto alla popolazione generale, di farmaci "antiasmatici" (6). Nel tempo la sintomatologia respiratoria si attenua, la correlazione tra compromissione funzionale e sintomi diviene meno evidente e anche soggetti con marcata ostruzione delle vie aeree possono risultare asintomatici (10).

I bambini con BPD presentano fin dai primi giorni di vita alterazioni della meccanica respiratoria con riduzione della compliance, aumento delle resistenze polmonari ed ostruzione al flusso delle vie aeree. La compliance e la resistenza vanno incontro ad un significativo miglioramento nei primi due anni di vita, raggiungendo valori prossimi alla normalità. L'ostruzione al flusso delle vie aeree, invece, rilevata nel bambino non collaborante con manovre di espirazione forzata assimilabili alla spirometria, ed il cui indice principale è costituito dal flusso massimo in corrispondenza della capacità funzionale residua ($V_{max} FRC$), si mantiene francamente ridotto nei primi anni di vita e rimane tale fino all'adolescenza. L'entità dell'ostruzione è risultata inoltre essere predittiva del grado di ostruzione negli anni successivi; in un piccolo gruppo di soggetti si è dimostrata infatti una correlazione tra $V_{max}FRC$ a 2 anni e FEV_1 a 8 anni, come ad indicare un rimodellamento precoce ed irreversibile delle vie aeree (11,12).

Durante l'età scolare e l'adolescenza i bambini con BPD presentano infatti parametri spirometrici significativamente inferiori ai soggetti sani nati a termine. Soggetti nati prematuri che non hanno sviluppato BPD possono avere manifestazioni cliniche e funzionali simili ai soggetti con BPD, con valori spirometrici spesso intermedi tra quelli dei bambini con BPD e quelli dei controlli normali nati a termine (6,7,13).

La storia naturale della funzionalità respiratoria, espressa come andamento dei valori di FEV₁, ne prevede un aumento progressivo fino a raggiungere i valori massimi all'inizio dell'età adulta, per rimanere poi stabile per alcuni anni e cominciare quindi a declinare lentamente (circa 30 ml/anno) senza mai raggiungere la soglia legata alla comparsa di sintomatologia. Il declino può essere tuttavia molto più rapido, come accade nei soggetti suscettibili esposti al fumo di sigaretta, predisponendo allo sviluppo di broncopneumoptaia cronica ostruttiva (BPCO) in età adulta. I soggetti con BPD presentano all'inizio dell'età adulta valori di FEV₁ ridotti e non è noto inoltre se in questo gruppo il decadimento funzionale presenti la stessa velocità che nel soggetto sano, poiché mancano studi longitudinali prospettici di lunga durata.

Pur essendovi quindi un numero limitato di studi sulla prognosi funzionale a distanza, che solo una minoranza di essi sia costituita da valutazioni longitudinali e i dati vadano perciò interpretati con cautela, le evidenze disponibili mostrano un recupero funzionale incompleto e lasciano supporre per questi pazienti un rischio aumentato di sviluppare la BPCO.

E' noto che l'infiammazione bronchiale è uno dei maggiori determinanti della patogenesi della broncodispalsia nelle prime fasi, inibendo i processi di alveolarizzazione e la normale vascolarizzazione, riducendo le capacità riparative e contribuendo all'evoluzione in fibrosi. Vi sono però solo descrizioni isolate

sull'istopatologia polmonare di pazienti broncodisplasici dopo i primi mesi di vita e sono disponibili solo dati sporadici sui meccanismi fisiopatologici che sottendono le alterazioni funzionali persistenti; in particolare non è noto se esse rappresentino unicamente una sequela dell'insulto iniziale con incompleta maturazione polmonare ed inefficace riparazione del danno, o se vi possano essere ancora processi infiammatori attivi. La comprensione di tali meccanismi potrebbe avere importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche per i pazienti con pregressa broncodisplasia, che presentando manifestazioni cliniche simili ai pazienti asmatici, vengono trattati spesso come pazienti asmatici seppur l'assenza di marcatori di flogosi eosinofila, lasci supporre diversi meccanismi fisiopatologici.

Negli ultimi anni sono state sviluppate metodiche non invasive, come l'analisi dell'ossido nitrico nell'aria espirata (FE_{NO}) e del condensato dell'aria esalata (EBC) per lo studio della patogenesi delle malattie respiratorie che possono trovare un'interessante applicazione anche nella BPD. Esse risultano inoltre particolarmente preziose per gli studi di follow-up nei bambini in cui l'età dei pazienti e la necessità di misure ripetute rendono inaccettabili i test invasivi.

Il condensato dell'aria espirata è un fluido ottenuto raffreddando l'aria esalata durante la respirazione a volume corrente, costituito essenzialmente da vapore acqueo, ma anche da elementi non cellulari espirati sotto forma di bio-aerosol composti di minuscole gocce formate durante il passaggio dell'aria sul fluido di rivestimento broncoalveolare. Si ritiene che il condensato rifletta la composizione del fluido che riveste la mucosa respiratoria, sia degli alveoli che delle vie aeree in una proporzione che resta tuttavia ancora da definirsi. La raccolta del condensato dell'aria espirata è una metodica assolutamente non-invasiva, sicura anche in fase di compromissione della funzionalità respiratoria. Una task force congiunta dell'European Respiratory Society e dell'American Thoracic Society ha steso delle

linee guida per la standardizzazione della metodica. La tecnica consiste sostanzialmente nel far respirare il bambino a volume corrente per 10-15 minuti in una camera di condensazione, nella quale si raccolgono in genere 1-2 ml di condensato (14). Nell'EBC è dosabile un ampio spettro di sostanze biologicamente attive, rilevanti per la comprensione dei meccanismi alla base delle malattie respiratorie. Tra queste vi sono gli isoprostani, una famiglia di eicosanoidi, validi indicatori di stress ossidativo, prodotti dall'ossidazione non enzimatica dei fosfolipidi tessutali (15).

L'ossido nitrico (NO) è sintetizzato a partire dall'amminoacido essenziale L-arginina in una reazione catalizzata dall'NO sintetasi (NOS). Tale enzima esiste in tre diverse isoforme: le prime due sono espresse costitutivamente ed indicate come cNOS, una terza (iNOS) viene indotta da citochine infiammatorie. L'NO è una molecola ubiquitaria nel corpo umano, segnale di molti processi fisiologici. Nel tratto respiratorio è normalmente sintetizzato in tutti i distretti, anche se i valori relativi alle vie aeree superiori sono centinaia di volte maggiori rispetto a quelli del tratto inferiore. Tale molecola è dosabile nell'aria esalata con una metodica standardizzata secondo linee guida fornite congiuntamente dall' American Thoracic Society e dall' European Respiratory Society e sono disponibili valori di riferimento per l'età pediatrica. Il FE_{NO} è un marcatore validato di flogosi eosinofila, viene impiegato nel monitoraggio dell'infiammazione bronchiale del paziente asmatico e predice la risposta alla terapia steroidea (16).

BIBLIOGRAFIA

1 Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R et al. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:356-396.

- 2 Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Eng J Med* 1967; 276:357-368.
- 3 Abman SH, Davis JM. Bronchopulmonary dysplasia. In: Chernick V, Boat TF, Wilmott RW, et al. (eds). *Disorders of the respiratory tract in children*. 7th ed. Saunders/Elsevier 2006, pp342-358.
- 4 Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V et al. European Consensus Guidelines on the management of neonatal distress respiratory syndrome. *J Perinat Med* 2007;35:175-186.
- 5 Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 2006;367:1421-1431
- 6 Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* 2007;357:1946-1955.
- 7 Vrijlandt EJ, Boezen HM, Gerritsen J et al. Respiratory health in prematurely born preschool children with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2007;150:256-261.
- 8 Greenough A, Giffin FJ, Yuksel B. Respiratory morbidity in preschool children born prematurely: relationship to adverse neonatal events. *Acta Paediatr* 1996;85:772-777.
- 9 Hakulinen AL, Heinonen K, Lansimies E, et al. Pulmonary function and respiratory morbidity in school age children born prematurely and ventilated for neonatal respiratory insufficiency. *Pediatr Pulmonol* 1990;8:226-232.
- 10 Northway WH Jr, Moss RB, Carlisle KB, et al. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Eng J Med* 1990;323:1793-1799.
- 11 Baraldi E, Filippone M, Trevisanuto D, et al. Pulmonary function until two years of life in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:149-155.
- 12 Filippone M, Sartor M, Zacchello F, et al. Flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia and respiratory function at school age. *Lancet* 2003;361:753-754.
- 13 Baraldi E, Bonetto G, Zacchello F, et al. Low exhaled nitric oxide in school-age children with bronchopulmonary dysplasia and airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:68-72.

- 14 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ on behalf of ATS/ERS task force on exhaled breath condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respr J* 2005;26:523-548.
- 15 Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1067-1082.
- 16 Baraldi E, Carraro S. Exhaled NO and breath condensate. *Paediatr Respir Rev* 2006;7:S196-198

SCOPI DELLA TESI

- Esaminare la prognosi respiratoria funzionale a medio-lungo termine in un gruppo di soggetti nati prematuramente con e senza storia di broncodisplasia.
- Indagare alcuni aspetti della fisiopatologia polmonare di questi pazienti analizzando i marcatori di flogosi e stress ossidativo nell'aria esalata.

LA DISPLASIA BRONCOPOLMONARE DALL'INFANZIA ALL'ETA' ADULTA: DECORSO CLINICO E FUNZIONALITA' RESPIRATORIA.

Marco Filippone, Marta Lusiani, Silvia Carraro, Francesca Rusalen, Gea Bonetto,
Eugenio Baraldi

Prospettive in Pediatria 2009;39:109-114

RIASSUNTO. Nel 1967 Northway et al. descrissero per la prima volta una nuova malattia respiratoria cronica, la displasia broncopolmonare, che si sviluppava in bambini prematuri sottoposti a ventilazione meccanica e ad elevate concentrazioni di ossigeno. Da allora la displasia broncopolmonare è divenuta rapidamente la principale causa di malattia polmonare cronica dell'infanzia negli Stati Uniti. I grandi miglioramenti ottenuti nelle cure intensive neonatali nel tempo non hanno portato alla riduzione di incidenza della displasia broncopolmonare; l'aumentata sopravvivenza ad età gestazionali sempre più basse (23-24 settimane), invece, ha portato ad un profondo cambiamento epidemiologico della displasia broncopolmonare, che oggi colpisce soprattutto i neonati più immaturi e di peso estremamente basso alla nascita (<1000 g). Anche i meccanismi responsabili del danno polmonare sono cambiati nel tempo, portando all'emergere di una forma nuova di displasia broncopolmonare, che si presenta con aspetti clinici ed un quadro istopatologico molto differenti rispetto alla forma descritta in origine.

La displasia broncopolmonare si associa a considerevole morbilità respiratoria nel corso dei primi anni di vita, ma in seguito gravità e frequenza dei sintomi si riducono in modo significativo. Anomalie della funzione polmonare tendono però a persistere durante la crescita in bambini e adolescenti con storia di displasia broncopolmonare, nonostante dal punto di vista clinico i sintomi respiratori possano anche essere solo occasionali. Soggetti nati prematuri che non hanno sviluppato displasia broncopolmonare possono avere manifestazioni cliniche e

funzionali analoghe, seppure spesso di minor gravità rispetto ai soggetti con displasia broncopolmonare. Non è ancora noto se le alterazioni della funzionalità respiratoria rilevabili nei soggetti con BPD possano rappresentare un fattore prognosticamente rilevante per la predizione dell'outcome respiratorio durante l'età adulta. Non si può escludere che adulti con storia di nascita prematura e di displasia broncopolmonare possano presentare un aumentato rischio di sviluppare broncopneumopatia cronica ostruttiva in età più avanzata.

SUMMARY. In 1967, Northway et al. described for the first time a new chronic lung disease (bronchopulmonary dysplasia, BPD) developing in preterm infants who had been exposed to mechanical ventilation and high-concentration oxygen therapy. Since then BPD has become the most common chronic respiratory disease of infancy in the United States. The important improvement realized in the neonatal intensive care did not lead to a reduction in incidence of BPD; the increased survival of more and more premature infants has produced instead a deep change in the epidemiology of BPD, which now develops mainly in extremely-low birth weight infants (<1000 g). Pathogenesis is changed as well and a new type of bronchopulmonary dysplasia has emerged, with very different clinical and pathophysiological aspects from the original form.

BPD causes high respiratory morbidity in the first years of life, but afterwards intensity and frequency of symptoms usually decline considerably. Lung function abnormalities, however, may persist into adulthood.

Prematurely-born subjects without bronchopulmonary dysplasia may have clinical and functional manifestations similar, though usually less severe, to those of the BPD patients.

It is unclear whether lung function abnormalities seen in children with BPD have prognostic implications on their respiratory health later in life. It is possible that a

history of preterm delivery and bronchopulmonary dysplasia may be associated with a higher risk of developing chronic obstructive pulmonary disease with aging.

OBIETTIVO DELLA REVISIONE

Per molti anni sono stati condotti numerosi studi che hanno prodotto informazioni importanti sugli aspetti clinici e funzionali della displasia broncopolmonare (BPD) fino alle soglie dell'età adulta. Questa revisione rappresenta una sintesi di queste conoscenze, e un'analisi dei principali aspetti ancora da chiarire, in particolare sulla prognosi della BPD in età adulta e sulle modificazioni della sua storia naturale con l'avvento della nuova forma di BPD.

METODOLOGIA DELLA RICERCA BIBLIOGRAFICA

La ricerca degli articoli è stata effettuata su PubMed utilizzando come parole chiave displasia broncopolmonare, malattia polmonare cronica dell'infanzia, follow-up, funzione respiratoria.

INTRODUZIONE: VECCHIA E NUOVA DISPLASIA BRONCOPOLMONARE

Il termine di displasia broncopolmonare comparve per la prima volta sul New England Journal of Medicine nel 1967, coniato da Northway e coll. per descrivere una nuova patologia respiratoria cronica che colpiva neonati prematuri, sottoposti a ventilazione meccanica ed elevate concentrazioni di ossigeno a causa di grave sindrome da distress respiratorio. La malattia veniva definita clinicamente come persistenza fino al 28° giorno di vita di sintomi respiratori, ossigenodipendenza e anomalie radiografiche (Northway et al., 1967) in questi neonati, e veniva fatta risalire all'interazione reciproca di tre fattori patogenetici principali: l'imaturità polmonare, l'insulto acuto causato dall'ossigeno e dalla ventilazione meccanica, e l'inadeguatezza dei meccanismi riparativi in risposta al danno iniziale.

Con l'avvento di misure per prevenire e trattare la sindrome da distress respiratorio neonatale (somministrazione antenatale di steroidi, terapia sostitutiva con surfattante) e grazie al ricorso a tecniche di ventilazione meccanica meno

aggressive, l'impatto del danno polmonare acuto sulla patogenesi della BPD è andato gradualmente diminuendo nel tempo; invece, nell'era post-surfactant, ha assunto un'importanza sempre crescente l'immatùrità polmonare (Abman et al., 2006).

Infatti il miglioramento delle cure neonatali (Sweet et al 2007) che si è realizzato in particolare nelle ultime due decadi non ha portato ad una riduzione di incidenza della BPD (Kinsella et al., 2006), ma piuttosto ad una variazione epidemiologica della malattia. L'età gestazionale media dei neonati in cui la BPD fu descritta per la prima volta era intorno alle 34 settimane, per quei tempi prossima alla soglia di possibile sopravvivenza. Oggi la mortalità complessiva è diminuita drammaticamente, in particolare ad età gestazionali estremamente basse; i neonati con lieve prematurità raramente vanno incontro ad un danno polmonare acuto, e la BPD è divenuta appannaggio quasi esclusivo delle fasce di neonati di età gestazionale inferiore alle 28-30 settimane di gravidanza ed è divenuta rara nei neonati con peso alla nascita > 1000-1250 g.

La "nuova BPD" che colpisce questi neonati presenta caratteristiche eziopatogenetiche e istopatologiche diverse dalla "BPD classica" descritta in origine, caratterizzata da estesi fenomeni infiammatori, fibrosi diffusa, alternanza di aree atelettasiche e cistiche e marcato coinvolgimento delle vie aeree. Mentre il quadro suddetto è espressione di danno acuto a carico di strutture polmonari relativamente mature, infatti, la nuova BPD deve essere intesa principalmente come un disordine del processo di crescita e maturazione del sistema respiratorio, che nei neonati gravemente pretermine si trova, alla nascita, in stadi di sviluppo ancora estremamente precoci. In tali condizioni basta una minima esposizione ad agenti lesivi per alterare il normale processo di crescita microvascolare e di alveolarizzazione. Ne deriva una semplificazione della struttura parenchimale del

polmone (Allen et al., 2003; Baraldi et al., 2007, Abman et al., 2006), con spazi alveolari più ampi e ridotti di numero, risultante in una superficie di scambio gassoso complessivamente meno estesa. Il letto vascolare polmonare è dismorfico; le vie aeree, al contrario di quanto succede nella forma classica di BPD, sono relativamente risparmiate (Coalson et al., 2006).

Complessivamente, la BPD è la causa più frequente di malattia polmonare cronica dell'infanzia (Allen et al., 2003). I bambini con diagnosi di BPD hanno un rischio aumentato di anomalie della funzione respiratoria a lungo termine, e queste anomalie possono persistere nell'età scolare e nella adolescenza.

La forma nuova della BPD spesso ha un decorso più lieve in epoca neonatale rispetto alla forma classica, ma non si sa ancora se questo comporti una miglior prognosi respiratoria a distanza (Abman et al., 2006). Anche dopo l'introduzione degli steroidi prenatali e della terapia con surfactant la prevalenza di sintomi respiratori rimane elevata nei bambini nati prematuramente dopo la dimissione dalle terapie intensive neonatali (Vrijlandt et al., 2007; Hennessy et al., 2008). Inoltre non c'è evidenza che le limitazioni di funzione respiratoria dei bambini con BPD siano minori nei soggetti nati dopo l'introduzione del surfactant rispetto alle popolazioni precedenti (Korhonen et al., 2004; Baraldi et al., 2005; Pelkonen et al., 1997). Due recenti studi eseguiti su coorti successive di bambini nati < 1000 g o < 29 settimane di gestazione hanno riportato che in età scolare le popolazioni più recenti hanno anomalie di funzionalità respiratoria simili a quelle dei bambini nati in epoca pre-surfactant, malgrado il notevole miglioramento delle cure neonatali (Doyle 2006, Halvorsen et al., 2006). E' possibile che il mancato miglioramento prognostico derivi in parte dall'aumento progressivo della sopravvivenza di neonati gravemente prematuri, poiché la prematurità *per se* ha un ruolo importante

nell'influenzare la prognosi respiratoria a lungo termine (Doyle 2006, Halvorsen et al., 2004).

DECORSO CLINICO E FUNZIONALE

SINTOMI

Durante il primo anno di vita, bambini nati prima della 33^a settimana di gestazione hanno una prevalenza di wheezing ricorrente superiore rispetto ai bambini nati a termine. Si stima che fino al 50% dei neonati con basso peso alla nascita venga ospedalizzato per infezioni del tratto respiratorio nel primo anno di vita e che, tra questi, quelli affetti da BPD siano particolarmente predisposti ad episodi più gravi e frequenti (Lamarche et al., 2004; Vrijlandt et al., 2007). In genere, la gravità della sintomatologia respiratoria è proporzionale al grado di compromissione della funzionalità respiratoria (Greenough et al., 1996). Prevenire le infezioni respiratorie, in particolare da virus respiratorio sinciziale, e l'esposizione a fattori ambientali avversi, quali il fumo passivo, è di cruciale importanza nella gestione di questi bambini (Allen et al., 2003).

Durante l'età prescolare e scolare, è stata dimostrata una maggiore incidenza di wheezing e tosse cronica in bambini ex pretermine (Greenough et al., 1996; Allen et al., 2003; Chan et al., 1989; Palta et al., 2001; Rona et al., 1993; Hakulinen et al., 1990), in particolar modo in quelli con BPD o con storia di ventilazione meccanica prolungata.

Col progredire degli anni, i sintomi tendono a risolversi progressivamente. Le esacerbazioni respiratorie diventano via via meno frequenti, la correlazione tra sintomatologia respiratoria e compromissione funzionale è meno evidente, e anche soggetti con marcata ostruzione delle vie aeree possono risultare asintomatici. (Northway et al., 1990 ; Allen et al., 2003).

FUNZIONALITA' RESPIRATORIA

Le nostre conoscenze sulla funzione polmonare a lungo termine nei soggetti con pregressa BPD si riferiscono soprattutto a bambini nati nell'era pre-surfactant (cosiddetta "forma classica" di BPD). I risultati degli studi condotti in passato possono, perciò, non rispecchiare l'outcome delle forme più recenti di displasia broncopolmonare, che, come già detto, si manifestano in bambini più immaturi, trattati secondo strategie terapeutiche marcatamente differenti. Non si hanno a tutt'oggi informazioni sufficienti sull'andamento a lungo termine della salute respiratoria nei soggetti che presentano la forma nuova di BPD.

I bambini con BPD presentano tipicamente marcate alterazioni dei parametri di meccanica respiratoria fin dai primi giorni di vita. La compliance polmonare, che è ridotta fino a circa il 50% dei valori normali nei primi mesi di vita, tende però a migliorare progressivamente nel primo anno di vita, anche nei bambini con forme moderate o gravi di BPD (Baraldi et al., 1997; Gerhardt et al., 1987). Analogo miglioramento si registra per il valore di resistenza del sistema respiratorio, che giunge a valori vicini alla normalità già nel secondo anno di vita.

Malgrado questi miglioramenti funzionali, è spesso possibile evidenziare la presenza di significativa ostruzione al flusso aereo nel bambino con BPD utilizzando le manovre di espirazione forzata, che riproducono nel soggetto non collaborante una condizione di studio assimilabile entro certi limiti alla spirometria. I flussi espiratori forzati (il principale indice misurabile è il flusso massimo in corrispondenza della capacità funzionale residua V_{maxFRC}) risultano molto ridotti durante i primi 3 anni di vita in una elevata percentuale di bambini con BPD (Baraldi et al., 1997; Tepper et al., 1986); essi possono addirittura peggiorare nel corso del primo anno, indicando una insufficiente crescita del sistema respiratorio

dovuta all'interazione tra effetti della prematurità ed esiti del danno polmonare acuto (Jobe et al., 2002).

Il grado di limitazione al flusso nei primi anni di vita sembra predire il grado di compromissione degli anni successivi: in un piccolo gruppo di soggetti affetti da BPD, seguiti dalla nascita, il VmaxFRC all'età di 24 mesi è risultato strettamente correlato al FEV1 (volume espiratorio forzato nel primo secondo) riscontrato all'età di 8 anni (Filippone et al., 2003). Il FEV1 è considerato il parametro spirometrico più robusto per individuare una limitazione al flusso delle vie aeree. Questi dati suggeriscono che la funzione respiratoria nel tempo sia in qualche modo preconditionata dagli eventi precoci cui il polmone immaturo è esposto, e che ci sia solo un trascurabile recupero legato alla crescita del polmone (Mitchell et al., 1998). Ciò indicherebbe l'esistenza di un processo di rimodellamento delle vie aeree precoce ed irreversibile.

I parametri spirometrici di bambini con BPD dall'età scolare all'adolescenza presentano valori significativamente più bassi rispetto ai nati a termine (Gross et al., 1998; Korhonen et al., 2004; Pelkonen et al., 1997; Jacob et al., 1997, Giaccia et al., 1997). La figura 1 (Baraldi et al., 2007) riporta i valori di FEV1 negli studi di funzionalità respiratoria pubblicati dal 1990 in poi, in cui gruppi di bambini ed adolescenti con BPD (range di età 6-19 anni) venivano confrontati con gruppi di controllo di coetanei nati a termine. I risultati di questi lavori dimostrano con chiarezza che i bambini pretermine con BPD presentano un grado significativo di ostruzione a carico delle vie aeree ad ogni età, fino alle soglie dell'età adulta; il valore medio di FEV1 è generalmente intorno all'80% rispetto al valore predetto, e spesso significativamente più basso; praticamente in tutti gli studi è possibile individuare, tra i bambini con BPD, soggetti con valori individuali marcatamente ridotti. Solo 4 studi riportano dati fino alle soglie dell'età adulta; nessuna

informazione è disponibile sulla funzionalità respiratoria di questi soggetti oltre la seconda decade di vita. Si ribadisce ancora una volta che questi dati devono essere interpretati con cautela, perché essendo ottenuti principalmente in gruppi selezionati di bambini con la forma classica di malattia, potrebbero non riflettere l'andamento della nuova BPD.

La maggior parte delle informazioni sulla funzionalità respiratoria dei bambini con BPD deriva da studi trasversali, mentre solo pochi studi hanno seguito longitudinalmente l'andamento della funzionalità polmonare nel tempo durante l'infanzia e l'adolescenza negli stessi soggetti.

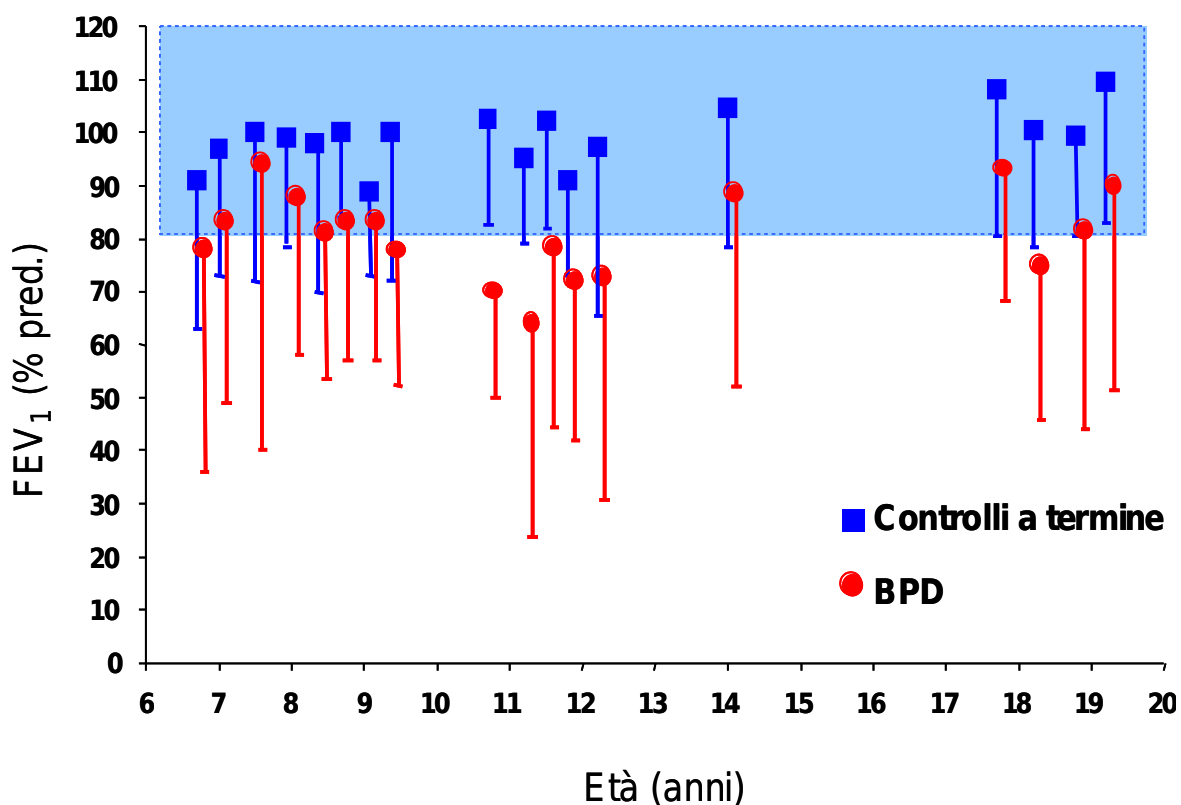


Figura 1.

Valori di FEV₁ in bambini adolescenti e giovani adulti nati prematuri che hanno sviluppato BPD confrontati con soggetti di controllo nati a termine. Sono riportati risultati degli studi pubblicati dal 1990 al 2007. In tutti gli studi, eccetto due, i valori medi di FEV₁ dei soggetti BPD risultavano significativamente ridotti rispetto ai controlli. I dati sono presentati come media (-2 deviazioni standard) (Da Baraldi et al, 2007, modificato)

Due piccoli studi segnalano in bambini con BPD un certo miglioramento dell'ostruzione delle vie aeree (Blayney et al., 1991) e dell'iperinflazione polmonare (Koumbourlis et al.,1996), una volta raggiunta l'età adolescenziale, pur senza rientrare nella normalità. Al contrario, Doyle e colleghi, sulla base di uno studio effettuato in Australia su una coorte di soggetti con peso alla nascita <1500 g e seguiti tra gli 8 e i 18 anni di età, hanno riportato un declino della loro funzione respiratoria nel tempo (Doyle et al., 2006).

Un'altra anomalia funzionale chiaramente associata alla prematurità è l'iperreattività bronchiale (Narang et al., 2006), che si manifesta nel 50-60% degli adolescenti con BPD (Northway et al., 1990; Halvorsen et al.,2004; Koumbourlis et al., 1996); la sua natura non è ancora chiara (fattori genetici, danno polmonare, anomalie dello sviluppo, etc..) (Eber et al., 2001). In soggetti con BPD, si sono notati ridotta tolleranza all'esercizio fisico, riduzione dello scambio dei gas (Mitchell et al., 1998; Jacob et al., 1997; Kilbride et al., 2003) e inadeguato adattamento ventilatorio (Santuz et al.,1995; Pianosi et al., 2000; Jacob et al.,1997) durante l'attività fisica, a fronte di un carico di lavoro massimale e di una capacità aerobica normali o solo lievemente ridotti (Gross et al., 1998; Santuz et al., 1995).

PRETERMINE SENZA BPD

Soggetti nati prematuri che non hanno sviluppato BPD possono avere manifestazioni cliniche e funzionali simili ai soggetti con BPD; wheezing e tosse cronica in età prescolare e scolare sono presenti con un'incidenza maggiore nei bambini ex pretermine, anche se tra questi coloro affetti da BPD sono i più vulnerabili (Lamarche et al.,2004; Gross et al, 1998; Vrijlandt et al., 2007). Recenti studi di coorte riportano una prevalenza di sintomi broncoostruttivi e/o dell'uso di farmaci anti-asmatici, significativamente superiore in soggetti nati pretermine,

rispetto ai controlli nati a termine, di età compresa fra gli 8 e i 19 anni, anche in assenza di storia di BPD (Doyle et al., 2006; Anand et al., 2003; Halvorsen et al., 2004; Vrilandt et al., 2007).

In età scolare e per tutta l'adolescenza, i soggetti prematuri senza storia di malattia polmonare cronica mostrano ugualmente una riduzione del flusso nelle vie aeree (Gappa et al., 2003; Doyle et al., 2006; Halvorsen et al., 2004; Pelkonen et al., 1997, Jacob et al., 1997), con valori spirometrici spesso intermedi tra quelli dei bambini con BPD e quelli dei controlli nati a termine (Baraldi et al., 2005; Pelkonen 1997; Doyle et al., 2001). Il significato clinico di queste alterazioni funzionali non è ben chiaro; recentemente, alcuni studi hanno evidenziato già nei primi mesi di vita la presenza di significative limitazioni della funzionalità respiratoria in soggetti anche lievemente prematuri (Hjalmarson et al., 2002; Friedrich et al., 2006; Friedrich et al., 2007); questa osservazione ha suggerito l'ipotesi che la prematurità sia di per se stessa un fattore in grado di alterare il normale sviluppo polmonare e quindi potenzialmente di avere un effetto negativo sfavorevole sulla salute respiratoria a lungo termine.

Uno studio recente condotto in Inghilterra ha seguito longitudinalmente un gruppo di neonati pretermine, reclutati alla nascita, con età gestazionale media di 31 settimane e non trattati con surfattante. Morbilità, funzione respiratoria e iperreattività delle vie aeree di 60 di questi soggetti e di 50 controlli, sono state valutate all'età di 21 anni. Lo studio ha concluso che, nonostante una significativa riduzione durante la crescita del numero di soggetti sintomatici, adulti ex pretermine hanno una prevalenza di sintomi respiratori maggiore rispetto ai controlli nati a termine; le alterazioni della funzione polmonare e l'iperreattività bronchiale, invece, non sembrano persistere in età adulta, probabilmente per un recupero della crescita delle vie aeree. Un dato interessante è che i valori di FEV1

dello stesso gruppo esaminato all'età di 7-9 anni sembrano poter predire i valori riscontrati in età adulta (Narang et al., 2008).

STORIA NATURALE DELL' OSTRUZIONE DELLE VIE AEREE

La funzionalità respiratoria, espressa come andamento dei valori di FEV1, aumenta progressivamente durante la vita di un individuo fino a raggiungere valori massimali all'inizio dell'età adulta; rimane stabile alcuni anni e poi comincia il suo lento declino (di circa 30 ml/anno) fino ad età avanzata (figura 2), normalmente senza mai raggiungere la soglia oltre la quale è possibile la comparsa di sintomi (Fletcher et al., 1977). Tra i fumatori il quadro è più complesso, poiché il declino nei soggetti suscettibili al danno del fumo, è più rapido (60 ml/anno) e predispone allo sviluppo della Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) dell'adulto.

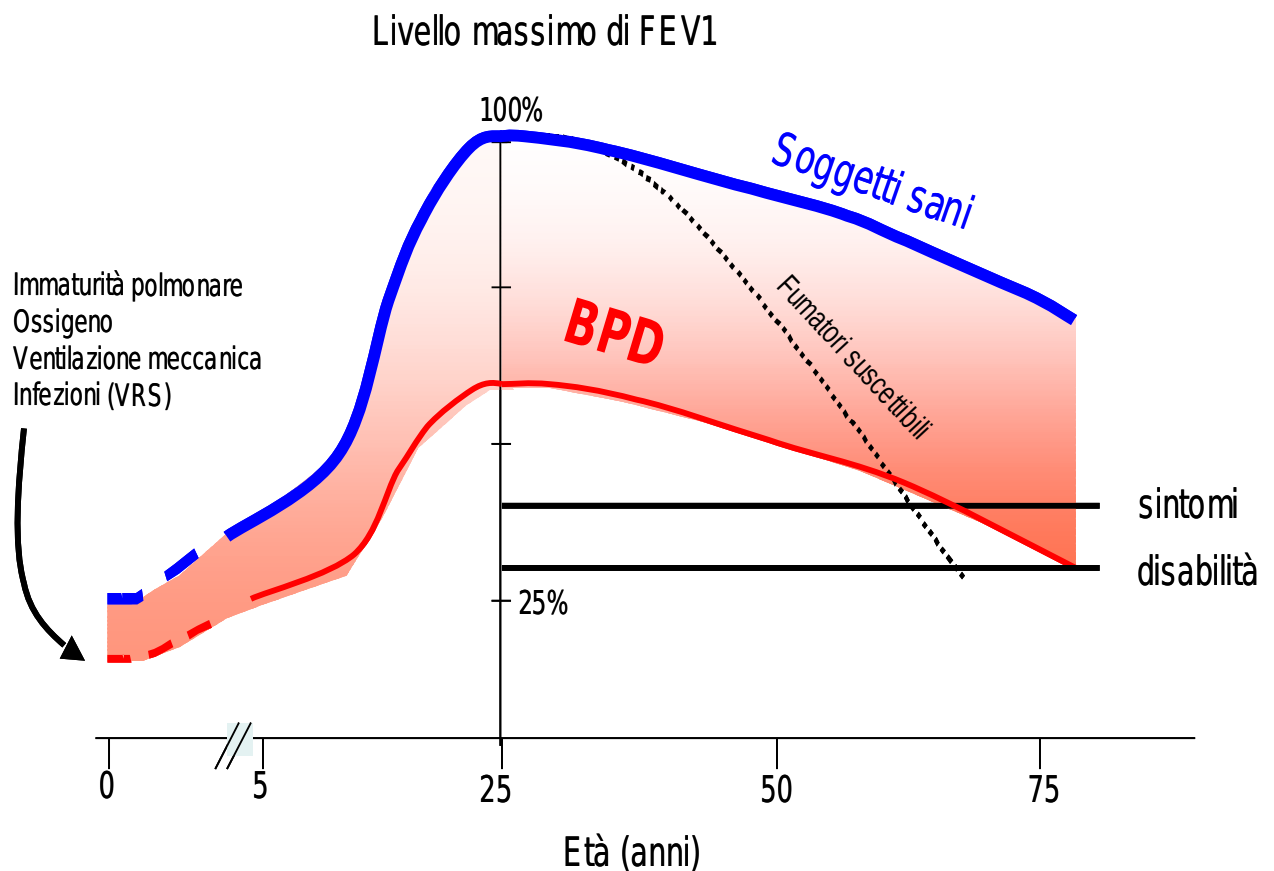


Figura 2.

Modello dell'andamento della funzionalità respiratoria nell'arco della vita.

Curve teoriche dell'andamento del FEV₁ in soggetti sani (linea blu) e soggetti affetti da BPD (area rossa). I soggetti con BPD presentano gradi variabili di riduzione del FEV₁ nei primi anni di vita. Una buona parte di questi soggetti non raggiunge il livello massimo di FEV₁ all'età di 20-25 anni e l'inizio del declino fisiologico legato all'età avviene perciò da valori ridotti. La linea tratteggiata rappresenta l'effetto negativo del fumo di sigaretta sulla funzionalità respiratoria nei soggetti suscettibili. L'"effetto fumo" potrebbe ulteriormente accelerare la perdita di funzionalità respiratoria nei soggetti con BPD (da Baraldi et al 2007, modificato).

Questo modello dell'andamento del FEV₁ nel tempo si applica a soggetti con uno sviluppo polmonare normale, ma non a coloro che presentano una funzione polmonare subottimale, a causa di un danno subito durante il periodo perinatale, come accade nei pazienti con BPD (Doyle et al., 2006; Filippone et al., 2003).

Questi soggetti infatti fin dai primi mesi di vita presentano valori di funzionalità respiratoria ridotti, e da giovani adulti (Doyle et al., 2006; Vrijlandt et al., 2006) possono raggiungere valori ben al di sotto dei valori massimali. La perdita di 30 mL all'anno di FEV₁ in questi soggetti potrebbe portare, con l'invecchiamento, al raggiungimento della soglia dei sintomi e/o alla comparsa di insufficienza respiratoria (fig. 2). Inoltre è possibile che questi soggetti perdano di più dei fisiologici 30 ml/anno. Infatti modelli animali e studi epidemiologici nell'uomo hanno evidenziato che i difetti di sviluppo intrauterino possono venir compensati nei primi mesi/anni di vita ma questo va a scapito delle risorse successivamente disponibili per riparare eventuali danni. In pratica il materiale genetico e le risorse organiche utilizzate per compensare un difetto di crescita/sviluppo non saranno disponibili per correggere eventuali danni indotti da successivi insulti ambientali (Gluckman et al., 2008). Questo processo potrebbe essere ancora più accelerato qualora questi pazienti inizino a fumare. Va ricordato infatti che l'esposizione al fumo passivo nel bambino e, a partire dall'adolescenza, il fumo attivo assieme al fatto di avere

ridotta funzionalità polmonare possono essere causa dello sviluppo di BPCO in età adulta (Nortway 1990, Kinsella 2006, Doyle 2006, Halvorsen 2004, Eber 2001). La prognosi finale per questi pazienti al momento non è nota, e potrà essere chiarita in futuro solo seguendone l'andamento dal punto di vista della funzionalità polmonare e dei sintomi respiratori nell'età adulta e durante l'invecchiamento.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto esposto, la malattia polmonare cronica non può più essere considerata solo come una patologia dell'età pediatrica. In alcuni soggetti nati prematuri, soprattutto in pazienti con diagnosi di BPD, l'alterazione della funzionalità respiratoria di tipo ostruttivo persiste durante l'adolescenza e nell'età adulta. La maggior parte degli individui si presenta asintomatica dal punto di vista respiratorio, ma non si esclude che essi si possano trovare in una situazione di rischio aumentato per lo sviluppo di broncopneumopatia cronica ostruttiva in età più avanzata.

Gli sviluppi delle tecniche di terapia intensiva neonatale hanno permesso un sensibile aumento della sopravvivenza in seguito alla nascita prematura. E' solo in questi anni che gli individui nati con età gestazionali estremamente basse, stanno entrando nell'età adulta e saranno sempre più numerosi i casi di questa nuova malattia polmonare cronica che giungeranno all'osservazione dei medici dell'adulto.

La patogenesi della displasia broncopolmonare non è ancora interamente definita e il trattamento è empirico. Saranno necessari studi longitudinali prospettici per chiarire la storia naturale della malattia cronica polmonare dopo la nascita prematura.

BOX RIASSUNTIVO

- Dal 1967, anno in cui per la prima volta fu descritta, la BPD ha assunto connotazioni differenti dal punto di vista eziologico, clinico e istopatologico.
- I valori di FEV1 di bambini con BPD ad ogni età sono più bassi rispetto a quelli di coetanei nati a termine. Mancano tuttavia dati consistenti che delineino l'andamento della funzione polmonare oltre l'adolescenza. Soggetti ex pretermine senza storia di BPD, possono anch'essi presentare un quadro di ostruzione delle vie aeree, in genere di minore gravità rispetto ai soggetti con BPD.
- Aspetti della displasia broncopolmonare che devono essere esplorati: la patogenesi è ancora parzialmente indefinita, il trattamento è empirico, non si hanno informazioni sul quadro anatomopatologico dei soggetti che sopravvivono alla nascita pretermine. Inoltre la prognosi della nuova forma di BPD è ignota, poichè non è ancora trascorso un tempo sufficiente per valutare come l'aumento del tasso di sopravvivenza dei bambini gravemente prematuri influenzi il loro outcome respiratorio a lungo termine. Infine, il rischio per questi soggetti di sviluppare BPCO con maggiore suscettibilità o in età precoci, è sicuramente un importante problema che dovrà essere indagato nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

Abman SH, Davis JM. Bronchopulmonary dysplasia. In: Chernick V, Boat TF, Wilmott RW, Bush A, eds. Disorders of the respiratory tract in children. 7th ed.

Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, et al. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:356-96.

American Thoracic Society Documents. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168:356-396.

Anand D, Stevenson CJ, West CR, Pharoah PO. Lung function and respiratory health in adolescents of very low birth weight. Arch Dis Child 2003;88:135-8.

Baraldi E, Bonetto G, Zacchello F, et al. Low exhaled nitric oxide in school-age children with bronchopulmonary dysplasia and airflow limitation. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:68-72.

**In età scolare bambini con storia di BPD hanno un quadro di funzionalità respiratoria di tipo ostruttivo non reversibile al broncodilatatore, accompagnato da bassi livelli di FENO, contrariamente a ciò che si riscontra nei bambini asmatici; questi risultati indicano l'assenza di flogosi eosinofila, suggerendo invece l'esistenza di un danno strutturale stabilizzato nei bambini con BPD:

Baraldi E, Filippone M, Trevisanuto D et al. F. Pulmonary function until two years of life in infants with bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:149-55.

Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. N Engl J Med. 2007 ;357:1946-55.

Blayney M, Kerem E, Whyte H, O'Brodivich H. Bronchopulmonary dysplasia: improvement in lung function between 7 and 10 years of age. *J Pediatr* 1991;118:201-6.

Chan KN, Elliman A, Bryan E, Silverman M. Respiratory symptoms in children of low birth weight. *Arch Dis Child* 1989; 64:1294-304.

Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:179-84.

Doyle LW, Cheung MMH, Ford GW, Olinsky A, Davis NM, Callanan C. Birth weight <1501 g and respiratory health at age 14. *Arch Dis Child* 2001;84:40-4.

Doyle LW, Faber B, Callanan C, et al. Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics* 2006;118:108-113.

** E' uno dei pochi studi di coorte che sono stati condotti in adolescenti affetti da BPD. Soggetti VLBW con storia di BPD nella tarda adolescenza presentano indici di funzionalità respiratoria ridotti rispetto ai soggetti senza storia di BPD e la loro funzionalità respiratoria potrebbe avere un declino più rapido nell'età adulta.

Eber E, Zach MS. Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). *Thorax* 2001;56: 317-23.

Filippone M, Sartor M, Zacchello F, Baraldi E. Flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia and respiratory function at school age. *Lancet* 2003;361:753-754.

*Questo studio descrive una stretta correlazione tra il grado di ostruzione delle vie aeree misurato nei primi anni di vita e la funzionalità respiratoria in età scolare nei bambini con BPD. L'entità del danno delle vie aeree riportato precocemente sembra predittivo della prognosi a lungo termine in questi soggetti, dal momento che il recupero funzionale appare limitato.

Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977;1:1645-8.

Gappa M, Stocks J, Merkus P. Lung growth and development after preterm birth: further evidence. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:399-400.

Gerhardt T, Hehre D, Feller R, et al. Serial determination of pulmonary function in infants with chronic lung disease. *J Pediatr* 1987;110: 448-56.

Giacchia GP, Venkataraman PS, West- Wilson KI, Faulkner MJ. Follow-up of school-age children with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1997;130:400-8.

Greenough A, Giffin FJ, Yüksel B. Respiratory morbidity in preschool children born prematurely: relationship to adverse neonatal events. *Acta Paediatr* 1996;85: 772-7.

Gross SJ, Iannuzzi DM, Kveselis DA, Anbar RD. Effect of preterm birth on pulmonary function at school age: a prospective controlled study. *J Pediatr* 1998;133: 188-92.

Hakulinen AL, Heinonen K, Länsimies E, Kiekara O. Pulmonary function and respiratory morbidity in school-age children born prematurely and ventilated for neonatal respiratory insufficiency. *Pediatr Pulmonol* 1990;8:226-32.

Halvorsen T, Skadberg BT, Eide GE, et al. Pulmonary outcome in adolescents of extreme preterm birth: a regional cohort study. *Acta Paediatr* 2004;93:1294-1300.

**E' uno dei pochi studi di coorte che sono stati condotti in adolescenti affetti da BPD. Questi soggetti presentano valori di FEV1 ridotti e iperattività delle vie aeree. Gli autori suggeriscono che adolescenti con storia di BPD possano essere a rischio di sviluppare BPCO precocemente in età adulta.

Jacob SV, Lands LC, Coates AL et al. Exercise ability in survivors of severe bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1925-9.

Jobe AH. An unknown: lung growth and development after very preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1529-1530.

Kilbride HW, Gelatt MC, Sabath RJ. Pulmonary function and exercise capacity for ELBW survivors in preadolescence: effect of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 2003;143:488-93.

Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 2006; 367:1421-31.

Korhonen P, Laitinen J, Hyödynmaa E, Tammela O. Respiratory outcome in school-aged, very-low-birth-weight children in the surfactant era. *Acta Paediatr* 2004;93:316-21.

Koumbourlis AC, Motoyama EK, Mutich RL et al. Longitudinal follow-up of lung function from childhood to adolescence in prematurely born patients with neonatal chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1996;21: 28-34.

Lamarche-Vadel A, Blondel B, Truffer P et al. Re-hospitalization in infants younger than 29 weeks' gestation in the EPIPAGE cohort. *Acta Paediatr* 2004;93: 1340-5.

Mitchell SH, Teague WG. Reduced gas transfer at rest and during exercise in school-age survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1406-12.

Narang I, Rosenthal M, Cremonesini D, et al. Longitudinal evaluation of airway function 21 years after preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:74-80

*Si tratta di uno studio longitudinale svolto su soggetti nati prematuri senza storia di BPD, che ha mostrato persistenza di elevata prevalenza di sintomi respiratori ma non di alterazioni funzionali all'inizio dell'età adulta, in confronto a controlli a termine.

Narang I, Baraldi E, Silverman M, Bush A. Airway function measurements and the long term follow-up of survivors of preterm birth with and without chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:497-508.

Northway WH Jr, Moss RB, Carlisle KB, et al. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Eng J Med* 1990;323:1793-1799.

**Gli autori hanno studiato la funzionalità polmonare di 26 adolescenti e adulti con stori di BPD, provenienti in parte dalla popolazione originariamente studiata nel 1967. La maggior parte di questi continuano a presentare ostruzione delle vie aeree, ipereattività delle vie aeree ed iperinflazione.

Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Eng J Med* 1967; 276:357-368.

**Questo è l'articolo in cui per la prima volta la displasia broncopulmonare è stata definita e descritta.

Palta M, Sadek-Badawi M, Sheehy M, et al. Respiratory symptoms at age 8 years in a cohort of very low birth weight children. *Am J Epidemiol* 2001;154:521-9.

Pelkonen AS, Hakulinen AL, Turpeinen M. Bronchial lability and responsiveness in school children born very preterm. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1178- 84.

Pianosì PT, Fisk M. Cardiopulmonary exercise performance in prematurely born children. *Pediatr Res* 2000;47:653-8.

Rona RJ, Gulliford MC, Chinn S. Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood. *BMJ* 1993;306:817-20.

Santuz P, Baraldi E, Zaramella P et al. Factors limiting exercise performance in long-term survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1284-9.

Tepper RS, Morgan WJ, Cota K, Taussig LM. Expiratory flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1986;109:1040-6.

Vrijlandt EJ, Boezen HM, Gerritsen J et al. Respiratory health in prematurely born preschool children with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2007;150:256-261.

*In questo recente studio vengono valutati sintomi e funzionalità respiratoria di bambini in età prescolare nati prematuri con e senza BPD. Le resistenze e la reattanza del sistema respiratorio sono misurati con tecniche che non richiedono sedazione e sono applicabili anche in bambini non collaboranti.

Vrijlandt EJ, Gerritsen J, Boezen HM et al. Lung function and exercise capacity in young adults born prematurely. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:890-6.

CHILDHOOD COURSE OF LUNG FUNCTION IN SURVIVORS OF BRONCHOPULMONARY DISPLASIA

Filippone M, Bonetto G, Cherubin E, Baraldi E.

JAMA 2009;302:1418-1420.

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is the primary respiratory complication of premature birth, associated with a reduced maximal lung function that may carry a risk of a chronic obstructive pulmonary disease (COPD)–like phenotype developing later in life(1). There is little prospective evidence about the evolution of lung function in long-term survivors of BPD

Methods

This prospective study was performed between October 1992 and April 2008 with 17 survivors of BPD. Maximum flow at functional residual capacity ($V_{max_{FRC}}$) was measured at age 2 years (2) and lung function at ages 9 (3) and 15 years. Bronchopulmonary dysplasia was defined as oxygen dependence persisting at 28 days in infants born with a weight less than 1250 g (3).

Two control groups matched for sex and age (within 6 months) comprised 34 healthy children born at term and 17 children born preterm without BPD who had spirometry performed at age 9 years and again at age 14 to 15 years. Lung function measurements were compared using *z* scores (4,5). The study was approved by the University Hospital of Padua ethics committee, and parents provided written consent.

The study had a power of at least 84%, with a 2-sided significance level of .05, to detect a between-groups effect size of 1.0 or more. Repeated measures analysis of variance, *t* test, and linear regression were used for data analysis with SAS version 9.1.3 for Windows (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina).

Results

The BPD group showed consistent lung function tracking, indicated by no significant change in mean z score between ages 2 years ($V_{\max_{\text{FRC}}}$ z score, -1.48 ; 95% confidence interval [CI], -2.19 to -0.77), 9 years (z score for forced expiratory volume in 1 second [FEV_1], -1.74 , 95% CI, -2.27 to -1.21), and 15 years (FEV_1 z score, -1.71 ; 95% CI, -2.60 to -0.82 ; $P = .62$) (Table). There was no change in mean z score for spirometry variables between ages 9 and 15 years in the control groups. Values for FEV_1 were significantly lower in the BPD group than in premature non-BPD and term-born children at both 9 and 15 years old. Prematurely born non-BPD participants also had significantly lower FEV_1 values than the term-born controls. The prematurely born children showed no correlation between birth weight or gestational age and spirometry results. Among BPD participants, the z scores for $V_{\max_{\text{FRC}}}$ at 2 years old ($zV_{\max_{\text{FRC}}}$) were correlated with the z scores for FEV_1 ($zFEV_1$) at age 15 years ($r = 0.74$, $P < .001$) and with the individual differences in $zFEV_1$ between 9 and 15 years (Figure). $zFEV_1$ declined significantly ($P = .01$) between 9 and 15 years in the 9 BPD survivors with $V_{\max_{\text{FRC}}}$ less than the 5th percentile at age 2 years (corresponding to a $zV_{\max_{\text{FRC}}} < -1.64^5$) but increased ($P = .01$) in the 8 individuals with $V_{\max_{\text{FRC}}}$ greater than the 5th percentile (Figure); the former did not differ from the latter in perinatal-neonatal characteristics and somatic growth. Those below the 5th percentile had a lower annual rate of FEV_1 growth compared with those above the 5th percentile (160 mL/y; 95% CI, 109 to 211 mL/y, vs 245 mL/y; 95% CI, 202 to 288 mL/y; $P = .01$) and a significantly lower $zFEV_1$ at 15 years (-2.77 ; 95% CI, -3.90 to -1.64 ; vs -0.52 ; 95% CI, -1.44 to 0.40 ; $P = .003$).

Table. Participant Characteristics and Lung Function Results^a

	BPD (n = 17)			Preterm Non-BPD (n = 17)			Term Controls (n = 34)		
	Perinatal/ Neonatal	9 y	15 y	Perinatal/ Neonatal	9 y	14 y	Perinatal/ Neonatal	9 y	15 y
Gestational age, wk	28.1 (1.8)			29 (2.0)			39 (1.2)		
Birth weight, kg	0.93 (0.22)			1.00 (0.26)			3.23 (0.38)		
Boys/girls, No.	7/10			7/10			14/20		
Mechanical ventilation, d	31.5 (23.9 to 46.2)			2.0 (0.5 to 3.5)			NA		
Oxygen dependence, d	141 (72.8 to 209.2)			2.7 (0.5 to 4.9)			NA		
Surfactant treatment, No.	12			4			NA		
Postnatal corticosteroids, No.	17			0			NA		
Characteristics at Follow-up									
Height, m		1.30 (1.27 to 1.34)	1.64 (1.60 to 1.68)		1.33 (1.30 to 1.36)	1.60 (1.56 to 1.64)		1.32 (1.29 to 1.35)	1.66 (1.63 to 1.69)
Weight, kg		26.1 (23.4 to 28.8)	51.5 (48.1 to 54.9)		29.3 (26.9 to 31.7)	51.8 (47.4 to 56.2)		30.8 (28.9 to 32.7)	59.3 (55.8 to 62.8)
FVC, L		1.58 (1.41 to 1.75)	3.22 (2.86 to 3.58)		1.89 (1.69 to 2.09)	3.26 (2.90 to 3.62)		1.96 (1.85 to 2.07)	3.93 (3.72 to 4.14)
FVC, z score		-1.31 (-1.91 to -0.71)	-1.37 (-2.06 to -0.68)		-0.41 (-0.90 to 0.08)	-0.56 (-1.11 to -0.01)		-0.01 (-0.28 to 0.26)	0.11 (-0.21 to 0.43)
<i>P</i> value ^b		<.001	<.001		.17	.05			
<i>P</i> value ^c		.01	.04						
FEV ₁ , L		1.29 (1.16 to 1.42)	2.62 (2.30 to 2.94)		1.60 (1.41 to 1.79)	2.80 (2.47 to 3.13)		1.76 (1.67 to 1.86)	3.42 (3.21 to 3.63)
FEV ₁ , z score		-1.74 (-2.27 to -1.21)	-1.71 (-2.60 to -0.82)		-0.62 (-1.15 to -0.09)	-0.65 (-1.30 to 0.00)		0.22 (-0.01 to 0.45)	0.27 (0.00 to 0.54)
<i>P</i> value ^b		<.001	<.001		.004	.02			
<i>P</i> value ^c		.001	.02						
FEV ₁ /FVC		0.82 (0.76 to 0.88)	0.82 (0.76 to 0.88)		0.85 (0.81 to 0.89)	0.86 (0.81 to 0.91)		0.90 (0.88 to 0.92)	0.89 (0.88 to 0.91)
FEV ₁ /FVC, z score		-0.77 (-1.61 to 0.07)	-0.61 (-1.50 to 0.28)		-0.46 (-1.08 to 0.16)	-0.11 (-0.84 to 0.62)		0.26 (0.03 to 0.49)	0.39 (0.12 to 0.66)
<i>P</i> value ^b		.007	.02		.04	.20			
<i>P</i> value ^c		.42	.26						
FEF _{25%-75%} , L/s		1.33 (1.07 to 1.59)	2.26 (2.04 to 3.20)		1.80 (1.41 to 2.13)	3.04 (2.43 to 3.65)		2.30 (2.13 to 2.47)	4.11 (3.87 to 4.35)
FEF _{25%-75%} , z score		-1.80 (-2.57 to -1.03)	-1.51 (-2.41 to -0.61)		-0.89 (-1.55 to -0.23)	-0.66 (-1.37 to 0.07)		0.41 (0.09 to 0.73)	0.32 (0.07 to 0.57)
<i>P</i> value ^b		<.001	<.001		.001	.016			
<i>P</i> value ^c		.04	.06						
BDR, %		7.9 (2.8 to 13.0)	8.2 (4.2 to 12.2)						
FeNO, parts per billion		7.6 (5.2 to 10.0)	11.3 (8.1 to 14.5)						

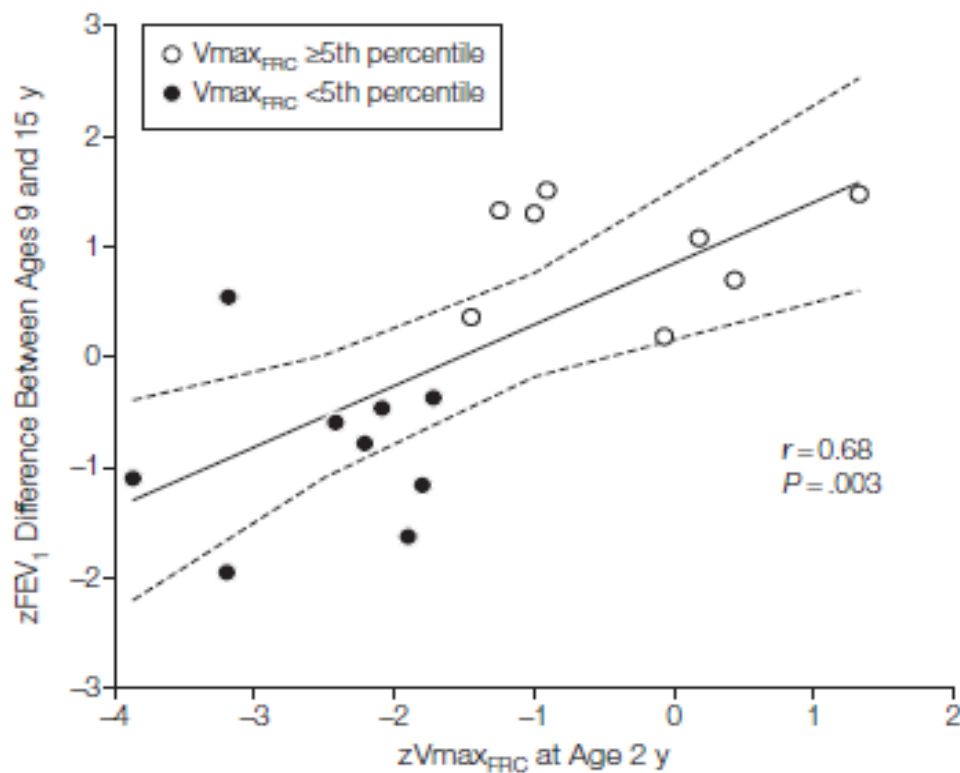
Abbreviations: BDR, bronchodilator response to albuterol; BPD, bronchopulmonary dysplasia; FEF_{25%-75%}, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of the forced vital capacity; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; FEV₁, forced expiratory volume in the first second of expiration; FVC, forced vital capacity; NA, not applicable.

^aData are presented as mean (SD) and mean (95% confidence interval) except as noted. *P* values were adjusted by the false discovery rate correction for multiple comparisons.

^bCompared with term controls.

^cCompared with preterm non-BPD participants.

Figure. Relationship Between Airway Function at Age 2 Years and Lung Function Change Between Ages 9 and 15 Among 17 Survivors of Bronchopulmonary Dysplasia



Between ages 9 and 15 years, zFEV₁ increased in all patients with a Vmax_{FRC} greater than the 5th percentile (open circles) while it decreased in all but 1 patient with Vmax_{FRC} less than the 5th percentile (filled circles). Dashed lines indicate 95% confidence interval for the regression line; zVmax_{FRC}, the z score of the maximum flow at functional residual capacity; zFEV₁, the z score of the forced expiratory volume in 1 second.

Comment

Early lung injuries may influence lifetime respiratory health. In the general population, low Vmax_{FRC} values shortly after birth are a primary risk factor for airflow obstruction in adulthood.⁶ While our findings should be considered preliminary because of the small sample size, severe early airflow obstruction at 2 years identified survivors of BPD at greater risk of disrupted lung growth during their childhood, suggesting a guarded long-term respiratory prognosis. Patients

with better airflow at 2 years showed an improvement in lung function in later childhood, suggesting some degree of functional recovery. In addition, our findings suggest that preterm delivery without BPD may also affect long-term lung function, although to a lesser extent than in patients with BPD.

References

- 1 Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1946-1955.
- 2 Baraldi E, Filippone M, Trevisanuto D, Zanardo V, Zacchello F. Pulmonary function until 2 years of life in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(1):149-155.
- 3 Filippone M, Sartor M, Zacchello F, Baraldi E. Flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia and respiratory function at school age. *Lancet*. 2003;361(9359):753-754.
- 4 Hoo AF, Dezateux C, Hanrahan JP, Cole TJ, Tepper RS, Stocks J. Sex-specific prediction equations for Vmax(FRC) in infancy: a multicenter collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(8):1084-1092.
- 5 Stanojevic S, Wade A, Stocks J; et al. Reference ranges for spirometry across all ages: a new approach. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(3):253-260.
- 6 Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2007;370(9589):758-764.

PRETERM BIRTH IS ASSOCIATED WITH FLOW LIMITATION AND INCREASED EXHALED BREATH CONDENSATE 8-ISOPROSTANE LEVELS IN ADOLESCENCE

INTRODUCTION

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is the most common chronic lung disease of infancy. Many factors such as oxygen, ventilation and infection can contribute to its development after preterm birth. BPD survivors are very susceptible to respiratory exacerbations after their discharge from neonatal intensive care unit (NICU). The clinical condition generally improves with time with fewer and less severe exacerbations, but affected patients present persistent functional alteration and a risk of long term morbidity (1). While lung inflammation is known to be a major contributor to the pathogenesis of BPD in early phase, inhibiting alveolarization and normal vascular development, altering the repair's ability and contributing to fibrosis, it is still unknown if it plays a role in the persistent alteration of airway function of childhood and adulthood. Prematurity per se may correlate, to some extent, with respiratory symptoms such as coughing, wheezing and asthma like symptoms and lung functional abnormalities (2). However, there are few longitudinal data regarding respiratory morbidity from childhood to adulthood (3).

Advances in pulmonary research developed methods of non-invasive sampling of the airways, such as exhaled gases and exhaled breath condensate (EBC) collection and analysis, improving our understanding of the pathogenesis of several lung diseases.

Fractional exhaled nitric oxide (FE_{NO}) is considered a validated biomarker of eosinophilic airway inflammation and its levels predict the response to inhaled corticosteroids (4).

EBC is simply to perform, is effort-independent, non-invasive and rapid. It is a promising methodology inasmuch as the condensate composition is believed to reflect that of the airway lining fluid (5). Up to date, to our knowledge, there are no report describing inflammatory and oxidative stress mediators in EBC of BPD patients.

Isoprostanes are prostaglandine-like compounds formed from the free radical catalysed peroxidation of arachidonic acid, a mechanism independent of the cyclooxygenase (6). Measurements of these compounds have several advantages over other marker of oxidative stress, since they are chemically stable, are formed in vivo and are specific for lipid peroxidation. 8-isoprostane is a stable product of lipid peroxidation can be measured in EBC and may provide a quantitative index of oxidant stress in vivo. 8-isoprostane is increased in asthma, interstitial lung diseases and chronic obstructive pulmonary disease and may be considered not just markers of oxidative stress but also mediators of lung injury (7).

Aim of the study is to evaluate mid-long term respiratory prognosis in a group of adolescents born preterm with and without a perinatal diagnosis of bronchopulmonary dyspalsia and to analyse exhaled inflammatory and oxidative stress markers in order to investigate possible damage pathways.

METHODS

Study population and Study Design

Thirty-four survivors of BPD were recruited to take part in the study protocol from a population of subjects admitted to the Neonatal Intensive Care Unit at the Department of Pediatrics in Padova between January 1987 and December 1994, born at a median gestational age of 29 weeks [IQR 27-30] and with a median birth weight of 990 [840-1150]. Patients with major congenital anomalies or suspected

lung hypoplasia were excluded. BPD was defined as clinical signs of respiratory distress, chest radiograph abnormalities, and oxygen dependence at 28 days of life (8).

Thirty-four healthy children born at term with no history of asthma or allergy, and no respiratory symptoms in the previous 4 weeks, matched for age with the BPD survivors were recruited as control population.

Twenty children born prematurely who did not develop BPD were also recruited as control subjects for the BPD group. All the children were admitted to the NICU of our Department at birth because of prematurity. They were with mild or without respiratory distress syndrome at birth and none was diagnosed as having BPD according to the previously mentioned criteria. Pertinent neonatal data are shown in table 1.

At the time of inclusion in the study, all the patients were in stable conditions and had not used steroids for at least 1 month. None of the patients were being treated with leukotriene receptor antagonists.

After collecting a detailed clinical history, all the subjects underwent a complete physical examination, FE_{NO} measurement, spirometry, EBC collection and skin prick test. Each child was adequately instructed and trained before taking FE_{NO} measurements, testing pulmonary function and collecting EBC.

The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of our Hospital and all parents gave their informed consent.

Exhaled breath condensate (EBC) collection and metabolites assays

EBC was collected and processed according to ATS/ERS recommendations (4). EBC was collected using the TURBO-DECCS (transportable unit for research on biomarkers obtained from disposable exhaled condensate collection systems) (Italchill, Parma, Italy). As described elsewhere (9) the TURBO is a refrigerating

system that relies on a thermoelectric module producing a Peltier effect. The cold side of the Peltier module is connected to an aluminium support shaped to house the test tube (10). The temperature is maintained constant during the collection (we used a collection temperature of -4°C). The turbo is supplied with the DECCS, a disposable respiratory system that consists of a mouthpiece equipped with a one-way valve and a reliable saliva trap, connected to a connecting vial (50 ml) by means of a tube (10). The children breathed tidally through the mouth for 15 minutes, wearing a nose-clip and sitting comfortably. They kept their mouth dry by periodically swallowing excess saliva. EBC samples were stored at -80°C in polypropylene tubes until assay.

8-isoprostane was assayed by an enzyme-linked immunoassay (EIA) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The lowest detection limit of the assay was 3,7 pg/mL. For samples below the lowest detection limits, the data were expressed as half the detection limit.

Pulmonary function test

Lung function was analyzed by means of a 10-liter bell spirometer (Biomedin Padova, Italy) according to international recommendations (11). Forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1 second (FEV_1), and forced expiratory flow rate between 25% and 75% ($\text{FEF}_{25-75\%}$) of forced vital capacity were measured and expressed as percentages of the predicted reference values according to Polgar and Promadhat. The best of three maneuvers was recorded.

Spirometry was also performed after administering 400 μg of inhaled salbutamol by metered dose inhaler with a spacer device (Aerochamber, Trudell, Canada). Reversibility to β_2 -agonists was defined as a more than 12% increase in FEV_1 after salbutamol inhalation.

Fractional exhaled nitric oxide (FE_{NO}) measurement

FE_{NO} was measured with the NIOX system (Aerocrine, Stockholm, Sweden), using a single breath online method according to ATS/ERS guidelines for measuring FE_{NO} in children (12). In brief, children inhaled NO-free air total lung capacity and exhaled through a dynamic flow restrictor with a target flow of 50 ml/sec for 10 seconds. Visual incentives provided feedback for flow-rate compliance. No nose clip was used. A direct digital reading is obtained and average of three readings was taken in each child. The NIOX system was calibrated using a 200 ppb NO tank (Lindegas Hoek Loos Speciality gases, Amsterdam, Netherlands), according to manufacturer's instructions. As spirometric maneuvers are known to affect NO readings, exhaled NO measurement was done prior to lung function testing.

Skin prick tests

All BPD and preterm subjects and healthy controls with suspected atopy underwent skin prick testing with a panel of common inhalant allergens: mixed grass pollen, *Parietaria*, *Artemisia vulgaris*, *Dermatophagoides pteronissynus* and *D. farinae*, *Alternaria*, dog and cat (Lofarma, Milano, Italy). Glycerine with histamine 1:1000 was used as a positive control and glycerine alone as a negative control. The skin tests were done on the volar side of the forearms and were considered positive if they resulted in a wheal reaction greater than 3 mm.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) for normally distributed data and as median and interquartile range (IQR) for not normally distributed data. Data of the three subgroups were tested for difference using ANOVA. Correlations were performed by Pearson's test for normally distributed data and by Speraman's test for not normally distributed data. Statistical

significance was assumed for p values of less than 0.05. Statistical analysis was performed using SigmaStat version 3.0.

RESULTS

Characteristics of the subject

Neonatal characteristics of the subjects are shown in table 1.

	BPD	Preterm non-BPD
Gestational age at birth, weeks	29 [27-30]	28 [27-30]
Birth weight, grams	990 [847-1157]	960 [845-1090]
Ventilator treatment, days	20 [11-32]	1 [1-2]
Supplemental oxygen, days	86 [41-161]	3 [1-5,5]
Surfactant-treated newborns	20/34	5/20

Table 1. Neonatal data of BPD and preterm non-BPD children Values are expressed as median and interquartiles [IQR] or percentages of subjects.

Skin prick test

Skin prick tests for common aeroallergens were positive in 7/34 BPD patients, 7/20 preterm non BPD patients and 4/34 healthy controls.

Lung function parameters

Spirometry test result showed evidence of airflow limitation in BPD survivors and a milder but still statistically significant airflow limitation in subjects born preterm without BPD compared to healthy subjects. (FEV_1 %pred of $73,5 \pm 3,2$, $87,7 \pm 3,4$ and $97,6 \pm 2,1$ respectively. FEF_{25-75} %pred. of $63 \pm 5,1$, $83,8 \pm 7,4$ and $113,2 \pm 3,7$ respectively; $FEV1/FVC$ of $76,5 \pm 2,1$, $83,6 \pm 2$ and $89,8 \pm 1$ respectively).BPD

survivors have also lower FVC levels compared to healthy children. Spirometry results are shown in table 2. Airway obstruction was reversible in 50% of the cases in the BPD group and in 37% of the cases of preterm-non BPD group patients.

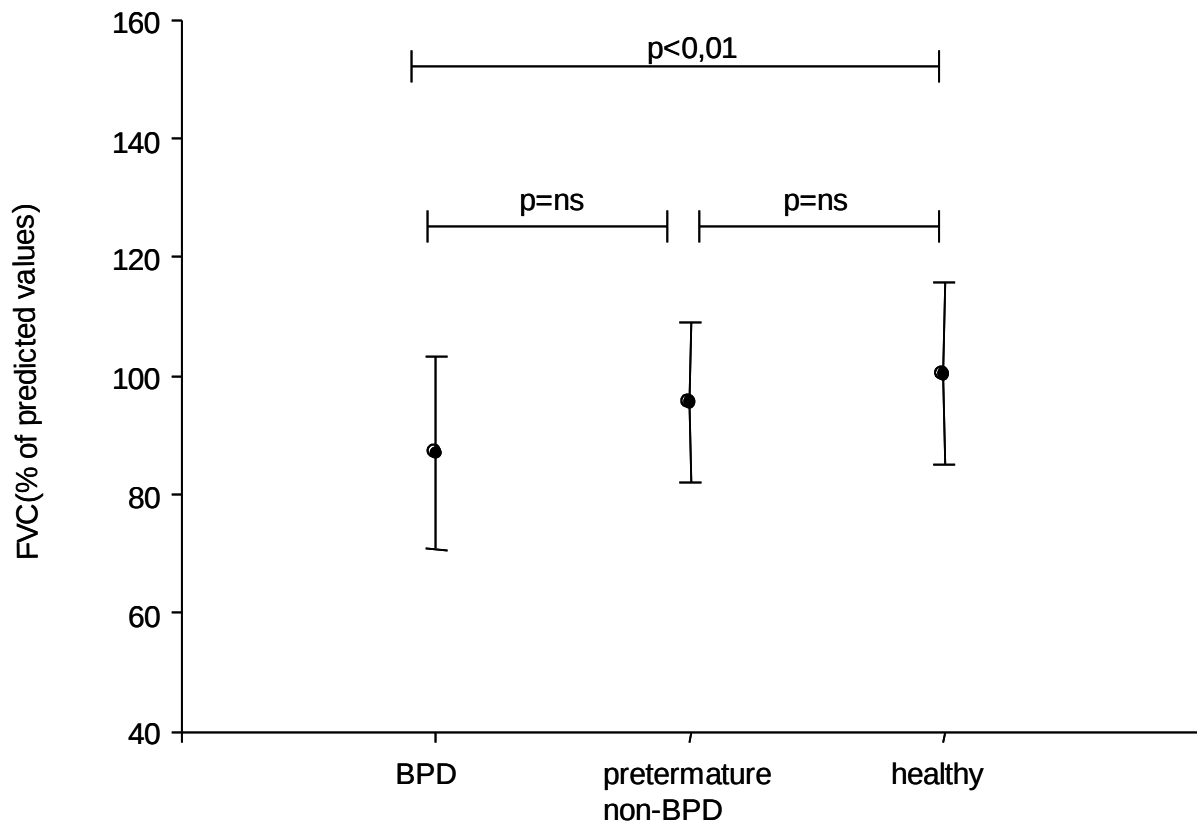


Figure 1. Median and interquartiles of FVC values in adolescents born preterm with and without BPD as compared with healthy controls born at term

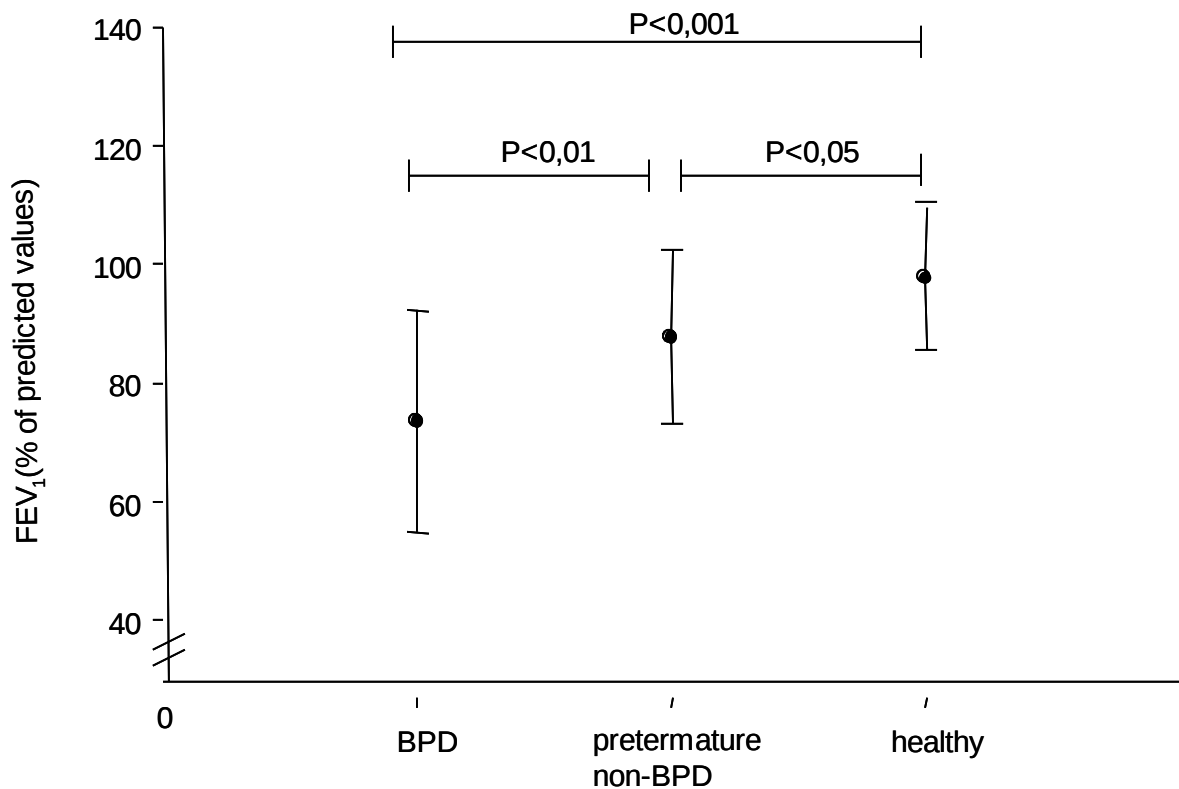


Figure 2. . Median and interquartiles of FEV₁ values in adolescents born preterm with and without BPD as compared with healthy controls born at term

FE_{NO}

No differences emerged in FE_{NO} levels between children with BPD, prematurity and healthy controls (FE_{NO} 11,4 [8,4-15,7], 14,1 [8,4-17,5] and 12,6 [7,9-19,2] ppb respectively, p ns). As atopy is known to affect FE_{NO} levels, a subgroup analysis of BPD patients, preterm non BPD and healthy controls without positivity of skin prick tests for atopy showed as well no difference in FE_{NO} values.

8-isoprostane exhaled breath condensate

Median exhaled 8-isoprostane concentration was significantly higher in BPD and preterm children compared to healthy controls (9,5 [7,3-12,2] ppb in BPD children, 10 [8,1-16] ppb in preterm children and 3,2 [1,3-6,5] ppb in healthy controls; p<0,001).

	BPD	Preterm non-BPD	Healthy controls
FVC (% pred.)	86,9±2,8 §	95,5±3,1*	100,3±2,6
FEV ₁ (%pred.)	73,5±3,2 ††	87,7±3,4 ξ	97,6±2,1
FEV ₁ /FVC	76,5±2,1 ‡	83,6±2*	89,8±1
FEF ₂₅₋₇₅ (%pred.)	63±5,1 ††	83,8±7,4 ‡	113,2±3,7
FE _{NO} (ppb)	11,4 [8,4-15,7] *	12,6 [7,9-19,2] *	14,1 [8,4-17,5]
8-Isop (pg/mL)	9,5 [7,3-12,2] ‡Φ	10 [8,1-16] ‡	3,2 [1,3-6,5]

Table 2. Spirometric parameters, exhaled nitric oxide values and EBC 8-isoprostane concentrations in BPD survivors, non BPD preterm controls and healthy controls. Values are expressed as mean (\pm standard error of the mean) for normally distributed data and as median [interquartiles] for not normally distributed data.

*p ns compared to healthy controls

ξp<0,05 compared to healthy children

§p<0,01 compared to healthy children

‡p<0,001 compared to healthy children

†p<0,01 compared to preterm non BPD

Φp ns compared to preterm non BPD

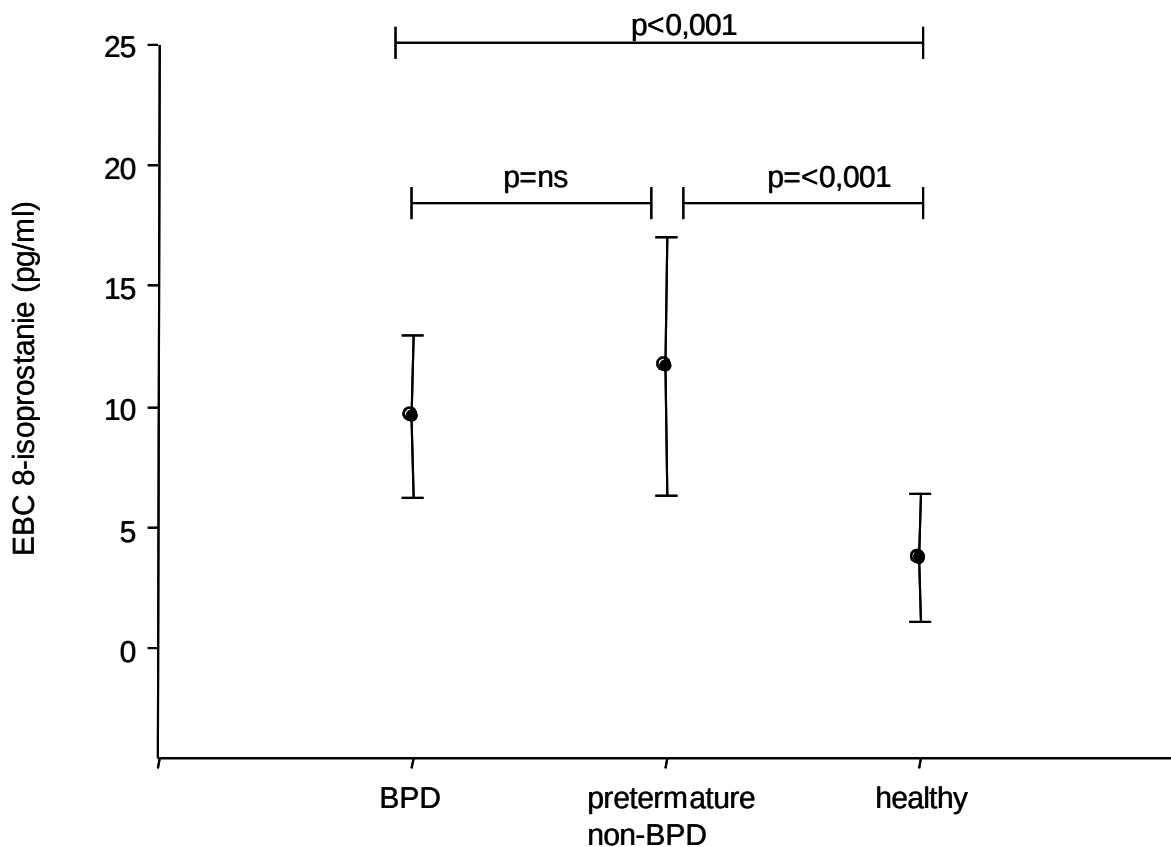


Figure 5. Concentrations of 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with BPD, prematurity and healthy controls.

Correlations of EBC 8-isoprostane with lung function and FE_{NO} measures

The measures of 8-isoprostane show a statistically significant negative correlations with all the spirometric parameters. [FVC (p 0,001 r -0,26), FEV₁ (p< 0,0001 r-0,49), FEV₁/FVC (p 0,02 r -0,23), FEF 25-75 p <0,0001, r-0,39)]. No correlation was found between EBC 8-isoprostane values and FE_{NO} levels.

DISCUSSION

To our knowledge this is the first study reporting increased 8-isoprostane levels in EBC of a group of adolescents with BPD, by comparison with healthy control subjects. Elevated 8-isoprostane levels has been also found in a control group of adolescents born preterm without history of BPD.

As in the previous literature, most of the patient we studied had some degree of airflow limitation (mean FEV₁ 73,5% pred.). Even if the diagnosis of bronchopulmonary dysplasia identifies most patients at greater risk for long term respiratory sequelae, prolonged oxygen dependence in the neonatal period does not accurately predict the long term respiratory outcome and prematurity per se may correlate with respiratory symptoms and long-term function anomalies, regardless of the duration of oxygen dependence in the neonatal period (2). In our study also adolescents born preterm without history of BPD have worse lung function parameters respect healthy controls, even if in the normal range values (figure 1, 2).

Only sparse information is available on the mechanisms underlying the long term clinical and functional manifestations of BPD. Some of the clinical features and the abnormal airway physiology (airflow limitation and airway hyperresponsiveness)

that BPD shares with asthma might suggest a common mechanism responsible for lung function impairment. Previous data evidenced that eosinophilic inflammation (a typical steroid-responsive feature of asthma) is not present in survivors of bronchopulmonary dysplasia as suggested by normal to low levels of FE_{NO} and different mechanisms of airway hyperresponsiveness as compared with children with asthma (13,14). In line with these data, our study doesn't show any difference in FE_{NO} between the three groups (BPD, preterm, healthy).

On the other hand this study showed that exhaled 8-isoprostane, marker of oxidative stress, is increased about threefold in EBC of children born preterm, with or without BPD compared to healthy children (Figure 3). We also found a significant negative correlation between 8-isoprostane and all the spirometric parameters, especially for the indicators of airway obstruction. Oxidative stress can cause airway narrowing both by directly damaging the epithelium due to lipid peroxidation and because of the bronchocostriction induced by the release of arachidonic acid (15,16). 8-isoprostane can also cause smooth muscle contraction by a direct receptor mediated stimulation (7). Previous study have demonstrated increased levels of 8-isoprostane in EBC of patients with asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and exercise induced bronchocostriction. It has been reported a link between 8-isoprostane levels and airflow limitation in asthmatic patients, with a correlation between oxidative stress and asthma severity (17-21). Our data evidenced a link between airway function and oxidative stress also in children with a history of prematurity..

FE_{NO} levels did not differ between the three groups, nor did they correlate with 8-isoprostane levels or spirometric parameters. 8-isoprostane is formed by oxidative metabolism of arachidonic acid mostly via a non-enzymatic reaction and only in small amount via a cyclooxygenase pathway. This could explain increased 8-

isoprostane levels despite normal FE_{NO} values and underlies that a single mediator cannot serve as a global marker of airways inflammation. Moreover 8-isoprostane levels are not decreased by steroid therapy (22) and this could explain why the use of ICS for prophylaxis in children with established BPD has neither reduced the incidence of symptoms nor improved the outcome (23-25). Our data, for the first time, suggest that adolescent patients survivors of BPD have respiratory functional abnormalities associated with ongoing oxidative stress which could contribute to persistent airway obstruction. Although sample size is small and prevent definite conclusions the presence of elevated 8-isoprostane in EBC of these patients could suggest a potential role for antioxidant therapy.

A similar but milder airflow limitation has also been documented in infants and children born preterm without BPD suggesting that preterm delivery may inherently cause some degree of airway function disruption. The function abnormalities have been usually attributed to developmental interferences with inability to reach a full structural lung complexity; in our study preterm delivery seems to be associated also with oxidative processes still ongoing for many years.

In conclusion the study confirmed that even if respiratory symptoms fade over the time, children with a history of prematurity have a persistence of pulmonary function derangement and that BPD represents the worse end of a broad spectrum of respiratory disorders associated with premature birth. The lung function impairment couldn't represent only a sequela of the initial damage with unsuccessful recovery of the injury but an increased lung oxidative stress seems to be still ongoing. Further study are necessary to determine a potential role for antioxidant therapy in these patients.

REFERENCES

- 1 Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R et al. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:356-396.
- 2 Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Eng J Med* 2007;357:1946-1955.
- 3 Filippone M, Bonetto G, Cherubin E, Carraro S, Baraldi E. [Childhood course of lung function in survivors of bronchopulmonary dysplasia](#). *JAMA* 2009;302:1418-20.
- 4 Zeiger RS, Szefer SJ, Phillips BR et al. Response profiles to fluticasone and montelukast in mild-to-moderate persistent childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:45-52
- 5 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ on behalf of ATS/ERS task force on exhaled breath condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respr J* 2005;26:523-548.
- 6 Fam SS, Morrow DJ. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem*.2003;10:1723-1740.
- 7 Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1067-1082.
- 8 Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Eng J Med* 1967; 276:357-368.
- 9 Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005;5:10.

- 10 Caglieri A, Goldoni M, Acampa O et al. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect.* 2006;114:542-546.
- 11 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al on behalf of ATS/ERS Task Force. 9 Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26:319-38
- 12 American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. Joint Position Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930.
- 13 Baraldi E, Bonetto G, Zacchello F, et al. Low exhaled nitric oxide in school-age children with bronchopulmonary dysplasia and airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:68-72.
- 14 Kim do K, Choi SH, Yu J, et al. Bronchial responsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate in preschool children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol.* 2006 ;41:538-43.
- 15 Schünemann HJ, Freudenheim JL, Grant BJ. Epidemiologic evidence linking antioxidant vitamins to pulmonary function and airway obstruction. *Epidemiol Rev.* 2001;23:248-67
- 16 Barreto M, Villa MP, Olita C, et al. 8-isoprostane in exhaled breath condensate and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents. *Chest.* 2009;135:66-73.
- 17 Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, et al. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:216-20.

- 18 Zanconato S, Carraro S, Corradi M, 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.
- 19 Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, et al. [Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity.](#) Respir Med. 2009;103:750-6.
- 20 Robroeks CM, van de Kant KD, Jöbsis Q, et al. [Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma.](#) Clin Exp Allergy. 2007;37:1303-11.
- 21 Carraro S, Cogo PE, Isak I, et al. [EIA and GC-MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma.](#) Eur Respir J. 2009 Nov 6. [Epub ahead of print]
- 22 Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. [Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma.](#) Respir Res. 2005 Jul 21;6:79
- 23 Pantalitschka T, Poets CF. Inhaled drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia. Pediatr Pulmonol. 2006 41:703-8.
- 24 Chan CH, Cohen M, Pang J. [The effects of inhaled corticosteroids on chronic airflow limitation.](#) Asian Pac J Allergy Immunol. 1993;11:97-101.
- 25 Dugas MA, Nguyen D, Frenette L, et al. [Fluticasone inhalation in moderate cases of bronchopulmonary dysplasia.](#) Pediatrics. 2005;115:e566-72.