



"Alimenti e salute umana"

Ciclo XXXII

**IL MULTIPLE BREATH WASHOUT NELLA VALUTAZIONE
DEL DANNO POLMONARE CRONICO NEI BAMBINI NATI
CON GRANDE PREMATURITA'**

Dottorando

Dr. Michele Arigliani

Michele Arigliani

Supervisore

Prof. Giuseppe Damante

Giuseppe Damante

Anno: 2019

ABSTRACT

Title: The use of multiple breath washout to assess chronic respiratory impairment in children born very premature

Background. Survivors of very premature birth (<32 weeks of gestation) may have long-term respiratory impairment, especially in the presence of bronchopulmonary dysplasia (BPD). Multiple breath washout (MBW) derived indices (Lung Clearance Index -LCI-, Scond, Sacin) might be useful markers of chronic respiratory impairment in 1) children born <32 weeks of gestation with a history of intrauterine growth restriction (IUGR) and in 2) extremely preterm born children (<28 weeks). We evaluated whether these indices are more sensitive than more commonly used lung function tests (spirometry and TLco) to detect abnormal lung function in these groups of preterm children.

Methods. In two different studies, spirometry, TLco and MBW (LCI, Sacin, Scond) were cross-sectionally evaluated in subjects aged 8.0-15.0 years who were born at <32 weeks of gestation with and without a prenatal diagnosis of IUGR or belonging to the cohort of children born at <28 weeks of gestation in Udine, between 2004 and 2010. A control group of children born ≥ 37 weeks of gestation was also included.

Results. 1) Effects of IUGR on lung function in very preterm children

Final study population included 28 very preterm children with IUGR, 67 without and 67 controls. Preterm children with IUGR had much higher prevalence of BPD (42% vs 10%) and significantly lower FEV₁ z-score than those without IUGR (-0.51 ± 0.94 vs 0.15 ± 1.08 ; $P = 0.006$), whereas LCI and TLCO did not differ between the two groups.

At simple regression, while BPD was significantly associated with either FEV₁ z-score, TLco z-score and LCI, IUGR was negatively associated only with FEV₁ z-score ($B = -0.66$;

$P = 0.004$). At mediation analysis, 35% of the total effect of IUGR on FEV_1 depended on BPD.

2) Effects of extremely preterm birth on lung function at school age.

47 extremely preterm born children and 60 controls were included in the final analysis.

There were significant differences between children born <28 weeks of gestation and controls at term for FEV1 z-score, FVC z-score, TLco z-score, LCI and Scond, but not for Sacin. Among extremely preterm children, those with BPD (36%) had a much lower FEV_1 z-score than those without BPD (-1.18 vs 0.02, $P < 0.0001$) but did not differ in the MBW indices. 29% of children born extremely preterm had abnormal Scond (>95% percentile of controls) but only 14% had abnormal FEV_1 z-score (<5° percentile of the reference population). At multiple linear regression, current asthma had a positive association with Scond ($B = 0.019$, $P = 0.04$) and also increasing age had a small but significant effect ($B = 0.004$, $P = 0.004$).

Conclusions

IUGR affects larger airway function in survivors of very preterm birth at school age but not markers of more peripheral function, such as LCI and TLco.

Among children born <28 weeks of gestation, Scond, reflecting ventilation inhomogeneity mainly arising within small airways, was the index more frequently abnormal in both children with and without BPD but the clinical meaning of this finding should be clarified through prospective studies.

SOMMARIO

BACKGROUND	7
Introduzione	7
La spirometria	8
Il Multiple Breath Washout	11
La diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio	18
Lo sviluppo polmonare	20
Gli effetti della prematurità sullo sviluppo polmonare	23
La broncodisplasia polmonare	25
Gli effetti della grande prematurità sulla funzionalità polmonare	29
Gli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità polmonare	32
Prematurità e rischio di aging precoce del polmone	33
La restrizione di crescita intrauterina	36
Gli effetti della restrizione di crescita intrauterina sullo sviluppo polmonare: evidenze sperimentali	39
Gli effetti della restrizione di crescita intrauterina sulla funzionalità polmonare	40
Razionale	42
Ipotesi di studio	43
Obiettivi	44
METODI	46
Disegno del progetto	46
Definizioni e assessments	47
Studio 1: impatto dello IUGR sulla funzionalità respiratoria di grandi pretermine	53
Potenza dello studio e analisi statistica nello studio 1.....	54
Studio 2: funzionalità respiratoria nei pretermine estremi	55
Potenza dello studio e analisi statistica nello studio 2.....	55
Criteri d'esclusione	56
RISULTATI	57
Validazione del MBW	57
Studio 1: effetti dello IUGR sulla funzionalità respiratoria in grandi pretermine in età scolare	59
Caratteristiche generali e perinatali dei partecipanti.....	59
Funzionalità polmonare nei bambini grandi pretermine e nei controlli.....	64
Studio 2: Effetti della prematurità estrema sugli outcomes respiratori in età scolare	70
Caratteristiche della study population.....	70
DISCUSSIONE	82
Validazione del device per MBW	83
Studio 1: gli effetti dello IUGR sulla funzionalità respiratoria in età scolare di grandi pretermine	84
Confronto dei risultati con i dati di letteratura.....	84
Interpretazione dei risultati e possibili meccanismi fisiopatologici.....	87
Punti di forza e debolezze dello studio sullo IUGR.....	89
Studio 2: gli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità respiratoria in età scolare	90
MBW: confronto con la letteratura e interpretazione dei risultati.....	90
Spirometria e TLCO: confronto con la letteratura e interpretazione dei risultati.....	95
Punti di forza e debolezze dello studio sui pretermine estremi.....	98
Conclusioni	100
REFERENZE	102

RINGRAZIAMENTI

Sono particolarmente grato alla Prof.ssa Paola Cogo che ha reso possibile questo progetto, mettendomi nelle condizioni di poterlo svolgere nonostante l'impegno di un lavoro clinico full-time. La sua guida sapiente riguardo la metodologia della ricerca e il suo supporto morale sono stati fondamentali per poter realizzare quanto avevamo ideato insieme.

La raccolta dati relativa a questa tesi non sarebbe mai stata possibile senza l'apporto prezioso di alcuni colleghi specializzandi che vorrei ringraziare di cuore: Chiara Stocco, Elena Valentini, Carlo De Pieri, Maria Elena Ferrari. Un ringraziamento speciale va anche ad alcuni tesisti di medicina che hanno collaborato attivamente allo studio, offrendo un contributo fondamentale: Cristina Canciani, Elisa Cuberli e Vincenzo Barbato.

Mi preme inoltre ringraziare calorosamente l'Associazione ALPI (Allergie e Pneumopatie Infantili) che ha permesso la realizzazione di questo progetto, donando il device per l'esecuzione del Multiple Breath Washout alla Clinica Pediatrica di Udine. In particolare, un pensiero di ringraziamento speciale va al Dr. Mario Canciani che, come responsabile scientifico dell'associazione ALPI, ha compreso e fatto sue le motivazioni scientifiche alla base di questo progetto, spendendosi perché andasse in porto. Un ringraziamento va ancora al Dr. Luigi Castriotta, che ha eseguito alcune delle analisi statistiche presentate in questa tesi, dimostrando una pazienza e una disponibilità ammirabili.

Infine il ringraziamento più importante va a mia moglie Chiara che, specialmente negli ultimi mesi della nostra permanenza a Udine con una bimba di pochi mesi a casa, ha permesso che mi dividessi tra il lavoro clinico e quello di ricerca, sopportando pazientemente e con comprensione il tempo che ho dedicato a questo progetto e che avrei potuto spendere con la famiglia.

BACKGROUND

Introduzione

Il polmone è un organo estremamente plastico, il cui sviluppo è influenzato in maniera sostanziale da determinanti ambientali, sia durante la vita fetale, che nelle prime fasi della vita post-natale.[1] La grande prematurità (<32 settimane età gestazionale -EG-) comporta la nascita ad un'epoca in cui lo sviluppo polmonare, specialmente quello delle vie aeree distali intracinarie, è largamente incompleto.[2] La ventilazione meccanica e la supplementazione di ossigeno prolungata che spesso si rendono necessarie per permettere la sopravvivenza di questi bambini contribuiscono a determinare alterazioni fisiopatologiche che possono risultare nella broncodisplasia (BPD)[3] e in un'alterata funzionalità respiratoria a lungo termine.[4–8] Il danno polmonare cronico è generalmente tanto più grave quanto più precoce è l'età gestazionale alla nascita, facendo sì che i prematuri estremi nati prima di 28 settimane EG siano quelli a maggior rischio di BPD e di esiti respiratori cronici legati alla prematurità.[9–12]

Tra i fattori ambientali che influenzano lo sviluppo del feto, incluso l'apparato respiratorio, l'adeguatezza degli apporti nutritivi ha un ruolo di primaria importanza.[13] Studi sperimentali su modelli animali dimostrano che situazioni fisiopatologiche che inficiano la nutrizione fetale, come una ridotta funzionalità placentare, patologie vascolari materne o la malnutrizione materna, comportano un alterato sviluppo polmonare.[14] Studi di coorte che hanno seguito l'evoluzione della funzionalità polmonare nel tempo di soggetti nati a termine, dimostrano che la scarsa crescita fetale[15] o il basso peso alla nascita[16] comportano un effetto negativo sui volumi respiratori dinamici in età scolare.

Studi longitudinali di grandi prematuri seguiti fin dalla nascita hanno dimostrato come la traiettoria dello sviluppo polmonare di questi soggetti durante l'infanzia e l'adolescenza sia generalmente inferiore rispetto a quella dei bambini nati a termine[17], così come il picco di funzionalità respiratoria in età adulta.[7] I dati epidemiologici, come atteso, sono ancora più negativi nella popolazione dei pretermine estremi nati < 28 settimane,[18,19] mentre non ci sono evidenze riguardanti i grandi prematuri con storia di IUGR. Questi dati rappresentano un elemento di preoccupazione dal punto di vista clinico, considerando che un ridotto picco di funzionalità respiratoria in età giovane adulta è associato con maggior rischio di broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)[20,21] e mortalità precoce.[22,23]. I paragrafi successivi offrono un'overview sui tests respiratori usati in questo progetto, sulla fisiologia dello sviluppo polmonare, sugli effetti della prematurità, della BPD e della scarsa crescita fetale sullo sviluppo polmonare e sugli outcomes respiratori a lungo termine. Saranno successivamente esposti razionale e obiettivi della tesi.

La spirometria

La spirometria valuta le curve flusso/volume, volume/tempo, flusso/tempo ottenute da un'espiazione massimale partendo dalla capacità polmonare totale fino al volume residuo. All'inizio della manovra espiratoria forzata, il flusso aumenta rapidamente fino a un picco di flusso, ma poi diminuisce progressivamente man mano che il volume espirato aumenta e quello intratoracico diminuisce. Un principio fondamentale alla base della spirometria è che flusso e volumi espirati diventano indipendenti dallo sforzo al di sopra di una certa soglia di pressione intra-toracica.[24] Questo assicura la ripetibilità della misura intra-soggetto, in quanto le curve flusso-volume e volume-tempo ripetute dovrebbero essere

identiche se le proprietà meccaniche dei polmoni sono invariate, il volume iniziale e finale dell'espiazione è lo stesso, e il soggetto genera una pressione intratoracica positiva sufficientemente alta da ottenere una limitazione del flusso (flusso indipendente da sforzo). Una serie di fattori tecnici possono avere un impatto sull'affidabilità della misurazione di FVC, FEV₁ e del picco di flusso espiratorio. I più importanti sono: assicurare che il soggetto compia una rapida e completa ispirazione prima dell'espiazione; assicurare che si raggiunga la limitazione del flusso; e assicurare che l'espiazione continui fino al volume residuo. Inoltre, è essenziale che lo spirometro rispetti gli standards indicati dalla European Respiratory Society/American Thoracic Society (ERS/ATS)[25] e sia correttamente calibrato. Esistono linee guida congiunte ERS/ATS per la corretta esecuzione ed analisi della spirometria.[25] Nei bambini possono rendersi talvolta necessari alcuni accorgimenti particolari rispetto alle linee guida dell'adulto in considerazione delle differenze nei volumi polmonari, come ad esempio la possibilità di accettare una prova spirometrica in cui il tempo di espirio sia inferiori a 6 secondi, purchè gli altri parametri di qualità (inizio deciso della manovra con chiaro e rapido picco di flusso espiratorio, aspetto della curva flusso-volume privo di artefatti, plateau di flusso a fine espirio, differenze tra FEV₁ e FVC di due prove diverse entro il 5% del volume in età scolare ed entro il 10% in età prescolare su almeno 3 prove) siano rispettati.[26]

Le alterazioni delle curve spirometriche possono dipendere da ostruzione delle vie aeree intra- ed extra-toraciche, così come da malattie polmonari restrittive o da debolezza dei muscoli respiratori. Con un'ostruzione lieve delle vie aeree intra-toraciche, il cambiamento più precoce alla spirometria è generalmente una diminuzione del picco di flusso espiratorio (PEF), il cui aspetto diventa meno acuminato alla curva flusso-volume. In caso

di ostruzione moderata o grave delle vie aeree intra-toraciche si verifica una riduzione del FEV₁, mentre l' FVC è relativamente conservato (tranne in caso di ostruzione molto grave in cui si può verificare la chiusura precoce delle vie aeree di conduzione in espirio, con diminuzione più importante del FVC, oltre che del FEV₁), quindi anche il rapporto FEV₁/FVC è ridotto e la curva flusso volume avrà un aspetto concavo verso l'alto. In questi casi, anche il FEV_{25-75%} che è il volume d'aria compreso tra il 25% e il 75% del volume totale espirato, e si pensa rappresenti meglio l'ostruzione delle vie aeree di conduzione di calibro più piccolo, può essere diminuito. Nel follow-up della prematurità, il FEV₁ è la principale misura di riferimento, in quanto i grandi prematuri, specialmente in presenza di BPD, possono avere un pattern ostruttivo con diminuzione preponderante del FEV₁. Una descrizione dettagliata degli effetti dell'ostruzione extra-toracica delle vie aeree, delle malattie polmonari restrittive e della debolezza dei muscoli respiratori sulla spirometria, non essendo di comune riscontro nei prematuri, esula dagli obiettivi di questo capitolo. Un limite della spirometria è la sua scarsa sensibilità per la funzionalità delle vie aeree periferiche. L'albero respiratorio è diviso in vie aeree di conduzione (generazioni 0-16) e intra-acinari (generazioni 17-23). Le vie aeree periferiche o "piccole" sono definite arbitrariamente come quelle con un diametro luminale inferiore a 2 mm (negli adulti) e corrispondono alle generazioni 8-23 delle vie aeree sulla base dei dati post-mortem degli adulti.[27].

La spirometria fornisce informazioni sui flussi ed è influenzata principalmente da cambiamenti nelle resistenze delle vie aeree. La velocità lineare dei gas nelle vie aeree periferiche è molto bassa e la resistenza a tale livello non costituisce il meccanismo principale per la limitazione del flusso espiratorio durante la spirometria. Nonostante le vie

aeree periferiche rappresentino il 95% del volume polmonare totale, esse rendono ragione solamente del 10-20% della perdita di pressione flusso-resistiva delle vie aeree in toto nei polmoni di adulti sani.[28] Per tale ragione la spirometria riflette la funzionalità delle vie aeree principali ed è relativamente poco sensibile alla presenza di alterazioni precoci delle vie aeree periferiche.[29]

Il Multiple Breath Washout

Le vie aeree periferiche sono state definite “*silent lung zone*” a causa della scarsa sensibilità dei test respiratori convenzionali per la funzionalità di questa regione del polmone. Il washout dei gas inerti misura l'inomogeneità della ventilazione polmonare e può fornire informazioni riguardo la funzionalità delle piccole vie aeree.[30]

Sono due i meccanismi che regolano il trasporto dei gas all'interno delle vie aeree: la convezione e la diffusione. Il trasporto e il gas mixing per convezione è prevalente nelle vie aeree di conduzione, dove la velocità lineare del flusso aereo è relativamente elevata, ed è determinato da un gradiente pressorio.[16,17] Man mano che le vie aeree si dividono in rami più piccoli nell'apparato respiratorio, l'area totale cross-sectional attraverso cui transita il gas aumenta notevolmente e la velocità lineare del flusso di gas diminuisce drammaticamente nelle vie aeree parallele di calibro più piccolo.[30] All'interno degli acini, che rappresentano le unità respiratorie terminali (circa 20.000-30.000 in totale) e sono costituiti da un gruppo di alveoli e dalle vie aeree delle generazioni 17-23 (bronchiolo respiratorio terminale, dotti alveolari e sacche alveolari), il flusso di gas avviene principalmente per diffusione dal punto di maggior concentrazione a quello di minore concentrazione, fino a raggiungere l'equilibrio.[32] All'ingresso dell'acino, i contributi relativi della convezione e della diffusione molecolare al *gas mixing* diventano simili, formando un

"fronte di diffusione-convezione".[30] Le alterazioni delle vie aeree di piccolo calibro influenzano la distribuzione della ventilazione tra le diverse unità parallele e, a seconda che il processo patologico sia localizzato prossimalmente all'acino o all'interno di esso, possono determinare un deficit di gas mixing o inomogeneità della ventilazione dipendente prevalentemente dal meccanismo della convezione (*Convention Dependent Inhomogeneity -CDI-*) o dall'interazione tra convezione e diffusione al livello del fronte diffusione-convezione all'ingresso dell'acino (*Diffusion-Convention Dependent Inhomogeneity -DCDI-*).[28] Più precisamente il CDI riflette l'effetto combinato delle differenze nella distribuzione della ventilazione tra le unità polmonari che condividono i punti di diramazione (*branching point*) prossimalmente all'acino e il riempimento e lo svuotamento sequenziale tra queste unità, mentre il DCDI riflette asimmetrie strutturali tra i punti di diramazione all'interno dell'acino, come per esempio differenze nei volumi sottesi ai rami di un *branch point* o differenze nell'area cross-sectional di due afferenti di un *branch point*, che influenzeranno il gas mixing al fronte diffusione-convezione all'ingresso dell'acino. Da queste premesse, si capisce come il fattore che più fortemente danneggia il gas mixing, ritardando di conseguenza il washout di un gas inerte, è una distribuzione "patchy" (non uniforme) del danno nelle piccole vie aeree, che influirà più fortemente sul CDI o sul DCDI a seconda della localizzazione delle lesioni nell'albero respiratorio. Dal washout dei gas inerti si sono sviluppati principalmente due test: il *single breath nitrogen washout* (SBW) e il *multiple breath washout* (MBW). Mentre il SBW richiede una manovra a capacità vitale forzata, il MBW viene effettuato a volume corrente ed è eseguito con buone percentuali di successo anche in età prescolare, a partire dai 3 anni.[33]

Con il nitrogen MBW utilizzato in questo progetto, oggi disponibile attraverso un device commercializzato (Exhalyzer D, Ecomedics, Svizzera), al bambino viene richiesta una minima coordinazione e collaborazione per eseguire il test, durante il quale deve respirare con un pattern regolare attraverso un boccaglio (con clip tappa-naso per evitare leaks), attraverso cui viene erogato ossigeno al 100%. L'ossigeno, disloca l'azoto residente nei polmoni che viene progressivamente esalato. L'end point del test è quando l' N_2 esalato raggiunge una concentrazione di 1/40 rispetto a quella di partenza, scendendo sotto il 2%.

[30] Diversi indici d'inomogeneità della ventilazione nei polmoni possono essere calcolati a partire dalla curva del washout (end-tidal gas concentration vs volume cumulativo esalato).

(figura 1)

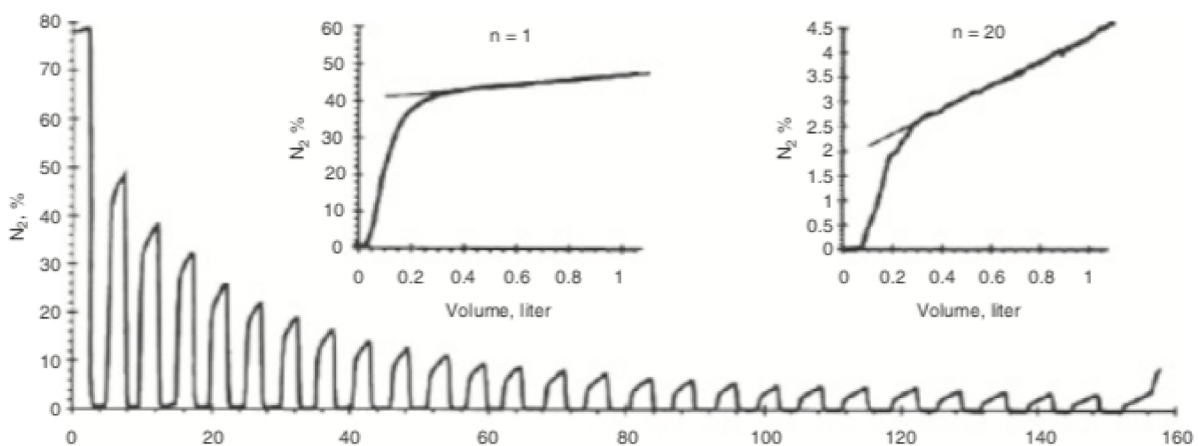


Figura 1. Curva del N_2 MBW (in basso). I due espirogrammi mostrano lo slope di fase III dei respiri 1° e 20° del washout. Modificato da *Verbanck et al*[30]

Il *Lung Clearance Index (LCI)* riflette l'inomogeneità della ventilazione generale e rappresenta il numero di turnover (TO) polmonari (1 TO = volume di aria espirata pari alla capacità funzionale residua FRC del soggetto) richiesto per arrivare a una concentrazione di gas inerte pari a 1/40 della concentrazione iniziale.[34] LCI può essere espresso dalla

formula $LCI = CEV$ (cumulative expired volume) / FRC. In presenza di danno delle piccole vie aeree, il gas mixing è deficitario e il tempo necessario per eseguire il washout del polmone dal N_2 si allunga, determinando un aumento dell'LCI.[35] Questo indice stato dimostrato essere più sensibile della spirometria nell'individuare i segni precoci di malattia polmonare nella fibrosi cistica [36–39] e la sua progressione nel tempo[40,41]. Inoltre, in questo gruppo tale indice correla con gli scores di danno polmonare valutato attraverso la risonanza magnetica toracica[42,43] ed è stato già utilizzato come endpoint per trial randomizzati controllati.[44]

Un limite dell'LCI è tuttavia che, se da un lato riflette il deficit di gas mixing o inomogeneità della ventilazione generale, dall'altro non da informazioni sui meccanismi che sono alla base di queste alterazioni, vale a dire una prevalenza di CDI o DCDI, che sono al loro volta informativi sulla sede del processo patologico, rispettivamente prossimale agli acini o intracinare. Queste informazioni sono ottenibili attraverso l'analisi dei cosiddetti indici dello slope di fase III, S_{cond} e S_{acin} (figura 2).

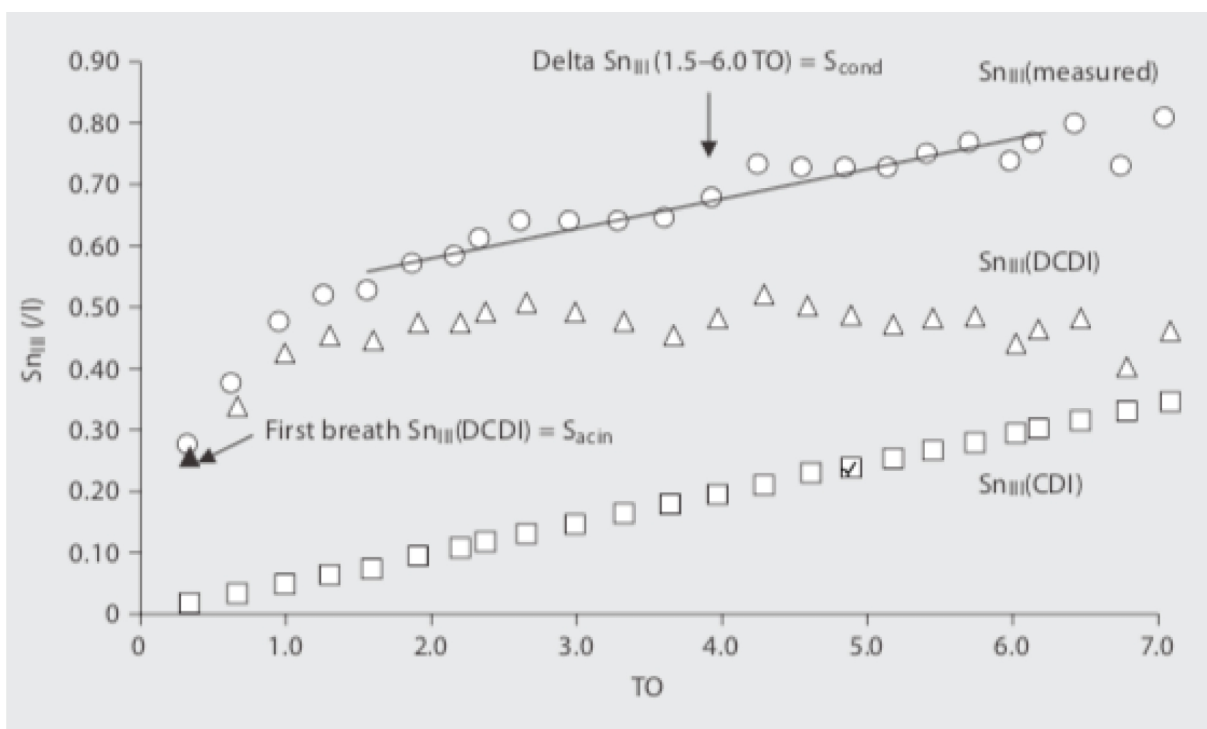


Figura 2. Rappresentazione dei indici derivati dallo slope di fase III in un MBW. Gli slopes di fase III di ogni respiro (numericamente espressi dal coefficiente di regressione lineare dei vari punti di concentrazione di N_2 in fase III vs volume esalato crescente), normalizzati per la concentrazione di N_2 a quel punto del washout e per il volume del respiro (Sn_{III}) sono plottati vs i corrispondenti TO polmonari. Scond è calcolato come l'aumento degli Sn_{III} misurati tra 1.5 e 6.0 TO (numericamente espresso dal coefficiente di regressione degli Sn_{III} dei singoli respiri del washout vs TO). Sacin rappresenta il contributo del DCDI al Sn_{III} del primo respiro del washout ed è calcolato sottraendo al Sn_{III} del primo respiro il contributo del CDI: $Sacin = \text{first breath } Sn_{III} - (\text{first breath TO} * Scond)$. Modificato da *Robinson et al.*[28]

Avendo come riferimento l'espigrogramma del gas tracciante N_2 vs volume esalato (misurato alla bocca) del singolo respiro del washout (figura 1), in cui la fase III riflette il N_2 proveniente dagli alveoli, in condizioni ideali (e puramente teoriche), senza inomogeneità della ventilazione, durante l'esprio tutte le unità polmonari si svuotano contemporaneamente e la concentrazione di N_2 durante la fase III alveolare è costante. In presenza di deficit di gas mixing, il N_2 proveniente da aree di *patchy* disease sarà espirato in ritardo e determinerà una certa pendenza della slope di fase III (figura 1). In presenza d'inomogeneità della ventilazione, la pendenza dello slope di fase III normalizzato per la concentrazione media di gas e per il volume di ogni respiro (Sn_{III}) aumenta progressivamente lungo il washout, perché le unità respiratorie più sane, con minor deficit di gas mixing e Sn_{III} minore, vengono *washed out* per prime. Il Sn_{III} di ogni respiro può essere rappresentato numericamente dal coefficiente di regressione lineare dei valori di concentrazione di N_2 in funzione del volume crescente durante l'esprio (figura 2). Le due componenti dell'inomogeneità ventilatoria, il CDI che riflette il deficit di gas mixing nelle vie aeree di conduzione e il DCDI che riflette il deficit di gas mixing al fronte diffusione-convezione ed è influenzato da alterazioni intracinari, contribuiscono entrambi al Sn_{III} . Tuttavia, studi su polmone da cadavere e modelli sperimentali hanno mostrato l'effetto del DCDI sul Sn_{III} raggiunge un asintote entro i primi 5 respiri del washout (circa 1.5 TO)

quando la diffusione di N_2 nel compartimento intracrinare ha raggiunto l'equilibrio (figura 2), e oltre l'80% del DCDI si esprime già entro il primo respiro del washout.[45] In base a questi presupposti, è stato possibile derivare due indici, Sacin e Scond, che dovrebbero permettere di differenziare gli effetti, rispettivamente del DCDI e CDI sul Sn_{III} e, quindi, dare informazioni sulla sede delle alterazioni lungo l'albero respiratorio che determinano l'inomogeneità ventilatoria (figura 2).[46]

Sacin è derivato dal Sn_{III} del primo respiro del washout (che, come detto, esprime oltre l'80% del DCDI) a cui viene sottratta la componente del CDI $Sacin = \text{first breath } Sn_{III} - (\text{first breath } TO * Scond)$.[35]

Scond invece, viene ottenuto plottando i valori di Sn_{III} vs TO per i respiri del washout compresi tra 1.5 TO (quando il DCDI non aumenta più) e 6 TO, ed è dato dal coefficiente della regressione lineare di questi valori, calcolato in base al metodo tradizionale del *least squares*. In altre parole, Scond quantifica l'aumento della pendenza dello slope di fase III tra i respiri del washout compresi tra 1.5 e 6.0 TO (figura 2).[35]

Nei pazienti con fibrosi cistica Scond e Sacin danno informazioni complementari al LCI[47,48] e sembrano correlare con le informazioni sul danno polmonare regionale provenienti dalla RMN toracica,[49] tranne nei soggetti con malattia polmonare severa in cui Scond non è affidabile a causa del suo metodo di calcolo (a causa dell'alta inomogeneità della ventilazione questi soggetti hanno Sn_{III} già molto alti a inizio washout, che raggiungono un'asimptote intorno a valori di 0.150, pertanto Scond non è in grado di indentificare un aumento consistente dello slope di fase III tra 1.5 e 6.0 TO, dando valori artificialmente bassi).[50,51]

Gli studi del MBW nei bambini in età prescolare con wheezing ricorrente[52] e in asmatici in età scolare,[53–55] hanno mostrato un pattern simile caratterizzato da un LCI lievemente aumentato e Scond elevato, riflettendo *impairment* delle vie aeree conduttive, mentre un coinvolgimento più periferico con Sacin aumentato è stato riportato principalmente nell'asma poco controllato.[56,57].

Il MBW è stato poco esplorato finora nella valutazione del danno polmonare nei pretermine e le evidenze correnti sono fornite nei paragrafi successivi.

La diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio

Il TLCO (Transfer Factor del monossido di carbonio) studia la diffusione del monossido di carbonio (CO) attraverso la membrana alveolo-capillare e riflette l'efficienza degli scambi gassosi a livello polmonare. La capacità di diffusione può essere influenzata da fattori che modificano le proprietà della membrana alveolo-capillare, così come da cambiamenti nella concentrazione ematica di emoglobina e nel volume del sangue capillare polmonare.

L'*uptake* del CO da parte dell'emoglobina (Hb) dei globuli rossi dei capillari della parete alveolare dipende dalla capacità di diffusione della membrana alveolo-capillare (D_M) e dal volume del sangue capillare polmonare (V_c). Situazioni fisiopatologiche che inficiano la superficie totale disponibile per gli scambi respiratori o l'integrità della membrana alveolo-capillare, come le patologie o restrittive o interstiziali o le patologie vascolari polmonari, comporteranno una diminuzione della capacità diffusiva, così come una diminuita disponibilità di Hb a livello del sangue capillare in caso di anemia.[58] Tra i fattori che diminuiscono il TLCO, oltre l'anemia, ci sono anche un'aumentata concentrazione ematica di carbossi-emoglobina (come nei fumatori) e l'altitudine, mentre altri fattori quali un reclutamento maggiore di capillari polmonari, shunt cardiaci sn-dx, la posizione supina

(che modifica la ventilazione/perfusione) e la manovra di Mueller (inspirazione forzata a glottide chiusa) ne determinano invece un aumento.

La modalità più frequente di eseguire il TLCO è quella del "single-breath" in cui il soggetto è attaccato ad un boccaglio collegato ad una bombola che eroga la miscela di gas necessaria per il test (CO 0.3%, Elio 10% + ossigeno e azoto). La manovra inizia con un'espiazione completa fino al volume residuo (RV), seguita da un'inspirazione rapida fino alla capacità polmonare totale (CPT) in <4 secondi. Dopo una pausa respiratoria alla CPT di 10 ± 2 secondi, il soggetto espira rapidamente e completamente a RV. Un sampling alveolare di gas esalato viene eseguito dalla macchina subito dopo che è stato espirato un volume d'aria corrispondente allo spazio morto anatomico e viene analizzato per il calcolo della diluizione del gas tracciante e dell'assorbimento di CO.

Oltre al TLCO, viene fornita la stima del volume alveolare (VA) che è legato al TLco dalla seguente relazione:

$$\text{TLCO (CO transfer factor)} = \text{KCO (efficienza degli scambi per unità polmonare)} \times \text{VA}$$

(numero di unità polmonari).

Il KCO (CO transfer coefficient) è spesso riportato come TLco/VA , tuttavia esso non rappresenta un fattore di correzione del TLco per il volume alveolare, in quanto la relazione tra le due variabili non è indipendente dal volume polmonare (per es. TLCO diminuisce e KCO aumenta a volumi polmonari ridotti in soggetti sani). La comprensione delle relazioni tra KCO, VA e TLCO può essere di aiuto nell'interpretazione dei risultati dei test e i tre parametri andrebbero sempre riportati in termini di z-scores rispetto al teorico. [58] Per esempio in presenza di un'espansione polmonare incompleta, come nelle patologie neuromuscolari, nella scoliosi o in una test in cui il soggetto non ispiri alla TLC, il KCO (TLCO/VA) tenderà ad essere elevato, mentre nelle pneumopatie interstiziali

spesso il KCO è meno ridotto rispetto al TLco. Infine nelle patologie vascolari polmonari, come l'ipertensione polmonare, sia TLco che VA, sono generalmente ridotti, e di conseguenza anche il KCO.[59] Di recente sono stati pubblicati i valori teorici per TLco della Global Lung Initiative (GLI) task force, basati su una raccolta dati internazionale che ha coinvolte migliaia di soggetti caucasici, incluso un subset di bambini.[60]

Esiste la possibilità di misurare separatamente le due componenti del TLco: la capacità diffusiva di membrana (Dm) e il volume polmonare capillare (Vc), che si ritiene rappresentino rispettivamente la superficie alveolare e il volume di sangue all'interno dei capillari polmonari, eseguendo il TLco in aria ambiente e ad alte concentrazioni di ossigeno.[61] Senza entrare troppo in dettaglio il principio che sta alla base di questa misura è che in condizioni di iperossia, l'aumentata tensione di O₂ alveolare aumenta il legame dell'O₂ all'Hb e riduce l'*uptake* del CO, il che diminuisce i valori TLco a concentrazioni di O₂ inspirato elevate rispetto all'aria ambiente. Le misurazioni del TLco in queste due diverse condizioni di concentrazione di O₂ alveolare permette il calcolo del DM e Vc, e può aiutare a capire se la causa di un'altera diffusività è principalmente un'alterazione di numero/dimensioni/caratteristiche degli alveoli o un'inadeguata vascolarizzazione capillare polmonare, o entrambe le componenti.[62]

Lo sviluppo polmonare

Gran parte dello sviluppo polmonare si verifica durante la vita fetale, tuttavia esso prosegue anche durante l'infanzia e le prime fasi dell'età adulta. E' possibile individuare varie fasi dello sviluppo respiratorio (figura 1): *embrionale* (3-7 settimane EG), *pseudoghiandolare* (7-16 settimane EG), *canalicolare* (16-27 settimane EG), *sacculare* (24-36 settimane EG), *alveolare* (36 settimane EG-2 anni).[63] Le vie aeree di conduzione

si formano durante le fasi più precoci della vita fetale e il loro sviluppo, in termini di numero e diramazioni, è completo entro le 16-20 settimane di gestazione. Lo sviluppo alveolare è quasi del tutto completo entro i primi 2-3 anni di vita. Successivamente la crescita polmonare avviene prevalentemente per accrescimento degli alveoli già esistenti.[64]

Nella specie umana il tessuto polmonare si sviluppa durante le prime quattro settimane di gravidanza. Una singola via aerea, che formerà la trachea, si divide dal mesenchima circostante e si dirama formando i due bronchi principali. A 6 settimane i due polmoni possono essere già individuati come organi distinti. Entro le 17 settimane di EG tutte le vie aeree di conduzione prossimali agli acini sono formate. A 24 settimane di EG la forma adulta del polmone è già riconoscibile. La muscolatura liscia delle vie aeree è innervata a partire da 8 settimane EG. A dieci settimane iniziano le sollecitazioni meccaniche del parenchima polmonare a causa dei movimenti respiratori fetali, che sono tra i principali determinanti dello sviluppo polmonare fetale e hanno un'influenza fondamentale sul tasso di proliferazione cellulare, sulla differenziazione delle cellule alveolari epiteliali e sullo sviluppo di una struttura tridimensionale delle vie respiratorie.

Fra la 16° e la 27° settimana di gestazione, le vie aeree periferiche crescono e maturano, le cellule epiteliali si differenziano in pneumociti di tipo I o II e la rete vascolare si sviluppa ulteriormente, con la proliferazione dei vasi e della loro organizzazione in una rete capillare attorno agli spazi aerei. Durante quest'epoca gestazionale, gradualmente, la barriera alveolo-capillare diventa sottile come quella di un adulto e la superficie disponibile per gli scambi gassosi diventa sufficiente per la sopravvivenza. Gli alveoli compaiono dalla 29° settimana EG attraverso un processo di alveologenesi che dipende dalla presenza di elastina, di cellule muscolari lisce e di una rete capillare. Al termine della gestazione si

saranno formati fra i 100 milioni e i 150 milioni di alveoli.[65] Sebbene alcune evidenze suggeriscano che il numero di alveoli dell'adulto (circa 300-600 milioni) venga raggiunto entro i 2-4 anni, non è chiaro il momento in cui gli alveoli smettono di moltiplicarsi.[66] Studi recenti che hanno utilizzato la risonanza magnetica polarizzata a Elio-3 mostrano un aumento degli alveoli, in termini sia di numero, che di dimensioni e complessità, che prosegue anche durante l'adolescenza.[67] Il sistema del surfattante è uno degli ultimi a svilupparsi prima della nascita e nell'uomo matura tra la 29° e la 32° settimana di gestazione. Le cellule di tipo II contenenti corpi lamellari appaiono tra le 20 e le 24 settimane di gestazione, mentre in seguito (circa 30 settimane) il surfattante comincia ad essere secreto nel lume delle vie aeree. Il ruolo fisiologico del surfattante nella vita post-natale è quello di diminuire la tensione superficiale all'interfaccia aria-acqua negli alveoli, impedendo il collasso degli alveoli più piccoli e l'eccessiva espansione di quelli più grandi. In questo modo, il surfattante aumenta la compliance polmonare, previene l'atelettasia alla fine dell'espirazione e favorisce il reclutamento delle vie aeree collassate, facilitando l'espansione dei polmoni. Nella fase sacculare c'è anche un aumento naturale della concentrazione di cortisolo circolante nel feto. Il cortisolo ha molteplici effetti sullo sviluppo polmonare, stimolando la sintesi e secrezione di surfattante, ma anche il rimodellamento dei tessuti, la differenziazione delle cellule epiteliali alveolari e il riassorbimento del liquido polmonare.

Dopo la nascita le dimensioni dei polmoni aumentano proporzionalmente con l'aumento delle dimensioni corporee e sono principalmente influenzate dall'età, dal sesso e dalla razza.[68] Il picco di funzionalità respiratoria viene raggiunto attorno ai 22 anni nell'uomo, e un po' più precocemente nella donna.[1] Dalla nascita alla maturità polmonare il volume

polmonare aumenta fino a 30 volte, la superficie di scambio gassoso fino a 20 volte e la lunghezza e il diametro delle vie aeree raddoppiano.[1]

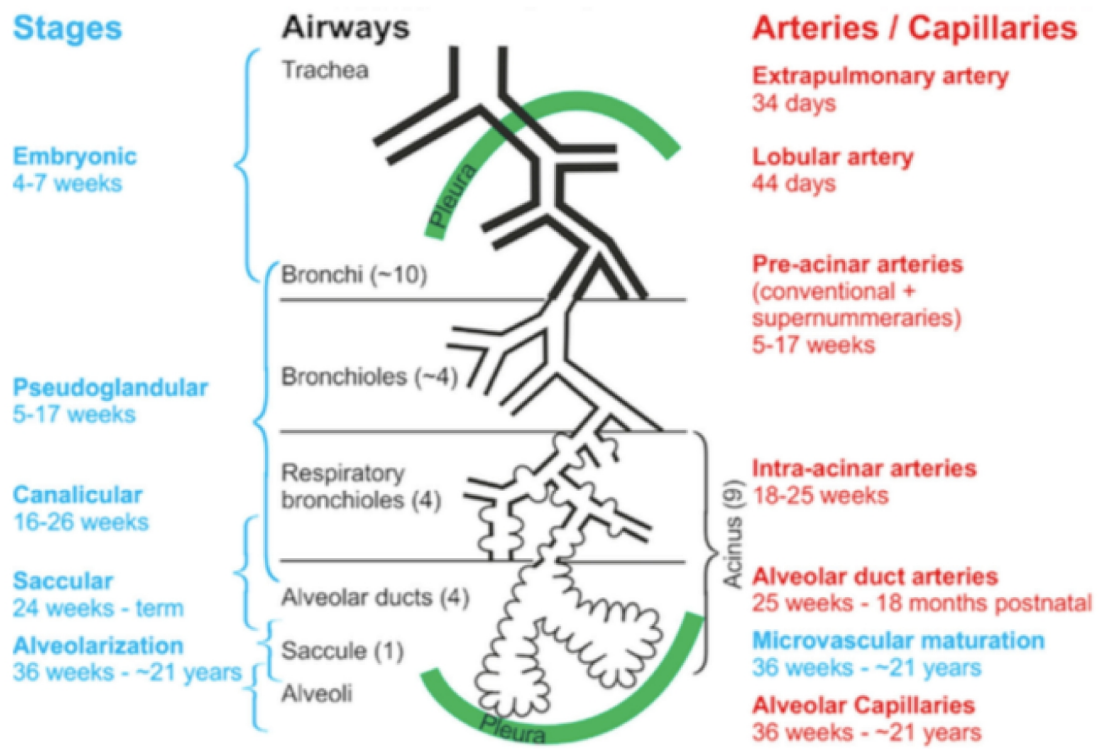


FIGURA 3. Sviluppo delle vie aeree e del parenchima polmonare durante la vita prenatale e postnatale. *Modificato da Schittny et al.[64]*

Gli effetti della prematurità sullo sviluppo polmonare

I bambini che nascono tra le 24 e le 32 settimane di gestazione, oggetto di questo studio, si trovano allo stadio di sviluppo polmonare sacculare. A quest'epoca gestazionale le vie aeree di conduzione e i relativi vasi sanguigni sono formati. Anche lo sviluppo dei bronchioli e dei dotti alveolari, la differenziazione degli pneumociti di tipo II e la definizione dei capillari nella parete alveolare sono quasi completi. Tuttavia, la differenziazione dei sacculi e dotti alveolari in veri alveoli non è ancora avvenuta e la proliferazione della rete capillare è ancora incompleta. Anche i sistemi del surfattante e cortisolo non sono maturi.

Se il sistema del surfattante non si attiva efficientemente dopo la nascita, i fibroblasti possono invadere gli alveoli, dando luogo a membrane ialine spesse e rigide, che determinano la cosiddetta "malattie delle membrane ialine" o "respiratory distress syndrome" (RDS). In presenza di inadeguata produzione di surfattante, il liquido alveolare non viene assorbito efficacemente, con un peggioramento dell'efficienza degli scambi gassosi. Ciò contribuisce all'ipossiemia, che a sua volta ha un effetto vaso-costrittore sui vasi arteriosi polmonari e può portare a sviluppare ipertensione polmonare.

Appare quindi evidente come l'apparato respiratorio dei bambini nati <32 settimane gestazionali sia ancora largamente immaturo alla nascita e, pertanto, questi soggetti sono esposti a un alto rischio di comorbidità respiratorie perinatali, tanto maggiore quanto più precoce è l'età gestazionale. Oltre al deficit di sviluppo dovuto alla prematurità, bisogna anche considerare che l'embriogenesi e il processo di maturazione delle vie aeree durante tutta la vita fetale sono controllati dall'interazione fra fattori di crescita con i loro recettori e con proteine della matrice epiteliale e mesenchimale.[66] Condizioni ambientali sfavorevoli, come la nutrizione inadeguata o il fumo materno, specialmente nella prima parte della gravidanza, possono causare cambiamenti epigenetici che alterano queste interazioni e possono orientare in modo potenzialmente irreversibile lo sviluppo del polmone,[69–73] amplificando gli effetti negativi della nascita pretermine sullo sviluppo polmonare.

Per quanto riguarda la vita post-natale e le possibilità di recupero funzionale dell'apparato respiratorio nei grandi pretermine, ci sono evidenze crescenti di un certo catch-up dell'alveolarizzazione in epoca post-natale [74,75], mentre il potenziale di recupero delle vie aeree di conduzione sembra molto più limitato. Questo fa sì che il pattern ostruttivo con limitazione del flusso aereo sia quello più frequente riscontrato nei prematuri con alterata

funzionalità respiratoria, in particolare in quelli con BPD.[18,76] Si ipotizza che una crescita “disnaptica” del polmone potrebbe essere alla base di questo pattern respiratorio ostruttivo, ovvero che una crescita post-natale sproporzionata del parenchimale polmonare rispetto alle vie aeree di conduzione determini la limitazione del flusso aereo con basso FEV₁ e FEV₁/FVC alla spirometria.[77]

La broncodisplasia polmonare

La BPD è la più temibile complicanza respiratoria a lungo termine legata alla prematurità e riguarda soggetti prematuri con alterazioni polmonari strutturali e infiammatorie che comportano la necessità di ventilazione meccanica e ossigeno terapia prolungata, con un maggior rischio di danno respiratorio cronico. Tale patologia ha un’incidenza di circa il 40% tra i prematuri con peso alla nascita <1000 gr.[78] In accordo alla definizione del *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) la BPD è data dalla necessità di ossigeno-terapia a 28 giorni di vita, indipendentemente dall’età gestazionale.[79] Poiché tale definizione include la stragrande maggioranza dei pretermine estremi nati <28 settimane EG, una definizione pragmatica di BPD adottata in molti studi epidemiologici[4,6,19,80] e che rispecchia meglio l’impatto sugli outcomes respiratori a lungo termine, è la persistenza di ossigeno-dipendenza a 36 settimane di età post-mestruale per bambini nati prima di 32 settimane, e a 56 giorni di vita in bambini nati ≥32 settimane. Nel presente progetto è stata adottata tale definizione pragmatica di BPD. La letteratura più recente suggerisce che una definizione più accurata di BPD nei grandi prematuri è data dalla presenza di SpO₂ <88% entro 1 h dalla sospensione dell’ossigeno a 36 settimane di età post-mestruale.[81]

L'introduzione degli steroidi prenatali e della terapia con surfattante per favorire lo sviluppo polmonare e limitare l'incidenza di RDS nei grandi pretermine, ha in parte modificato le caratteristiche fisiopatologiche e istopatologiche della BPD.[82] La 'nuova' BPD è principalmente caratterizzata dalla combinazione di ipoplasia alveolare e da uno sviluppo vascolare alterato, nonché dalla fibrosi della parete sacculare, con lesioni minime delle vie aeree.[83] Il quadro istopatologico è associato a cambiamenti infiammatori, ad un ampio rimodellamento della matrice extracellulare e ad uno squilibrio nei *pathways* di *signaling* dei fattori di crescita che regolano la maturazione polmonare.[84]

L'impairment dello sviluppo vascolare è un aspetto importante della "nuova" BPD. Le anomalie vascolari sono eterogene e vanno da una riduzione e alterata distribuzione della microvascolarizzazione ad un aumento del numero di capillari che appaiono semplificati e immaturi.[85] Inoltre un sottogruppo di soggetti con BPD svilupperà ipertensione polmonare, caratterizzata da un remodelling anomalo della vascolarizzazione polmonare e da un aumentato tono vasale.[86,87] Sviluppo della rete microvascolare polmonare e alveolarizzazione sembrano essere processi fortemente interdipendenti, come dimostrato da studi sperimentali su animali in cui l'inibizione dell'angiogenesi comporta anche un arresto dello sviluppo alveolare, [83] mentre strategie per promuovere l'alveolarizzazione, favoriscono anche l'angiogenesi.[88]

L'architettura polmonare della BPD è caratterizzata da una semplificazione alveolare con un numero ridotto di alveoli di più grandi, a causa dall'apoptosi di cellule critiche per la formazione di per lo sviluppo alveolare e l'angiogenesi e dell'alterata funzione della matrice extracellulare.[65]

Anche la matrice extracellulare (ECM) polmonare svolge un ruolo essenziale nello sviluppo polmonare, in quanto funge da impalcatura per lo sviluppo di alveoli e vasi.[89] Le anomalie nel turnover della ECM polmonare e la compromissione dell'organizzazione strutturale contribuiscono in modo significativo allo sviluppo della BPD, come dimostrato da studi clinici e sperimentali. Nei neonati con BPD e nei modelli animali della malattia si osservano infatti nella ECM una deposizione disorganizzata di elastina con un deficit di septazione.[90] Nonostante sia presente in misura abbondante, anche la deposizione delle fibre di collagene è alterata.[91]

Tra i meccanismi fisiopatologici noti che contribuiscono allo sviluppo della BPD, si annoverano le infezioni e l'infiammazione,[92], l'impatto della ventilazione meccanica,[93] la tossicità dell'ossigeno,[94] la nutrizione pre- e post-natale.[14] Questi fattori agiscono in modo diverso a seconda del grado di immaturità del polmone, del background genetico individuale, e in base alla combinazione con altre variabili, quali ad esempio il pattern di crescita fetale e postnatale, la disregolazione ormonale e il sesso maschile, che rappresenta un fattore di rischio aggiuntivo per lo sviluppo di BPD.[95,96]

Livelli più alti di citochine infiammatorie sono presenti negli aspirati tracheali di neonati prematuri che successivamente sviluppano BPD, suggerendo che l'infiammazione polmonare precoce è un fattore di rischio indipendente per la malattia.[97] In studi su animali, la somministrazione di endotossina intrauterina altera lo sviluppo fetale e polmonare[98], anche se non è chiaro se nell'uomo la corioamniotite comporti o meno un aumento del rischio di BPD.[99–101] Invece, la sepsi neonatale è chiaramente associata ad un aumentato rischio di BPD.[101,102]

Gli effetti negativi della ventilazione meccanica dipendono in parte dall'overdistensione ciclica del polmone del prematuro. Mentre nella vita fetale la distensione del polmone indotta dai movimenti fetali ha un ruolo fondamentale per vari aspetti dello sviluppo dell'apparato respiratorio,[103–105] l'overdistensione reiterata del polmone che può verificarsi con la ventilazione meccanica stimola una risposta infiammatoria locale che richiama cellule infiammatorie nel polmone.[106–108] e altera pathways di signaling coinvolti nel processo di alveolarizzazione e di angiogenesi[109,110]. Al contrario studi sperimentali su animali prematuri mostrano che strategie di ventilazione meno aggressive o non invasive limitano il danno polmonare.[111,112].

L'iperossia danneggia lo sviluppo polmonare attraverso diverse modalità. In modelli animali essa compromette la funzione mitocondriale[113] e diminuisce le cellule ematopoietiche progenitrici e residenti nel polmone.[114] Gli effetti deleteri dell'iperossia derivano sia da lesioni dirette mediate da specie reattive dell'ossigeno sia da lesioni indirette dovute all'infiammazione polmonare che essa induce.[115,116]

Dell'impatto della nutrizione durante la vita fetale sullo sviluppo polmonare e il rischio di BPD nei prematuri, parleremo più avanti, mentre merita di essere citato in questa sede l'impatto dimostrato di una nutrizione neonatale subottimale e della scarsa crescita in epoca neonatale sul rischio di BPD nei grandi prematuri.[117,118]

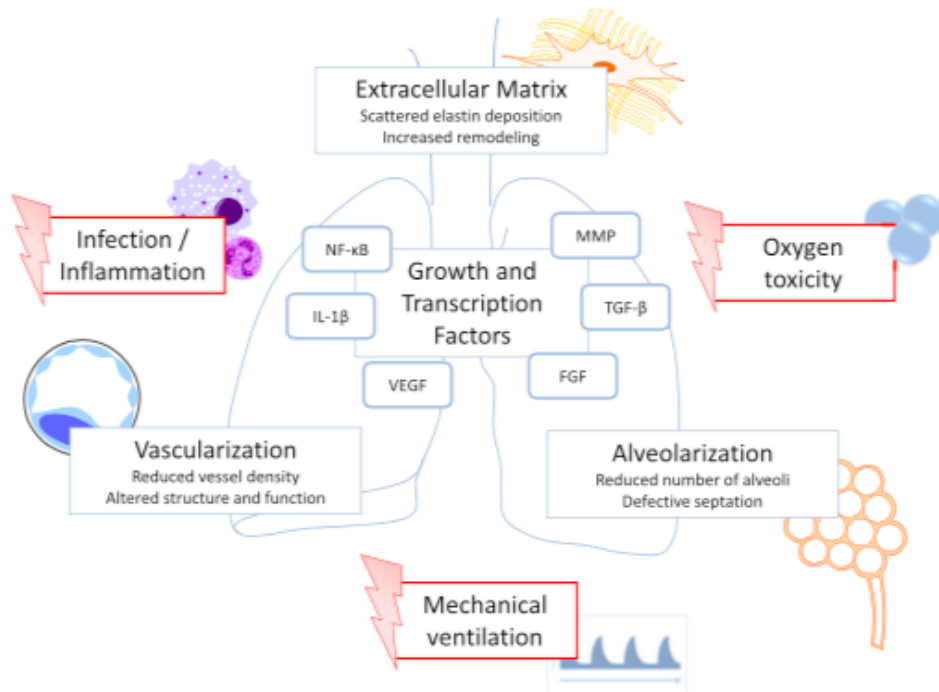


Figura 4. Variabili coinvolte nella patogenesi della BPD (modificato da Niedermaier et al[82])

Gli effetti della grande prematurità sulla funzionalità polmonare

Studi di imaging polmonare che hanno utilizzato la tomografia computerizzata (TAC) hanno mostrato che alterazioni strutturali del polmone e delle vie aeree sono di frequente riscontro durante l'infanzia, per lo più nei soggetti con BPD, e comprendono pareti bronchiali ispessite (che suggeriscono cambiamenti infiammatori o remodelling post-infiammatorio), opacità sub-pleuriche lineari e triangolari (verosimilmente da ricondurre a tessuto cicatriziale) e la presenza limitata di enfisema.[119–121] Queste alterazioni sembrano persistere in età scolare[4,122], e le alterazioni più avanzate sembrano essere associate ai gradi più severi di BPD.[120,122] I grandi prematuri hanno un burden maggiore di patologia respiratoria rispetto ai bimbi nati a termine anche nel periodo post-neonatale, avendo incidenza maggiore bronchiolite/wheezing e riospedalizzazione nel

primo anno di vita.[123] Anche in età pre-scolare e scolare questi soggetti hanno più frequentemente wheezing e fanno un uso maggiore di farmaci anti-asma.[17,124]

Studi di follow-up mostrano che i soggetti nati prima di 32 settimane EG, tendano ad avere funzionalità respiratoria anormale a lungo termine, specie in presenza di BPD.[4–8]

L'alterazione più frequente è un pattern ostruttivo alla spirometria, con FEV₁ basso e una diminuzione del rapporto FEV₁/FVC.[4–6,125,126] Questo pattern non sembra migliorare con il tempo[17] e tende a persistere anche in età adulta,[8,127] spesso accompagnato da una ridotta tollerabilità allo sforzo.[128]

L'utilità del MBW è stata finora poco esplorata nei grandi prematuri. Latzin et al[129] hanno confrontato l'inomogeneità della ventilazione in neonati prematuri con o senza BPD ma non hanno riportato differenze significative di LCI in base alla presenza e al grado di BPD. Simpson et al[4] hanno trovato valori simili di LCI in una coorte di grandi prematuri e di controlli a termine valutati in età scolare.

Per quanto riguarda la capacità diffusiva del polmone nei grandi pretermine, ci sono dati contrastanti, con la maggior parte degli studi che hanno evidenziato un TL_{co} significativamente inferiore rispetto ai controlli a termine,[5,62,130–136] ma alcuni altri no.

[4,6] Il gruppo di ricerca del Prof. Tepper di Indianapolis, USA, ha effettuato alcuni interessanti studi clinici e sperimentali finalizzati a determinare le cause fisiopatologiche dell'alterato TL_{co} nei grandi pretermine. Dapprima, hanno dimostrato che il VA, normalizzato per la lunghezza corporea, è simile tra lattanti pretermine con BPD e controlli a termine, nonostante i primi abbiano un TLCO inferiore.[136] Successivamente, hanno evidenziato un collegamento tra la compromissione strutturale e funzionale della membrana alveolare-capillare, dimostrando una correlazione tra diminuita diffusività

polmonare e semplificazione dell'architettura alveolare e vascolare nei polmoni di modelli murini di BPD.[137] Infine sono andati a valutare le due componenti del TLco, la capacità di diffusione della membrana alveolo-capillare (D_M) e il volume di sangue capillare polmonare (V_c) in lattanti e bambini in età prescolare nati prima di 30 settimane EG.[138] Come spiegato nel paragrafo sul TLco, si ritiene che queste due componenti riflettano rispettivamente la superficie alveolare e il volume di sangue all'interno dei capillari polmonari. Ebbene lo studio sopra citato ha mostrato che D_M e V_c aumentano con l'aumento della lunghezza corporea sia nei neonati a termine che nei pretermine con BPD. I neonati con BPD avevano D_M e V_c significativamente più bassi quando corretti per la lunghezza corporea, tuttavia il rapporto tra i due componenti, D_M/V_c , è invariato, indicando quindi un impairment sia dell'alveolarizzazione che dello sviluppo microvascolare, coerenti con i dati noti da studi sperimentali animali e istopatologici su pretermine morti.[137,139] Nei prematuri valutati ad età più avanzata invece, ci sono pochi e discordanti dati: Sorensen et al hanno trovato differenze significative di D_M ma non di V_c tra prematuri estremi e controlli a termine di 9-13 anni,[140] mentre Drummond et al, al contrario, hanno riportato differenze significative di V_c ma non di D_M tra grandi prematuri e controlli a termine valutati in età adolescenziale.[141] In virtù di questi dati discordanti, è evidente che la valutazione funzionale del danno della capacità di diffusione della membrana alveolo-capillare e quello del volume di sangue capillare polmonare nei prematuri dovranno essere meglio chiarite dagli studi futuri.

Gli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità polmonare.

I pretermine estremi rappresentano la categoria a maggior rischio di BPD e impairment respiratorio a lungo termine. Oltre all'aumentato rischio di comorbidità respiratoria in età

prescolare e scolare,[142–145] numerosi studi hanno mostrato alterazioni significative della funzionalità respiratoria in età scolare[19,80,145–147], che persistono in età adulta. [18,76]

Un'aumentata inomogeneità della ventilazione è stata riportata in una coorte di soggetti nati <26 settimane di gestazione, valutati a 11 anni di età.[19] Tuttavia in quello studio, l'LCI non individuava una proporzione maggiore di soggetti con funzionalità respiratoria anormale (almeno 1 test patologico tra spirometria, MBW e TLCO) rispetto al FEV₁ della spirometria (58% vs 63%), pertanto gli autori concludevano che l'utilità del LCI nel follow-up respiratorio di questo gruppo è limitata. Yammine et al[75] hanno valutato il MBW in età scolare in una coorte di pretermine, comprendente un gruppo di 38 partecipanti nati <28 settimane EG, rispetto a un gruppo di controllo di nati a termine. Non sono state riscontrate differenze significative nel LCI medio di pretermine e controlli, così come tra i pretermine estremi e quelli nati ad almeno 28 settimane di gestazione. Questo studio ha valutato anche gli indici d'inomogeneità della ventilazione regionale, Scond e Sacin. I valori medi di Scond nel gruppo dei pretermine estremi sono risultati quasi doppi rispetto ai controlli a termine (0.033 ± 0.011 vs 0.017 ± 0.008 , $p < 0.001$), indicando verosimilmente evidenza di danno residuo delle vie aeree di conduzione di piccolo calibro in questo gruppo. Un dato interessante emerso da tale studio è dato dall'assenza di differenze nei valori di Sacin tra pretermine estremi e controlli (0.070 ± 0.038 vs 0.067 ± 0.029), che potrebbe dipendere da un catch-up post-natale dell'alveolarizzazione e della funzionalità del compartimento intra-acinare.[75] Differentemente da Yammine et al , lo studio di Sorensen et al ha trovato valori significativamente più alti di LCI e Sacin in una coorte di pretermine estremi in età scolare rispetto a un gruppo di controlli a termine.[140] I valori di

Scand dei soggetti nati <28 settimane EG in questo studio erano comunque simili a quelli riportati da Yammine et al[75] e l'assenza di significatività della differenza media era dovuta a valori leggermente più alti nei i controlli.[140]

I pochi dati disponibili indicano anche che l'efficienza degli scambi gassosi a livello della membrana alveolo-capillare, valutata tramite TLCO, è generalmente inficiata nei pretermine estremi, con valori del 7-10% inferiori (rispetto al teorico) quando confrontati con quelli di soggetti nati a termine.[11,145,148] Questo dato può dipendere da un impairment dell'alveolarizzazione o da un inadeguato sviluppo del letto microvascolare del parenchima polmonare.[148] Considerando, comunque, che le differenze di capacità di diffusione polmonare rispetto ai pretermine non appaiono tanto importanti quanto quelle di FEV₁, e anche alla luce delle evidenze crescenti di catch-up dell'alveolarizzazione da un lato[74,75] e di alterato sviluppo della microvascolarizzazione polmonare dall'altro[149], si può speculare che il peso dei fattori vascolari sia maggiore di quello dell'iposviluppo degli alveoli, nel determinare un TLco alterato nei prematuri estremi.

Prematurità e rischio di aging precoce del polmone

La grande maggioranza dei prematuri con alterata funzionalità polmonare presenta tutt'al più una frequenza maggiore di wheezing e scarsa resistenza allo sforzo fisico rispetto ai soggetti nati termine,[144,148] ma non altri sintomi. Pertanto l'interpretazione clinica dei test respiratori anormali in questa popolazione non riguarda tanto problemi correnti quanto un possibile aumentato rischio futuro di esordio precoce di broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).[150] Per quanto non vi siano prove dirette che associno la grande prematurità ad un aumentato rischio di BPCO, una serie di studi epidemiologici mostrano che una basso FEV₁ in età pediatrica, è "tracciato" nel tempo fino all'età adulta sia nella popolazione generale,[21,151] (figura 5) che in quella dei prematuri.[17,18] (figura 6) Dati

recenti hanno dimostrato inoltre che un basso picco di funzionalità respiratoria in età giovane adulta, di frequente riscontro nei grandi pretermine con BPD, è associato ad esordio precoce di BPCO[21] e ad aumentata mortalità per cause cardio-respiratorie.[23]

(figura 7)

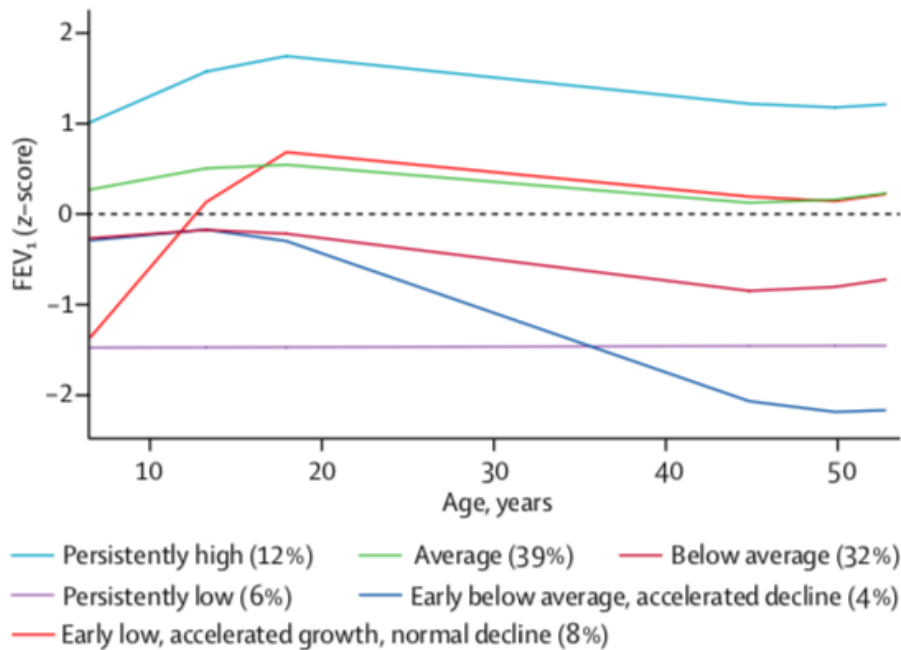


Figura 5. Traiettorie di FEV₁ z-score in 2438 partecipanti nel “Tasmanian Longitudinal Health Study (TAHS)” dai 7 ai 53 anni di età. Modificato da Bui et al[21]

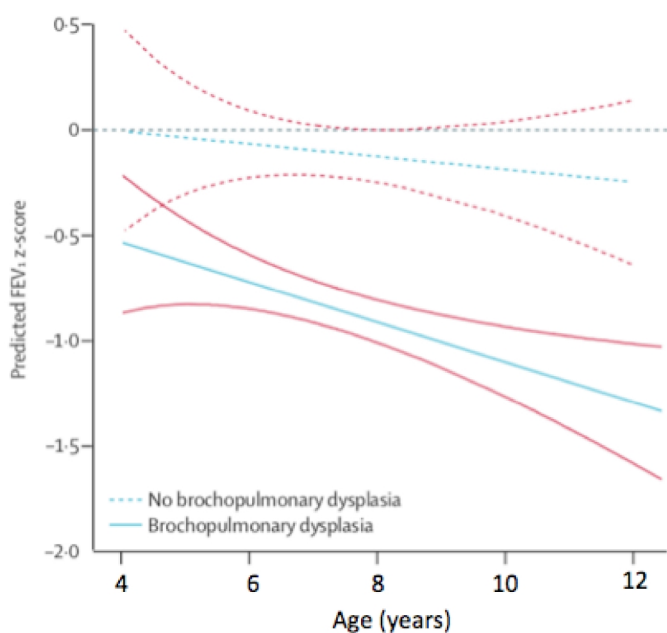


Figura 6. Traiettorie della funzione polmonare durante l'infanzia in 347 bambini grandi pretermine della birth cohort di Perth, Australia. Modificato da Simpson et al[17]

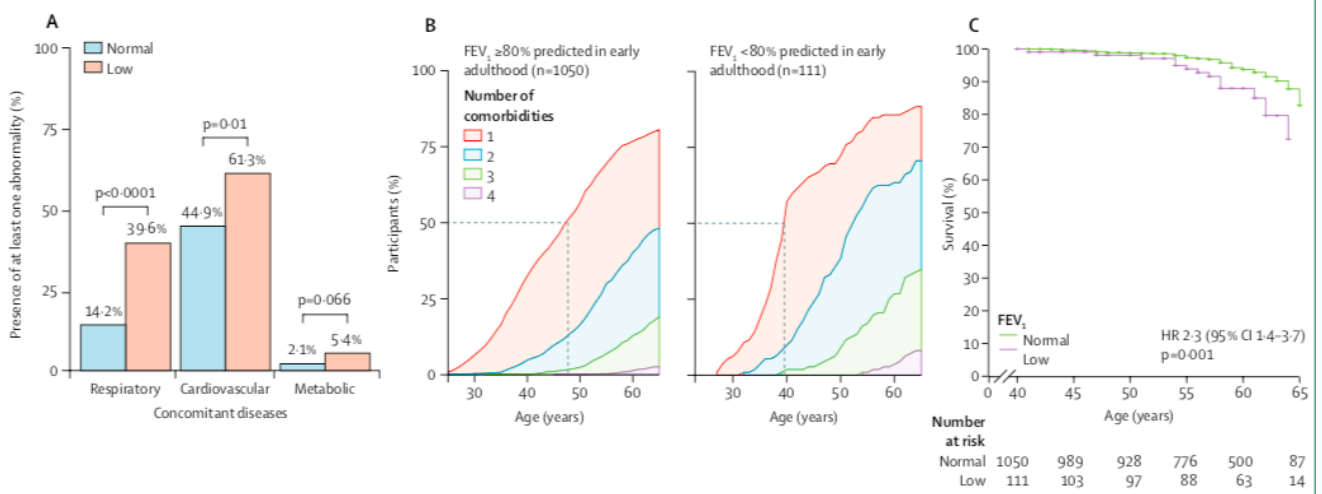


Figura 7. Associazione della funzione polmonare in età giovane adulta e prevalenza (A) e incidenza di comorbidità (B) e mortalità prematura (C) nella Framingham Offspring Cohort. HR= hazard ratio. Modificato da Agusti' et al[22]

In assenza di strategie di prevenzione di comprovata efficacia per favorire un catch-up della funzionalità respiratoria nei bambini grandi prematuri, può essere utile, quanto meno, la ricerca di test di funzionalità respiratoria che permettano di stratificare il più precocemente possibile i pretermine con risultati anomali che potrebbero essere a maggior rischio di danno polmonare cronico. In ogni caso, finché non ci saranno dati prospettici che associno eventuali risultati patologici ai test respiratori, con outcomes clinici negativi a lungo termine (così come è stato visto per il basso picco di FEV₁ in età adulta il rischio di BPCO), l'interpretazione di tali tests nella popolazione pediatrica deve necessariamente essere improntata alla prudenza. Infatti, se da un lato il riscontro di un test respiratorio anormale in un pretermine deve indurre a rafforzare le raccomandazioni sull'importanza di uno stile di vita corretto per la prevenzione delle patologie cardio-respiratoria, dall'altro questo riscontro, in assenza di un corredo di sintomi respiratori che impattino sulla vita quotidiana, non può portare a classificare il bambino come "malato cronico", in attesa che studi futuri prospettici chiariscano il significato prognostico di risultati patologici ai diversi test di funzionalità respiratoria.

La restrizione di crescita intrauterina

La restrizione di crescita intrauterina è una condizione in cui il feto non realizza il proprio potenziale di accrescimento. Lo IUGR può esitare in basso peso alla nascita (small for gestational age = SGA), ovvero un peso inferiore al 10° percentile o al 2.5° percentile a seconda degli studi. Tuttavia i due concetti non sono equivalenti, perché non tutti i soggetti con storia prenatale di IUGR nascono SGA, se per esempio il potenziale di crescita era alto. Viceversa, un soggetto SGA non necessariamente ha avuto una storia prenatale di IUGR (che implica un rallentamento della crescita fetale), se per esempio era costituzionalmente piccolo. Dati di letteratura indicano che circa fino a un 40% dei soggetti con storia di IUGR può avere un peso alla nascita superiore al 10° percentile.[152,153]

Anche gli outcomes perinatali di questi due gruppi non coincidono e, se tra i grandi prematuri tanto gli IUGR quanto gli SGA sono a maggior rischio di complicanze perinatali, BPD e mortalità,[153–159] alcuni studi hanno dimostrato un tasso maggiore di comorbidità respiratoria nei soggetti con IUGR rispetto agli SGA[160,161]

Lo IUGR può riconoscere cause materne, placentari, fetali o una combinazione di esse.

Tra le cause fetali, vi sono le anomalie genetiche (che esulano dall'oggetto di questa tesi) e le infezioni congenite, mentre le cause materne o placentari, che rappresentano l'80-90% del totale,[162] includono un'ampia varietà di condizioni che comportano apporti nutrizionali e/o di ossigeno inadeguati le patologie vascolari materne (ipertensione arteriosa, pre-eclampsia, diabete mellito e collagenopatie) rappresentano il 25-30% delle cause di IUGR ti per il feto (tabella). Tra queste, le patologie vascolari materne

(ipertensione arteriosa, pre-eclampsia, diabete mellito e collagenopatie) rappresentano il 25-30% delle cause di IUGR.[13]

Cause di restrizione di crescita intrauterina (modificato da Harding et al[13])

Maternal					
Chronic Disease States	Drug Use	Diet	Genetic Predisposition	Disease	Hypoxemia
<ul style="list-style-type: none"> • Chronic hypertension • Diabetes mellitus • Renal insufficiency • Collagen vascular disease 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicotine • Ethanol • Steroids • Narcotics 	<ul style="list-style-type: none"> • Undernutrition • Obesity 	<ul style="list-style-type: none"> • Acquired thrombophilias 	<ul style="list-style-type: none"> • Malaria • Pneumonia 	<ul style="list-style-type: none"> • High altitude • Anemia • Cyanotic heart disease
Placental					
Placental Anomalies		Placental Dysfunction		Chronic Inflammatory Conditions	
<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal cord insertion • Circumvallate placenta • Chorioangioma 		<ul style="list-style-type: none"> • Placental abruption • Placenta praevia 		<ul style="list-style-type: none"> • Placentitis • Villitis • Chorioamnionitis 	
Fetal					
Chromosomal Disorders		Congenital Malformations		Infection	Multiple Gestation
<ul style="list-style-type: none"> • Sex chromosome disorders • Trisomy 18, 13, 21 		<ul style="list-style-type: none"> • Congenital heart disease • Anencephaly 		<ul style="list-style-type: none"> • Viral • Bacterial 	<ul style="list-style-type: none"> • Twin-to-twin transfusion syndrome

A seconda della noxa patogena e della tempistica della restrizione nutrizionale per il feto, lo IUGR può manifestarsi più precocemente durante la gravidanza (“early IUGR”) che determina, generalmente, un deficit di crescita simmetrico che riguarda tutti gli apparati corporei, oppure più tardivamente nel terzo trimestre di gravidanza. In questi casi più frequentemente la scarsa crescita sarà “asimmetrica”, risparmiando gli organi nobili quali cuore cervello e, in parte, anche il polmone, a spese di fegato, intestino e massa grassa. Per ovvie ragioni, questo studio sui grandi pretermine focalizzerà l’attenzione solo sulle conseguenze respiratorie dell’ *early* IUGR.

Una problematica che ha a lungo precluso la possibilità di studiare accuratamente le conseguenze perinatali e post-natali dello IUGR, incluso gli outcomes respiratori, è stata l’assenza di criteri diagnostici condivisi per la diagnosi del ritardo di crescita intrauterino.

Questa mancanza è stata di recente compensata grazie ad una recente *Consensus* internazionale che ha definito criteri precisi per la diagnosi di early e o late IUGR sulla base della combinazione di dati biometrici fetali e dei dati eco-doppler della velocità di flusso in arteria ombelicale e uterina.[163] (maggiori dettagli nei metodi). Il doppler dell'arteria ombelicale rappresenta uno strumento particolarmente utile insieme alle misure di biometria fetale, per la diagnosi, e il follow-up del ritardo di crescita intrauterino. Lo IUGR ad esordio precoce è associato ad un aumento dell'impedenza della perfusione placentare uterina che, a sua volta, porta ad un'elevata resistenza al flusso sanguigno dell'arteria ombelicale quando il danno villosa supera il 30%.[164] Il flusso dell'arteria ombelicale identifica diversi gradi di malfunzionamento della placenta che si traducono in valori crescenti di *pulsatility index* (PI), fino all'assenza o inversione del flusso a fine diastole, che implica un'importante riduzione del flusso sanguigno placentare ed è associato ad un grave deterioramento fetale.[165]

Gli effetti della restrizione di crescita intrauterina sullo sviluppo polmonare: evidenze sperimentali

Evidenze da studi animali che hanno riprodotto condizioni fetali di inadeguata nutrizione a vari stadi di gravidanza in specie diverse, mostrano che la nutrizione fetale inadeguata e lo IUGR che ne consegue, alterano lo sviluppo polmonare.[14]

I modelli animali più utilizzati di IUGR sono agnelli e topi. Mentre negli ovini il timing di sviluppo polmonare è molto simile a quello umano, nei roditori l'alveolarizzazione avviene interamente dopo il termine di nascita e, quindi, rappresentano un modello ottimale per valutare gli effetti della IUGR senza le complicanze della nascita pretermine.[166] Tuttavia, l'interpretazione di questi studi sperimentali è ostacolata da molti fattori, tra cui *settings*

sperimentali eterogenei con pochi studi di replicazione e specie diversi di animali usati per gli studi; pertanto, è necessaria cautela nel traslare i risultati di questi studi al genere umano.

A livello macroscopico, la crescita polmonare è proporzionalmente limitata alla crescita corporea in agnelli che sottoposti a prolungata denutrizione fetale, indotta da insufficienza placentare.[167]

La nutrizione inadeguata durante lo stadio sacculare e alveolare dello sviluppo polmonare, come atteso, danneggia principalmente l'alveolarizzazione. Negli ovini porta ad alterata produzione di surfattante,[168] ad una diminuzione della crescita vascolare polmonare,[169] e ad una riduzione permanente post-natale della superficie alveolare in relazione al volume polmonare,[170,171] con un aumento della matrice extracellulare e un ispessimento della barriera alveolo-capillare.[171,172]

Gli studi animali suggeriscono che lo IUGR colpisce anche lo sviluppo vie aeree conduttive. In feti di agnelli quasi a termine con IUGR, è stato dimostrato che trachea e bronchi hanno diametro minore mentre la mucosa delle vie aeree ha un numero ridotto di cellule ciliate.[173]

I cambiamenti epigenetici indotti dalla malnutrizione fetale cronica e dalla IUGR sono probabilmente responsabili della maggior parte di questi effetti,[174] influenzando vie di signaling coinvolte nella maturazione polmonare, come quella del *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)*[175,176] o quello del *transforming growth factor (TGF- β)*.[177]

Gli effetti della restrizione di crescita intrauterina sulla funzionalità polmonare

Pochi studi hanno valutato l'impatto della IUGR sulla funzionalità respiratoria e sul rischio di wheezing o asma. Uno studio prospettico di coorte dalla nascita ("Generazione R") che

ha coinvolto oltre 5000 bambini nei Paesi Bassi ha dimostrato che la scarsa crescita fetale era associata ad una maggiore resistenza delle vie aeree nei bambini di 6 anni,[178] mentre il pattern di crescita fetale non sembra incidere sul rischio wheezing prescolare. [179,180]. Turner et al. hanno trovato che la scarsa crescita fetale durante il secondo e il terzo trimestre era associata ad una riduzione del FEV₁ e del FVC, ma non ad aumentato rischio di asma a 10 anni di età.[181] I dati della coorte "Generation R" hanno inoltre mostrato che lo scarso incremento ponderale del feto crescita durante il secondo e terzo trimestre (inteso come una diminuzione dello z-scores di peso stimato maggiore di 0.67 z-score in questo periodo) è associato con volumi polmonari dinamici inferiori all'età di 10 anni (in parte anche dipendenti dal pattern di crescita infantile) mentre non è associato con asma o wheezing ricorrente.[182]

Per quanto riguarda i prematuri, c'è uno solo studio, di Morsing et al, che ha valutato l'impatto dello IUGR propriamente detto sulla funzionalità respiratoria a lungo termine. [183] Gli autori hanno valutato la funzionalità respiratoria in età scolare in soggetti che erano nati a <30 settimane GA con e senza una storia prenatale di flusso tele-diastolico assente o invertito in arteria ombelicale assente. Questa popolazione, tuttavia, non era rappresentativa dell'intera popolazione IUGR ma solo di un sottogruppo con le alterazioni placentari più severe (paragrafo su IUGR per maggiori dettagli). In ogni caso i pretermine con IUGR risultavano avere valori significativamente inferiori di FEV₁ e TLco rispetto ai loro pari con crescita fetale normale e, alle analisi di regressione, lo IUGR risultava essere un fattore di rischio indipendente da BPD sia per riduzione del FEV₁ che del TLco.[183] Un altro studio, di Ronkainen et al, ha confrontato invece la funzionalità respiratoria in età scolare in grandi prematuri nati SGA (<2.5 pc peso alla nascita) e con peso adeguato per

età gestazionale (AGA).[126] Sebbene in considerazione della definizione stringente di SGA c'è da ipotizzare che la maggior parte dei soggetti del gruppo di studio avessero una storia di IUGR, il pattern di crescita prenatale di tali soggetti non è stato investigato e quindi non è possibile trarre da questo studio conclusioni certe riguardo l'impatto dello IUGR sulla funzionalità respiratoria. In ogni caso, i grandi pretermine con SGA avevano differenze di FEV₁ z-score rispetto a quelli con crescita fetale normale, simili a quelle riportate da Morsing et al (circa -0.6 z-scores).[126]

Sono numerosi invece gli studi che hanno valutato la funzionalità respiratoria in soggetti nati prevalentemente a termine con basso peso alla nascita (SGA) o peso normale (AGA). Da tali studi emerge abbastanza chiaramente che un basso peso alla nascita è associato a una ridotta funzionalità polmonare in epoca infantile,[184–186] [67-69] e in età scolare, [187] anche in presenza di catch-up growth.[187] Una metanalisi di 24 studi di coorte dalla nascita,[15] ha confermato che un basso z-score peso alla nascita è associato ad un aumento del rischio di asma in età scolare, e a FEV₁ e FEV₁/FVC z-scores inferiori. Da giovani adulti, i soggetti SGA possono raggiungere uno scarso picco di funzionalità polmonare.[188]

Razionale

Alla luce delle evidenze esposte, c'è necessità di strumenti diagnostici che permettano di individuare precocemente gli esiti del danno polmonare cronico nei grandi prematuri e di studi prospettici che definiscano il significato prognostico di risultati patologici di tali tests. Ciò permetterebbe una stratificazione più accurata di questi bambini in base al rischio di danno polmonare cronico, contribuendo a definire le modalità e l'intensità del follow-up respiratorio in base a tale rischio. La spirometria, che rappresenta il test respiratorio di più

comune utilizzo, ha generalmente una buona sensibilità per individuare un'alterata funzionalità respiratoria nei grandi prematuri e in particolare nei soggetti con BPD.[130] Tuttavia, le vie aeree di piccolo calibro (diametro interno <2 mm), che possono essere colpite nella fisiopatologia del danno polmonare legato alla prematurità,[1] sono generalmente "silenti" alla spirometria, tranne in presenza di patologia avanzata.[189] Individuare evidenze di alterazione della funzionalità delle piccole vie aeree nei grandi prematuri, anche in presenza di spirometria normale, potrebbe essere utile perché farebbe luce sul danno di una regione polmonare su cui la spirometria è poco informativa, sebbene il significato prognostico di eventuali alterazioni di questo tipo andrebbe chiarito attraverso studi prospettici. Il Multiple Breath Washout (MBW) è una tecnica particolarmente sensibile alla funzionalità delle piccole vie aeree e, di conseguenza, potrebbe avere un ruolo nel follow-up respiratorio dei grandi prematuri.

In questo progetto abbiamo valutato l'utilità del MBW nell'individuare esiti di danno respiratorio cronico in due categorie di soggetti prematuri in età scolare particolarmente a rischio di esiti cronici: una coorte di grandi prematuri (<32 settimane) con storia di IUGR e una coorte di soggetti nati con prematurità estrema (<28 settimane).

Ipotesi di studio

- La restrizione di crescita intrauterina potrebbe avere un impatto sulla funzionalità delle vie aeree di calibro maggiore, valutate attraverso la spirometria, e delle vie aeree periferiche, valutate attraverso il MBW e TLco, in soggetti nati <32 settimane di età gestazionale valutati in età scolare
- L'eventuale impatto negativo dello IUGR sulla funzionalità respiratoria dei grandi pretermine è atteso essere mediato almeno in parte dal maggior rischio di BPD in

questo gruppo, tuttavia s'ipotizza che lo IUGR abbia anche un effetto deleterio indipendente sulla funzionalità respiratoria, date le evidenze sperimentali di cambiamenti epigenetici indotti da questa condizione che potrebbero inficiare lo sviluppo del polmone, anche in color che non sviluppano BPD.

- In virtù degli avanzamenti nelle strategie di assistenza respiratoria neonatale che si sono verificati durante l'epoca del surfactante, i grandi prematuri senza BPD di una coorte relativamente recente (anni di nascita: 2004-2010) potrebbero avere scarsi esiti respiratori cronici legati alla prematurità
- Nel confronto della funzionalità respiratoria in età scolare tra soggetti nati con prematurità estrema e soggetti nati a termine, Scond del MBW, che riflette un danno alle vie aeree di conduzione prevalentemente di piccolo calibro, potrebbe avere un poter discriminatorio maggiore del FEV₁ della spirometria nel differenziare soggetti con funzionalità respiratoria anomala o normale.
- Evidenza di danno delle vie aeree periferiche, riflesse dagli indici del MBW (LCI, Scond, Sacin) e dal TLCO per la capacità diffusiva nel polmone, sono attese nella coorte di pretermine estremi in età scolare.

Obiettivi

- Confrontare la funzionalità respiratoria delle vie aeree di calibro maggiore e periferiche in una coorte di grandi pretermine (<32 settimane EG) e in soggetti nati a termine valutati in età scolare
- Valutare l'impatto dello IUGR sulla funzionalità delle vie aeree di calibro maggiore e periferiche di grandi pretermine in età scolare

- Confrontare la funzionalità respiratoria delle vie aeree di calibro maggiore e periferiche in una coorte di pretermine estremi (<28 settimane EG) e di soggetti nati a termine in età scolare
- Valutare la fattibilità di un assessment respiratorio basato sulla performance di spirometria, TLco e MBW in un'unica sessione, per il follow-up respiratoria di soggetti nati con grande prematurità in età scolare

METODI

Disegno del progetto

Questo progetto consta di 2 studi prospettici cross-sectional: il primo ha valutato l'impatto sulla funzionalità respiratoria in età scolare in bambini nati prima di 32 settimane di EG. Il secondo ha valutato la funzionalità respiratoria delle grandi e piccole vie aeree in una coorte dei bambini in età scolare nati a <28 settimane di età gestazionale. I criteri di reclutamento e parte della popolazione dei due studi differivano, mentre gli assessments, la metodologia applicata, i criteri di esclusione e il gruppo di controllo di soggetti nati a ≥ 37 settimane di gestazione sono stati comuni ai due studi. Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico Unico Regionale (CEUR) della regione Friuli Venezia-Giulia (Ceur-2018-Sper-018-ASUIUD). La raccolta dati è stata effettuata tra gennaio 2018 e aprile 2019 presso l'Ospedale Universitario di Udine. Sono stati ottenuti il consenso informato scritto del genitore/tutore e il consenso del bambino prima dei tests.

Le informazioni anagrafiche e i contatti dei pretermine da richiamare sono stati estratti dal database elettronico della TIN di Udine, per coloro che avevano autorizzato la possibilità di essere ricontattati per il follow-up legato alla prematurità.

Le informazioni cliniche e anamnestiche riguardanti la gravidanza e l'epoca neonatale sono state estratte dal database elettronico della TIN e, ove necessario, integrate con le informazioni contenute nelle cartelle cliniche dei pazienti.

Le informazioni riguardanti le comorbidity respiratorie post-neonatali dei partecipanti sono state indagate mediante un'intervista dei genitori con questionario a risposta chiusa, somministrato da uno degli investigatori coinvolti nella raccolta dati.

A distanza dagli assessments, le famiglie di tutti i soggetti partecipanti hanno ricevuto una relazione clinica, da sottoporre anche all'attenzione del medico curante, con i risultati dei test respiratori effettuati, l'interpretazione degli stessi alla luce della storia clinica e le eventuali indicazioni per la continuazione del follow-up respiratorio in caso di risultati patologici o borderline.

Prima dell'inizio dei due studi sopra citati è stata effettuata la validazione del MBW per il Laboratorio di Fisiopatologia Respiratoria Pediatrica dell' ASUI Udine, trattandosi di una test di funzionalità respiratoria il cui utilizzo è ancora limitato all'ambito di ricerca, specialmente al di fuori della fibrosi cistica. La validazione dello strumento è stata eseguita su un campione di adulti che hanno ripetuto il test 2 volte ciascuno e su un campione di bambini che hanno eseguito il test una sola volta. Per gli outcomes del MBW (LCI, Scond e Sacin) in coloro che hanno ripetuto il test è stato valutato il coefficiente di ripetibilità inter-test (1.96 DS della differenza media dei risultati di due test eseguiti dallo stesso soggetto in occasioni diverse. Riflette il 95% della variabilità fisiologica e tecnica nel risultato).

Definizioni e assessments

In entrambi gli studi l'età gestazionale dei pretermine inclusi è stata ricavata dalla cartella clinica ed era stata definita in base alla valutazione ostetrica, integrando le informazioni sull'ultima mestruazione e sulle misurazioni ecografiche del feto.

Il peso alla nascita è stato convertito in z-scores secondo i valori teorici di Fenton 2013 per i soggetti pretermine.[190] La displasia broncopolmonare (BPD) è stata definita come necessità di supporto di ossigeno a 36 settimane di età post-mestruale.

I campioni di placenta materna, funicolo e membrane di tutti i bambini pretermine arruolati, sono stati revisionati da un patologo esperto e la diagnosi di corioamnionite e/o malperfusione vascolare materna è stata in accordo ai più recenti standards internazionali. [191,192]

I sintomi d'asma sono stati valutati attraverso il *core questionnaire* dell'International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) sul wheezing[193] e l'attuale prevalenza di asma si è stata derivata dalla risposta alla domanda "Suo figlio ha avuto wheezing o fischio toracico rinegli ultimi 12 mesi?[194]

L'età è stata registrata con una precisione decimale. L'altezza è stata misurata al millimetro più vicino utilizzando uno stadiometro con testina mobile ad angolo retto (Leicester stadiometer, Seca, Amburgo, Germania). Il peso (bilancia digitale Seca, Amburgo, Germania) è stato misurato con abiti leggeri e senza scarpe, ed è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI). I dati antropometrici sono stati convertiti in z-scores secondo i teorici correnti della World Health Organization, utilizzando una macro per excel disponibile on-line.[195,196]

I partecipanti sono stati sottoposti a spirometria, transfer factor per il monossido di carbonio (TLco) (Jaeger MasterScreen PFT; Viasys Healthcare, Germania) e N₂ Multiple Breath Washout (MBW) (Exhalyzer D, Eco Medics AG, Svizzera), nello stesso giorno. Sono stati utilizzati devices che soddisfano i requisiti di qualità indicati dall' *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS), [25,35,197] e prima di ogni sessione è stata eseguita la calibrazione degli strumenti come indicato nelle linee guida di riferimento e dai rispettivi produttori.[25,35,197,198]. Il principal investigator ha partecipato

all'esecuzione di circa il 75% dei tests effettuati nell'ambito del progetto, mentre gli altri tests sono stati effettuati da altri co-investigatori esperti nelle metodiche utilizzate.

Per la spirometria, ogni partecipante, seduto all'interno della cabina pletismografica, ha eseguito almeno 3 manovre espiratorie forzate con le clips nasali *in situ*. Durante ogni manovra forzata il soggetto esegue un'inspirazione massimale rapida a partire dalla capacità funzionale residua, seguito da un'espirazione rapida, completa e priva di esitazioni una volta raggiunta la capacità polmonare totale. I dati sono stati inclusi se c'erano almeno 2 curve flusso-volume che soddisfano i criteri di accettabilità e ripetibilità ATS/ERS,[25] come modificato per i bambini da Kirkby et al.[199] Per ogni partecipante sono stati registrati il miglior FEV₁, FVC, FEV₁/FVC e FEF^{25-75%} tra le curve flusso-volume accettate. I valori spirometrici sono stati convertiti in z-scores secondo i teorici della Global Lung Initiative 2012 (GL-2012).[200] Il limite inferiore di normalità è stato stabilito al 5° percentile della popolazione di riferimento.

Per il TLco sono stati eseguite da 2 a 5 prove per singolo partecipante, ad almeno 4 minuti di intervallo l'una dall'altra.[58] Al soggetto viene chiesto di respirare attraverso un boccaglio connesso alla macchina. Dopo alcuni respiri a volume corrente, è invitato ad eseguire un'espirazione forzata massimale, seguita da un'inspirazione fino alla capacità polmonare totale entro un tempo massimo di 4 secondi, durante la quale inala un gas costituito da aria miscelata contenente He (10%) e una bassissima percentuale di CO (0.3%), per poi trattenere il respiro per 10±2 secondi al termine dei quali doveva eseguire una nuova espirazione forzata massimale. Successivamente deve continuare a respirare a volume corrente fino al termine automatico della misurazione. Le concentrazioni alveolari iniziali e finali di CO e il tempo di apnea vengono utilizzati per il calcolo del TL_{CO}, che

riflette la superficie aerea polmonare disponibile per la diffusione, il volume ematico nei capillari polmonari e l'efficienza della barriera alveolo-capillare. Sono stati esclusi i test che non rispettano i seguenti criteri di qualità: assenza di perdite di aria, assenza di manovre di Valsalva o Muller; inspirazione veloce e profonda (non superiore a 4 sec.); apnea di meno di 8 secondi. Il test si conclude in presenza di due trials qualitativamente accettabili il cui risultato non si discostasse più di $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ ($0.67 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$) l'uno dall'altro e il risultato finale era dato dalla media di almeno due prove.[58] Nei rari casi in cui non è stato possibile ottenere due TLco ripetibili e di adeguata qualità, è stato accettato il test con solo una prova solo se questa era di qualità ottimale in base ai criteri ERS/ATS.[201] I valori di TLC, Va e KCO sono stati convertiti in z-scores secondo i teorici del GLI-2017.[60]

Per il MBW, in una fase preliminare del progetto è stata eseguita la validazione del device che sarebbe stato utilizzato per lo studio, andando a valutare la ripetibilità del test e degli outcomes considerati in una coorte di soggetti adulti e di bambini. In questo test, al soggetto viene richiesto di respirare a volume corrente in un circuito chiuso con le labbra adese a un boccaglio e le narici occluse da uno stringinaso, inalando O₂ al 100% di concentrazione che spiazzava l'azoto residente nelle regioni acinari polmonari.

La CO₂ viene misurata utilizzando un analizzatore *mainstream* a infrarossi e l'ossigeno (O₂) viene misurato mediante campionamento *side stream* (flusso del campione circa 200 ml/min) da un analizzatore laser interno O₂. [202] La concentrazione di N₂ viene misurata indirettamente dalla formula:

$$1 = F_{O_2} + F_{CO_2} + F_{N_2} + F_{Ar^*}$$

*F è la concentrazione frazionaria del gas; FAr (Argon) è trattato come proporzione fissa di

FN2 durante il washout ($F_{Ar} = FN_2 \times 0,0093/0,7881$).[202]

Trattandosi di un circuito chiuso, l'FRC è calcolata in base all'equazione:

$$FRC = \frac{\text{Volume tot. di N}_2 \text{ espirato durante il washout}}{\text{Cet N}_2 \text{ a inizio washout} - \text{Cet N}_2 \text{ a fine washout}}$$

Cet = Concentrazione end-tidal

Nella fase prewashout è necessario che il soggetto abbia un pattern respiratorio stabile per almeno 5 respiri con simile tidal volume (TV) e FRC, poiché un respiro irregolare con TV piccoli prima di iniziare il washout potrebbe portare ad un errore nella stima della concentrazione iniziale e finale di dell' N₂ alveolare.[35] Durante la fase del washout, i respiri dovrebbe avere un TV fisiologico di 10-15 ml/kg in soggetti sani[203] e il volume della fase III alveolare di ogni singolo respiro da includere nell'analisi della fase III dovrebbe essere compresa tra il 50% e il 75% del volume espiratorio totale del respiro stesso. Anche minime aperture della bocca durante il washout possono causare leaks che invalidano la prova, così come la presenza di tosse o di sospiri che possono aumentare l'FRC.[35] Il test termina quando la concentrazione dell'azoto misurata alla bocca è 1/40 di quella iniziale per almeno 3 respiri di seguito (da 78% iniziale a <2%).[35] Il numero di TO dell'aria polmonare (si ricorda che 1 TO = volume d'aria espirato che eguaglia l' FRC del soggetto) che sono necessari per completare il washout fino all'endpoint suddetto è l'LCI. Una descrizione dettagliata del significato e delle modalità di calcolo degli indici della fase III alveolare, Scond e Sacin, che riflettono rispettivamente l'inomogeneità della ventilazione che ha origine prossimalmente all'acino e intracinare, è stata già fornita nell'introduzione. Il sampling della fase III per la valutazione dello slope avviene nei bambini tra il 65% e 95% del volume espirato e il calcolo di Scond e Sacin richiede un

controllo di qualità respiro per respiro, volto ad eliminare tutti i respiri in cui la fase III non appaia chiaramente distinguibile in assenza di volume di segnale o quelli in cui essa rappresenti >75% o meno del 50% del volume totale espirato.[35] Parametri utili per valutare l'affidabilità dei singoli trials sono la variabilità dell'FRC, che non dovrebbe essere oltre il 25% per tre trials accettati e oltre il 10% per 2 trials accettati, e la variabilità del LCI, che è attesa essere entro il 10% circa tra un trial e l'altro.[75] Per completare il MBW è raccomandabile eseguire 3 trials qualitativamente accettabili della durata di 3-4 minuti ognuno. Tra un trial e l'altro, è necessario attendere alcuni minuti perché la concentrazione di N₂ alveolare torni al valore originale del 78%, per una durata totale del test di 20-25 minuti. Quando gli outcomes del MBW sono riportati da 2 trials, questo andrebbe specificato.[35] Altri motivi di esclusione di un trial, a parte i già citati leaks (visibili come uno *spike* nella concentrazione N₂ alla curva del washout, sono la presenza di un pattern respiratorio irregolare e, per il solo calcolo di Sacin, un primo respiro che abbia una fase III con alterazioni del segnale o che corrisponda a meno del 50% o più del 75% del volume totale del respiro. Qualora più di un terzo dei respiri compresi tra 1.5 e 6 TO vengano esclusi all'analisi di qualità per Scond, non sarà possibile derivare questo parametro dal trial. Tuttavia, trials in cui non è possibile calcolare gli indici di fase III, possono essere accettabili per il calcolo dell'LCI.

Per l'analisi dei risultati del MBW è stato utilizzato il software Spiroware 3.1.6 (Ecomedics, Svizzera). LCI, Scond e Sacin sono stati riportati come valori assoluti, dal momento che non sono influenzati in modo significativo dalle dimensioni corporee e dall'età dei bambini in età scolare,[75,204] e, inoltre, non sono stati finora pubblicati valori teorici di riferimento per N₂MBW.

Studio 1: impatto dello IUGR sulla funzionalità respiratoria di grandi pretermine

Questo studio ha incluso soggetti di età compresa tra 8.0-15.0 anni, nati a 25-31 settimane di gestazione tra il 2004 e il 2010 e ricovero in epoca neonatale presso la Terapia Intensiva Neonatale dell'ASUI Udine.

E' stato applicato un campionamento casuale stratificato per ottenere un numero di bambini in età scolare nati a <32 settimane EG con IUGR, equamente distribuiti lungo il periodo di anni di nascita 2004-2010 e un numero doppio di bambini grandi pretermine con crescita fetale normale, matchati per ± 1 anno di età e ± 1 settimana di EG alla nascita rispetto agli IUGR. Controlli a termine, matchati per età con i pretermine, sono stati reclutati da una scuola locale su base volontaria.

La diagnosi di IUGR era basata sui criteri di biometria fetale e di flussimetria dell'arteria ombelicale (ecografia doppler) indicati da una recente Consensus internazionale, ovvero la presenza di una circonferenza addominale fetale (AC) o di un peso fetale stimato (EFW) <3° centile o l'assenza di un flusso telediastolico nell'arteria ombelicale all'ecografia ostetrica più recente prima della nascita.[163] Criteri alternativi sono stati la presenza di AC/EFW <10° centile combinata con un indice di pulsatilità dell'arteria uterina >95° centile e/o un indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale >95° centile.[163] Queste misurazioni vengono registrate di routine presso il nostro centro durante l'ecografia ostetrica.

Potenza dello studio e analisi statistica nello studio 1

Una dimensione minima del campione di 27 bambini pretermine IUGR e 54 bambini pretermine senza IUGR avrebbe fornito l'80% di potenza al livello di significatività del 5% (test a due code) per rilevare una riduzione media del FEV₁ di 0.6 z-score nel gruppo

IUGR (DS 0,9 in entrambi i gruppi).[183] Da una fase pilota dello studio, è stato stimato che circa il 40% dei prematuri invitati a partecipare, non avrebbe completato le valutazioni per motivi diversi (rifiuto, incapacità di eseguire i tests, etc.).

La normalità della distribuzione è stata valutata con il test di *Shapiro-Wilk*. I confronti tra gruppi sono stati effettuati utilizzando il test *t* non accoppiato, il test *Mann-Whitney*, il test *chi-squared* o il test esatto di *Fisher*, a seconda dei casi. La relazione tra le variabili perinatali/postnatali e i risultati dei test respiratori in bambini prematuri è stata inizialmente valutata utilizzando delle analisi di regressione lineare semplice. La validità degli assunti della regressione e il fitting dei modelli sono stati valutati attraverso l'analisi dei residui e il test di decomposizione della matrice informativa di *Cameron & Trivedi*. E' stata effettuata un'analisi di mediazione analysis[205] per valutare l'effetto totale di IUGR su FEV₁ z-score, l'effetto indiretto mediato dalla BPD e l'effetto diretto, indipendente dalla BPD. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software STATA (StataCorp. 2014. Stata Statistical Software: Versione 14. College Station, TX: StataCorp LP) e grafici sono stati disegnati con GraphPad Prism versione 8.00 (GraphPad Software, California, USA).

Studio 2: funzionalità respiratoria nei pretermine estremi

Questo studio di follow-up ha incluso tutti i pretermine nati <28 settimane di EG tra il 2004 e 2010 e ricoverati in epoca neonatale nella Terapia Intensiva Neonatale dell'ASUI Udine, che è stato possibile richiamare. I soggetti reclutati in questo studio erano stati precedentemente richiamati e valutati per il follow-up del neuro-sviluppo fino all'età di 7

anni. E' stato utilizzato lo stesso gruppo di controlli a termine dello studio 1, che comprendeva soggetti nati tra il 2004 e 2010.

Potenza dello studio e analisi statistica nello studio 2

La potenza dello studio in questo caso è stata calcolata sulla base dell'outcome Scond, poiché uno degli obiettivi era valutare se questo indice di funzionalità polmonare sia più sensibile del FEV₁ nell'individuare una funzionalità respiratoria anormale nei pretermine estremi. Lo studio precedente più rappresentativo che aveva valutato Scond in questa popolazione,[75] aveva incluso 38 pretermine estremi e 46 controlli a termine, e aveva trovato valori medi (DS) di Scond rispettivamente di 0.033 (0.011) e 0.017 (0.008), con una differenza di 0.016. Nel nostro studio, assumendo uno Scond medio di 0.035 (0.011) nei pretermine estremi e 0.020 (0.010) nei soggetti a termine, un campione di 34 soggetti (17 pretermine estremi e 17 controlli) avrebbe assicurato una potenza statistica pari a 0.9, un livello di significatività di 0.01, con un rapporto di allocazione pretermine estremi:controlli di 1:1 ed un test a due code, per individuare tali differenze. Tuttavia, trattandosi in questo caso di uno studio di coorte, tutti i pretermine estremi sopravvissuti in età scolare e che avevano dato la loro disponibilità ad essere ricontattati per il follow-up della prematurità, sono stati invitati a prendere parte allo studio.

Anche in questo studio la normalità della distribuzione è stata valutata con il test di *Shapiro-Wilk*, i confronti tra gruppi sono stati effettuati mediante gli stessi tests utilizzati nello studio 1, a seconda dei casi. La relazione tra le variabili perinatali/postnatali e i risultati di Scond è stata valutata in un modello di regressione lineare multipla e la validità degli assunti della regressione e il fitting dei modelli anche in questo caso sono stati valutati attraverso l'analisi dei residui e il test di decomposizione della matrice informativa

di *Cameron & Trivedi*. Una $p < 0.05$ è stata ritenuta statisticamente significativa e le analisi sono state effettuate con GraphPad Prism e Stata.

Criteri d'esclusione

Sono stati esclusi i bambini con anomalie cromosomiche o malformazioni congenite, così come quelli con sintomi respiratori nel giorno del test o incapaci di eseguire almeno spirometria e MBW tra i test di funzionalità polmonare previsti. Un ulteriore criterio di esclusione applicato solo per i controlli è stata una storia di sintomi di asma (episodi di sibilo o fischio respiratorio nell'ultimo anno riferiti dai genitori quando sottoposti al questionario ISAAC su asma),[193] in quanto occorreva una popolazione di controlli sani per stimare i valori normali di LCI, Scond e Sacin, per i quali non ci sono valori teorici pubblicati.

RISULTATI

Validazione del MBW

La validazione dell'Exhalyzer D è stata eseguita su un campione di 15 giovani adulti sani che hanno eseguito il MBW 2 volte ciascuno, per un totale di 30 tests, e di 21 bambini (2 con asma cronico) che hanno eseguito il test una sola volta. Negli adulti il tasso di successo per LCI (almeno 2 trials accettabili in un MBW test) è stato del 100%. In totale sono stati eseguiti su questi 15 soggetti 114 trials del MBW (7.6 per persona) con un tasso di successo per LCI sul singolo trial del 84,3% (96/114). Dei 96 trials accettabili per LCI, 7/96 (7%) non soddisfavano i criteri di qualità per il calcolo di Sacin o Scond su singolo trial. In 21 bambini di 8-16 anni di età (età media \pm DS 11.2 \pm 2.5 il tasso di successo per LCI

(almeno 2 trials accettabili in un test) è stato del 90% (19/21). Sono stati eseguiti su questi bambini un totale di 97 MBW trials (4.6 per persona) con un tasso di successo del 64% (62/97) per LCI su singolo trial. Le ragioni d'esclusione dei trials del MBW nel nostro gruppo di adulti e di bambini, in confronto ai dati dello studio di Singer et al,[206] che aveva validato l'uso dell'Exhalyzer D in un campione di soggetti in età pediatrica, sono presentate in tabella 2.

Tabella 1. Ragioni di esclusione di trials del MBW nella fase di validazione dello strumento.

	Adulti (n. 15)	Bambini (n. 21)	Singer et al. [206] (n. 136)
Età media (DS)	giovani adulti	11.2 (2.5)	11.9 (3.2)
N. tot. trials	114	97	408
N. trials esclusi	18 (16%)	35 (36%)	205 (50%)
	Perché esclusi?		
Leak durante il MBW	13/18 (72%)	22/35 (65%)	174/205 (84%)
Pattern resp. pre-washout irregolare	3/18 (16%)	11/35(31%)	
Altro	2/18 (11%)	2/35 (4%)	12/205 (5.8%)

La tabella 2 mostra il confronto tra i coefficienti di ripetibilità per gli outcomes del MBW (CR, 1.96 DS della differenza media tra 2 rilevazioni differenti nello stesso soggetto, come spiegato nei metodi riflette il range di variabilità della misura entro cui le differenze possono dipendere da ragioni tecniche o fisiologiche e non necessariamente patologiche) della nostra popolazione di giovani adulti e i dati di letteratura disponibili.

Tabella 2. Confronto tra la ripetibilità degli outcomes del MBW nel nostro campione di giovani adulti e i dati di letteratura.

	Lab Udine N. 15 giovani adulti	Singer PlosOne 2012 N. 30 giovani adulti[202]	Singer Ped. Pulmonol 2013 N. 50 healthy children[206]
FRC CV%	7.3(4.1)	4.5 (3.2)%	-
FRC inter-test CR	620 mL	808 ml	-
LCI medio (DS)	7.15 (0.51)	7.19 (0.53)	6.1 (0.9)
LCI CV%	5.4 (1.8)	3.2 (1.7)	5.4(1.8)
LCI Inter-test CR	0.78	0.68	0.62
Scond medio	0.013 (0.005)	0.019 (0.005)	-
Scond inter-test CR	0.011	0.008	-
Sacin medio	0.070 (0.028)	0.063 (0.029)	-
Sacin inter-test CR	0.039	0.031	-

CV = Coefficiente di Variazione (DS/media)

CR = 1.96 DS della differenza media tra 2 rilevazioni differenti nello stesso soggetto

Nei prossimi paragrafi saranno presentati i risultati dei due studi effettuati, in maniera separata.

Studio 1: effetti dello IUGR sulla funzionalità respiratoria in grandi pretermine in età scolare.

Caratteristiche generali e perinatali dei partecipanti

Un totale di 135 famiglie di bambini nati pretermine sono state invitate a partecipare allo studio e 86 famiglie di controlli a termine matchati per età hanno dato la propria adesione.

Dopo le esclusioni (figura 1), sono stati analizzati i dati di 28 bambini pretermine con IUGR, 67 senza IUGR e 67 controlli a termine.

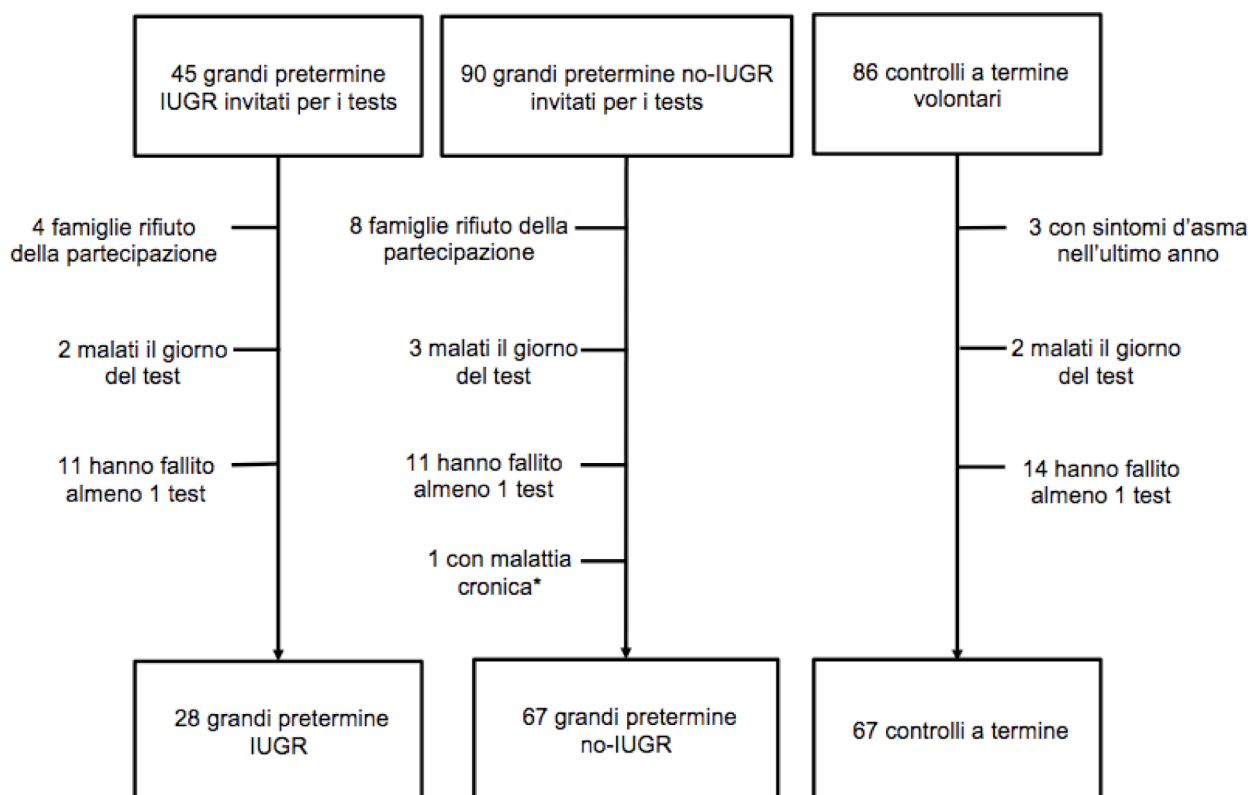


Figura 8. Popolazione dello studio su effetto IUGR nei grandi prematuri. Bambini di età compresa tra 8.0 e 15.0 anni nati molto pretermine (<32 settimane di EG) con e senza una storia prenatale di IUGR (rapporto 1:2) e controlli nati a termine matchati per età.

*Malformazione congenita o anomalia cromosomiche.

Le caratteristiche dei bambini pretermine esclusi dallo studio erano simili a quelle dei soggetti inclusi nell'analisi finale in termini di GA alla nascita e prevalenza di BPD (dati non mostrati). I tassi d'insuccesso tra 118 bambini prematuri sottoposti ai tests di funzionalità respiratoria erano del 6% (7/118) per la spirometria, del 6% (7/118) per TLco e del 12% (14/118) per LCI, mentre in 81 controlli a termine lo erano: 2% (2/81) per la spirometria, 4% (5/81) per TLco e 12% (10/81) per LCI.

Tra i 104 prematuri in cui è stato possibile ottenere l' LCI, il controllo di qualità respiro per respiro ha escluso Scond in 9/104 (9%) e Sacin in 16/104 (15%), mentre nei 71 controlli a termine con LCI, Scond non era disponibile in 5/71 (7%) e Sacin in 9/71 (13%). Gli outcomes dello slope di fase III (Scond e Sacin) non sono stati presi in considerazione nelle analisi finali poiché, a causa dell'alto *failure rate* per questi outcomes, la popolazione finale dello studio sarebbe stata troppo ridotta. Pertanto i dati presentati di seguito si riferiscono solo i soggetti che avevano eseguito correttamente spirometria, TLCO e LCI.

Tra i bambini pretermine con IUGR, 16/28 (57%) avevano un peso alla nascita <10° pc. [190] Come previsto, la prevalenza di pre-eclampsia materna era più alta nei neonati pretermine con IUGR (P = 0.007), che avevano avuto anche episodi di sepsi neonatale più frequenti (P = 0.03) (tabella 3). Il gruppo IUGR aveva richiesto un supporto respiratorio neonatale più intenso e prolungato (tabella 3), che era risultato in una prevalenza di BPD molto più elevata rispetto ai bambini pretermine senza IUGR (43% vs 10%, P = 0.003). La prevalenza complessiva della BPD nei bambini prematuri era del 20% (19/95).

Tabella 3. Caratteristiche prenatali e perinatali dei pretermine nati a <32 settimane EG.

Pretermine	
IUGR n. 28	No IUGR n. 67

Caratteristiche perinatali	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	<i>P</i>
Età gestazionale, settimane	28.5 (27.2, 29.4)	29.0 (27.2, 30.1)	0.3
Peso alla nascita, kg	0.82 (0.74, 0.92)	1.20 (0.96, 1.40)	<0.001
Peso alla nascita z-score †	-1.29 (-1.67, -0.80)	-0.17 (-0.50, 0.33)	<0.001
Supplementazione O ₂ , giorni	34 (0, 89)	5 (1, 39)	0.07
Ventilazione meccanica, giorni	4 (2, 8)	2 (1, 4)	<0.001
CPAP, giorni	10 (3, 29)	10 (3, 23)	0.28
Nutrizione parenterale, giorni	26 (20, 32)	19 (12, 23)	0.002
	n (%)	n (%)	
Nascite gemellari	4 (14%)	16 (24%)	0.3
BPD*	12 (43%)	7 (10%)	0.003
Intubazione	27 (96%)	49 (73%)	0.001
Surfactante	23 (82%)	42 (63%)	0.06
Steroidi postnatali	6 (21%)	3 (5%)	0.01
Pneumotorace	1 (4%)	4 (6%)	>0.99
PDA*	14 (50%)	19 (28%)	0.04
IVH 3-4°	1 (4%)	2 (3%)	>0.99
NEC	1 (4%)	1 (1%)	>0.99
Sepsi emocoltura positiva	9 (32%)	9 (13%)	0.03
Steroidi antenatali	23 (82%)	51 (76%)	0.1
Fumo materno in gravidanza	1 (4%)	6 (9%)	0.3
Pre-eclampsia materna	10 (36%)	8 (12%)	0.007
PROM (>24 h)	5 (18%)	8 (12%)	0.2
Corioamniotite istologica [§]	4 (14%)	21 (31%)	0.12
Malperfusion vascolare materna istologica [¶]	15 (54%)	31 (46%)	0.6

Abbreviazioni: IUGR, ritardo di crescita intrauterino; CPAP, pressione positiva delle vie aeree continua; BPD, displasia bronc; PDA Dotto arterioso pervio; PROM, rottura prolungata delle membrane (> 24 h)

† Z-score peso neonatale basato su Fenton *et al.*[190]

*BPD definita come FiO₂ >21% a 36 settimane età gestazionale.

*PDA che ha richiesto trattamento farmacologico o chirurgico

§ Corioamniotite istologica definita secondo Redline *et al.*[191]

Malperfusion vascolare materna definita in presenza di almeno uno tra i seguenti: ipoplasia dei villi distali, maturazione accelerata dei villi, infarti, arteriopatia deciduale.[192]

All'epoca della valutazione, i bambini prematuri e i controlli a termine erano comparabili

per quanto riguarda la distribuzione del sesso e l'età attuale (tabella 4), mentre i primi

avevano una statura inferiore rispetto ai secondi (P = 0,03) (tabella 4). I grandi pretermine

non hanno mostrato differenze nei valori antropometrici in età scolare in base al pattern di

crescita fetale (tabella). I bambini prematuri avevano più frequentemente una storia

passata di bronchiolite (P < 0.001) e wheezing prescolare (P = 0.002), mentre i gruppi di

pretermaturi IUGR e non IUGR erano comparabili in termini di comorbidità respiratoria post-

neonatale (tabella 4).

Tabella 4. Antropometria e comorbidità respiratoria post-neonatale nei pretermine <32 settimane EG e nei controlli a termine

	Grandi pretermine n. 95	Controlli n. 67	Diff. media (95% CI) P	Grandi pretermine		Diff. media (95% CI) P
				IUGR n. 28	No IUGR n. 67	
Maschi	53 (55%)	32 (48%)		14 (50%)	38 (56%)	
Età, anni	10.9 (1.9)	11.3 (2.0)	-0.4 (-1.0, 0.2) P = 0.18	11.0 (2.0)	10.9 (1.8)	0.1 (-0.7, 1.0) P = 0.7
Altezza z-score	0.01 (0.93)	0.33 (0.88)	-0.31 (-0.60, -0.02) P = 0.03	-0.01 (0.95)	0.07 (0.91)	-0.08 (-0.51, 0.33) P = 0.4
BMI z-score	0.63 (1.24)	0.31 (1.09)	0.32 (-0.05, 0.69) P = 0.4	0.57 (1.22)	0.65 (1.26)	-0.08 (-0.65, 0.50) P = 0.6

Morbilità respiratoria	n (%)	n (%)	P	n (%)	n (%)	P
Bronchiolite	28 (29%)	7 (15%)	<0.001	6 (21%)	22 (33%)	0.3
Wheezing prescolare	28 (29%)	6 (9%)	0.002	7 (25%)	21 (31%)	0.5
Sintomi d'asma [#]	11 (12%)	-		3 (11%)	8 (12%)	>0.9
Rinite allergica	11 (12%)	11 (16%)	0.3	4 (14%)	12 (18%)	0.7
Fumo passivo	22 (23%)	12 (18%)	0.4	7 (25%)	15 (22%)	0.7

Abbreviazioni: IUGR, ritardo crescita intrauterino; BMI, indice massa corporea;

Valori presentati come media (SD), se non diversamente specificato

Z-scores antropometrici basati sul riferimento di crescita dell'OMS[195]

[#] In base alla risposta alla domanda scritta "Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha avuto un respiro affannoso a riposo o respiro con fischio?"[194]

Funzionalità polmonare nei bambini grandi pretermine e nei controlli

Sono state riscontrate differenze significative nel valore medio di FEV₁ z-score, TLco z-score e LCI tra il gruppo dei pretermine e i controlli nati a termine (tabella 5). I bambini prematuri con IUGR avevano un FEV₁ ridotto di circa 0.6 z-scores rispetto ai loro omologhi con crescita fetale normale, ma non valori significativamente diversi da TLco e LCI (tabella 5).

Tabella 5. Funzionalità respiratoria in età scolare (8-15 a.) nei pretermine < 32 settimane EG e nei controlli a termine.

	Grandi pretermine					
	Grandi pretermine n. 95	Controlli n. 67	Diff. media (95% CI; P)	IUGR n. 28	No IUGR n. 67	Diff. media (95% CI; P)
FEV ₁ z-score	-0.03 (1.04)	0.31 (0.81)	-0.33 (-0.64, -0.03) P= 0.03	-0.51 (0.94)	0.15 (1.08)	- 0.66 (-1.12, -0.19) P= 0.006

FVC z-score	-0.04 (1.12)	0.18 (0.78)	-0.22 (-0.52, 0.09) <i>P</i> = 0.2	-0.36 (0.93)	0.10 (1.16)	-0.45 (-0.95, -0.03) <i>P</i> = 0.07
FEV ₁ /FVC z-score	-0.02 (0.91)	0.11 (0.73)	-0.13 (-0.39, 0.12) <i>P</i> = 0.3	-0.20 (1.01)	0.05 (0.88)	-0.25 (-0.65, -0.15) <i>P</i> = 0.2
TLco z-score	-0.24 (0.76)	0.27 (0.68)	-0.51 (-0.74, -0.28) <i>P</i> = <0.0001	-0.31 (0.63)	-0.20 (0.80)	-0.11 (-0.44, 0.23) <i>P</i> = 0.5
LCI	7.25 (0.73)	7.02 (0.43)	0.23 (0.02, 0.42) <i>P</i> = 0.03	7.42 (0.99)	7.18 (0.59)	0.24 (-0.09, 0.56) <i>P</i> = 0.14

Abbreviazioni: FEV₁, volume espiratorio forzato nel primo secondo; FVC, capacità vitale forzata; TLco, transfer factor del monossido di carbonio; LCI, lung clearance index

Valori espressi come media (DS) e differenza media non aggiustata (95% CI), a meno che non diversamente specificato Z-scores spirometrici e TLco secondo i valori di referenza della Global Lung Function Initiative. [60,200]

Confrontando separatamente i risultati dei test respiratori dei bambini pretermine con IUGR e senza IUGR, rispetto a quelli dei controlli a termine, il gruppo IUGR mostrava differenze significative sia nel FEV₁, che nel TLco e nell'LCI, mentre i bambini prematuri con crescita fetale normale avevano solo TLco significativamente più basso (figura 9).

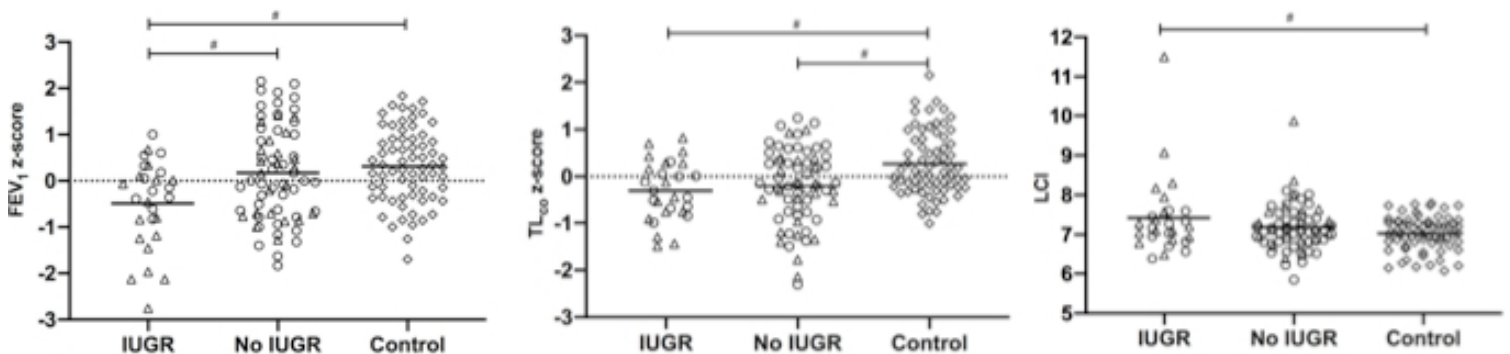


Figura 9. Confronto del FEV₁ z-score (sn), TLco z-score (centro) e Lung Clearance Index (LCI) (dx) in 28 grandi pretermine con IUGR, 67 grandi pretermine con crescita fetale normale e 67 controlli a termine. Le barre solide indicano i valori medi in ogni gruppo. Nei prematuri, i cerchi aperti rappresentano i soggetti con displasia broncopolmonare (BPD) e i triangoli quelli senza. Spirometria e TLco z-score basati sui valori di riferimento della Global Lung Function Initiative. [60,200]

#*P* <0.05 tra gruppi.

I grandi prematuri con BPD avevano risultati significativamente peggiori di quelli senza BPD ai test respiratori (tabella 6).

Tabella 6. Funzionalità respiratoria nei pretermine nati <32 settimane con o senza broncodisplasia polmonare

	Grandi pretermine		Diff. media (95% CI; <i>P</i>)
	BPD	No BPD	
n	19	76	
Età	10.8 (1.7)	10.9 (1.9)	-0.1 (-1.1, 0.8) <i>P</i> = 0.7
Età gestazionale	27.6 (1.4)	28.9 (1.7)	-1.3 (-2.1, -0.4) <i>P</i> = 0.003
FEV1 z-score	-0.74 (1.09)**	0.15 (0.95)	-0.90 (-1.40, -0.40) <i>P</i> = <0.001
FVC z-score	-0.51 (1.17)*	0.04 (1.08)	-0.55 (-1.11, 0.00) <i>P</i> = 0.05
FEV1/FVC z-score	-0.36 (1.01)*	0.08 (0.86)	-0.45 (-0.90, 0.00) <i>P</i> = 0.05
TLCO z-score	-0.60 (0.87)**	-0.15 (0.70)**	-0.45 (-0.83, -0.10) <i>P</i> = 0.02
LCI	7.62 (1.09)**	7.15 (0.58)	0.46 (0.10, 0.83) <i>P</i> = 0.01

Abbreviations: FEV₁, volume espiratorio forzato nel primo secondo; FVC, capacità vitale forzata; TLco, transfer factor del monossido di carbonio; LCI, lung clearance index

Valori espressi come media (DS) e differenza media non aggiustata (95% CI), a meno che non diversamente specificato

Z-scores spirometrici e TLco secondo i valori di referenza della Global Lung Function Initiative.[60,200]

P*<0.05 & *P*<0.001 compared to term controls.

Alle analisi di regressione univariata, mentre la BPD era significativamente associata ad ogni outcome dei test respiratori, IUGR era associato negativamente solo con FEV1 z-score (B = -0.66, 95 CI% -1.10, -0.21, *P* = 0.004) (tabella 7). Delle altre covarianti perinatali e post-neonatali prese in considerazione, solo l'età gestazionale alla nascita aveva una relazione positiva ma molto debole con FEV1 z-score (tabella 7).

Tabella 7. Regressione lineare semplice dei fattori perinatali e postnatali (variabili indipendenti) e dei risultati di funzionalità respiratoria (variabili dipendenti) in 95 bambini grandi pretermine

	FEV ₁ z-score	TLCO z-score	LCI
	B (95% CI)	B (95% CI)	B (95% CI)
Maschio	-0.10 (-0.53, 0.32)	-0.28 (-0.58, 0.02)	0.05 (-0.25, 0.35)
IUGR	-0.66* (-1.10, -0.21)	-0.10 (-0.44, 0.23)	0.23 (-0.08, 0.53)
Età corrente	0.00 (-0.10, 0.11)	-0.06 (-0.14, 0.13)	0.00 (-0.07, 0.08)
BMI z-score	0.11 (-0.05, 0.29)	0.17 (0.05, 0.29)*	0.04 (-0.07, 0.16)
Età gestazionale [†]	0.007 (0.000, 0.15)*	0.003 (-0.001, 0.008)	-0.001 (-0.002, 0.003)
BPD	-0.90** (-1.39, -0.39)	-0.46 (-0.83, -0.08)*	0.46 (0.10, 0.83)**
Wheezing prescolare	-0.40 (-0.86, 0.51)	0.18 (-0.16, 0.51)	0.16 (-0.16, 0.49)
Sintomi d'asma [#]	0.23 (-0.42, 0.89)	0.45 (-0.19, 0.92)	0.29 (-0.17, 0.76)
Fumo materno in gravidanza	-0.20 (-1.01, 0.60)	0.04 (-0.54, 0.63)	0.14 (-0.43, 0.71)
Fumo passivo post-natale	-0.40 (-0.90, 0.08)	-0.18 (-0.55, 0.17)	-0.11 (-0.47, 0.23)

Abbreviazioni: BMI, indice di massa corporea; BPD, displasia broncopolmonare IUGR, ritardo di crescita intrauterino. FEV₁, volume espiratorio forzato nel primo secondo; FVC, capacità vitale forzata; TLco, transfer factor del monossido di carbonio; LCI, lung clearance index

Valori espressi come media (DS) e differenza media non aggiustata (95% CI), a meno che non diversamente specificato

. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$

BMI z-scores basato sui valori teorici del WHO.[195] Z-scores spirometrici e TLco secondo i valori di referenza della Global Lung Function Initiative.[60,200]

[†]Aumento unitario di settimane di età gestazionale alla nascita

[#] In base alla risposta alla domanda scritta "Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha avuto un respiro affannoso a riposo o respiro con fischio?"[194]

All'analisi di mediazione, l'effetto totale di IUGR su FEV₁ z-score è stato lo stesso della regressione univariata (B = -0.66) ma con significatività borderline (95% CI -1.33, 0.01; P = 0.05), mentre la BPD rappresentava il 35% di questo effetto (effetto indiretto B = -0.23; 95% CI -0.45, -0.11; P = 0.03) (figura 10).

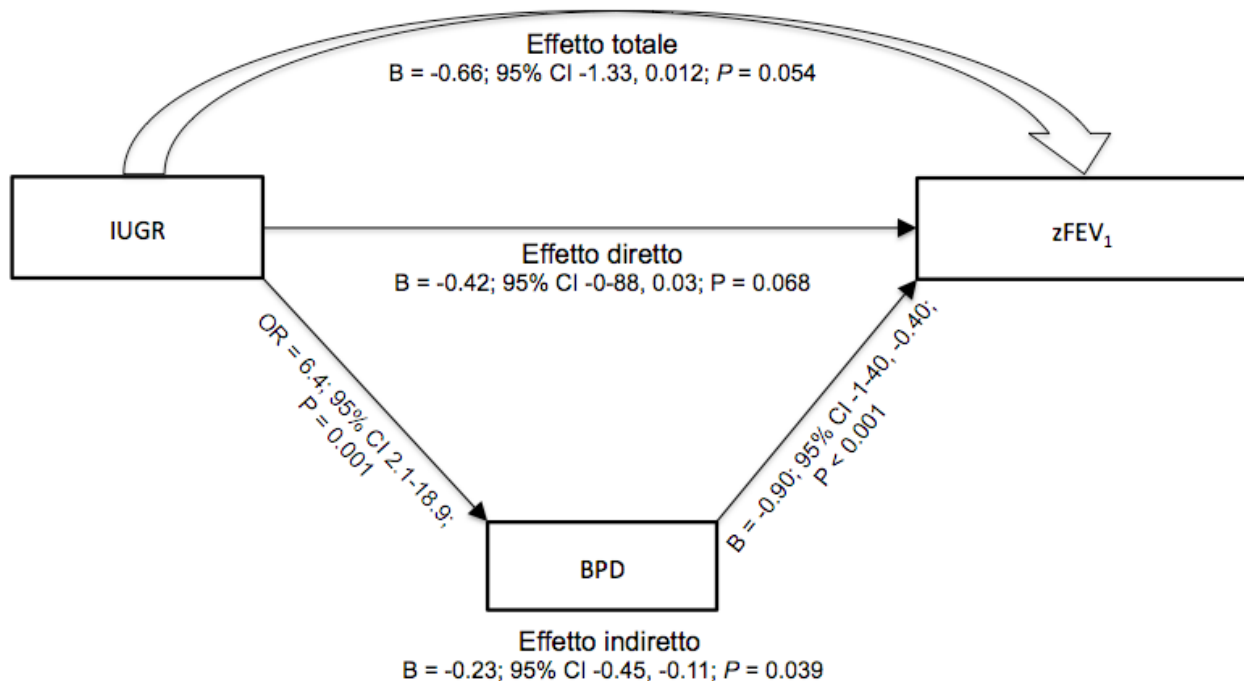


Figura 10. Mediation analysis della relazione tra IUGR e FEV₁ z-score in 95 bambini grandi pretermine di 8.0-15.0 anni. Pseudo R² = 0.13. L'effetto indiretto indica l'effetto dell'esposizione (IUGR) sul risultato (zFEV₁) che agisce tramite BPD (mediatore). Effetto diretto indica l'effetto di IUGR su zFEV₁ che è indipendente dalla BPD. Sono inoltre presentate la regressione logistica univariata di IUGR vs BPD e la regressione lineare di BPD vs FEV₁.

Studio 2: Effetti della prematurità estrema sugli outcomes respiratori in età scolare

Caratteristiche della study population

Su una coorte di 126 pretermine estremi nati <28 settimane EG tra il 2004 e 2010 e ricoverati in epoca neonatale presso la TIN di Udine, è stato possibile richiamarne 80 (63%). Gli altri erano deceduti o non avevano acconsentito a essere richiamati per il proseguo del follow-up. Un totale di 21 pretermine estremi, erano stati coinvolti anche nello studio sugli effetti dello IUGR. La popolazione dei controlli a termine era la stessa utilizzata per lo studio sugli effetti dello IUGR. In questo caso, dopo le esclusioni sono stati ritenuti nelle analisi finali (figura 11) solo i soggetti che avevano eseguito correttamente spirometria e MBW, comprensivo degli indici LCI, Sacin e Scond. Tra questi 3/47 (6%) pretermine estremi e 4/60 controlli a termine non avevano il TLco.

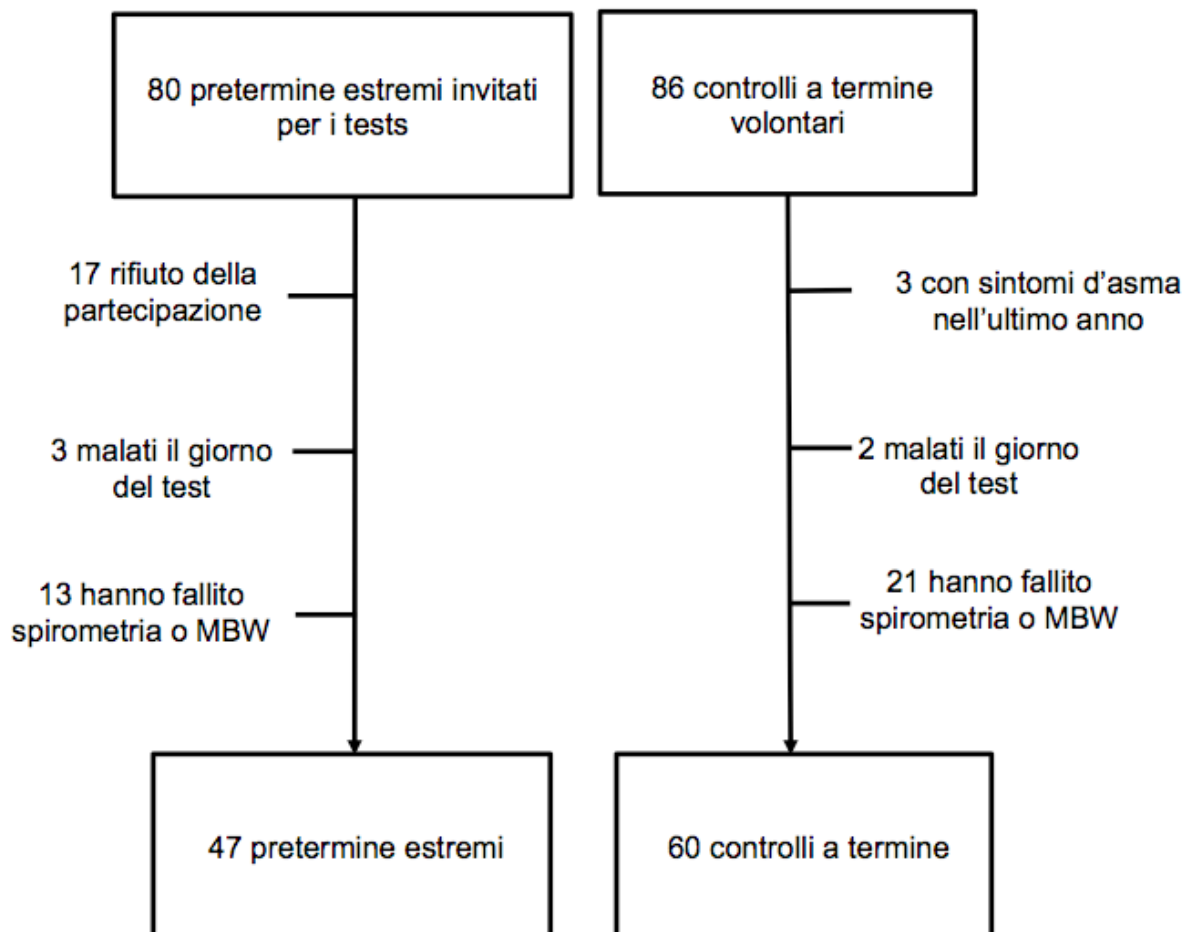


Figura 11. Popolazione dello studio sugli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità respiratoria in età scolare. Bambini di età compresa tra 8.0 e 15.0 anni nati (<28 settimane EG) e controlli nati a termine matchati per età.

Tra i 63 pretermine estremi che hanno accettato di sottoporsi ai test respiratori, in 3/60 (5%) non è stato possibile effettuarli perché avevano un'infezione respiratoria acuta in corso, in ulteriori 4/60 (7%) si è soprasseduto ai tests per la presenza di ritardo cognitivo o deficit di attenzione/concentrazione. Tra i 56 pretermine estremi che hanno effettivamente eseguito le prove di funzionalità respiratoria, il *failure rate* per i singoli test è stato del 4% (2/60) per la spirometria, del 9% (5/56) per TLco, del 8% (5/56) per LCI, del 14% (8/56) per Scond, del 12% per Sacin (7/56). Per i controlli il tasso di fallimento per singolo test è stato già riportato nella sezione dei risultati relativa allo studio IUGR. I 14 pretermine

estremi esclusi per *test failure* avevano una prevalenza di BPD (42%), simile a quella dei 47 pretermine estremi inclusi nelle analisi finali (37%).

Rispetto ai controlli, i pretermine estremi presentavano un deficit staturale significativo (tabella 8) (differenze media di height z-score = -0.57; 95% CI -0.90, -0.23; $P = 0.001$), sebbene il valore medio di height z-score dei pretermini estremi fosse poco al di sotto dell'atteso (-0.19 ± 0.87 z-scores). Come previsto, i pretermini estremi avevano una frequenza molto maggiore di bronchiolite e preschool wheezing rispetto ai controlli a termine (tabella 8)

Tabella 8. Antropometria all'epoca della raccolta dati e comorbilità respiratoria post-neonatale in pretermine estremi e controlli di 8-14 anni di età.

	Pretermine estremi n. 47	Controlli n. 60	Diff. media (95% CI) P
Maschi	25 (53%)	30 (50%)	
Età, anni	11.3 (2.0)	11.6 (1.9)	-0.3 (-1.0, 0.4) $P = 0.4$
Altezza z-score	-0.19 (0.87)	0.38 (0.88)	-0.57 (-0.90, -0.23) $P = 0.001$
BMI z-score	0.62 (1.25)	0.34 (1.14)	0.28 (-0.17, 0.73) $P = 0.2$
Morbilità respiratoria	n (%)	n (%)	P
Bronchiolite	18 (38%)	7 (12%)	0.001
Wheezing prescolare	17 (36%)	5 (8%)	0.0006

Sintomi d'asma [#]	4 (9%)	-	
Rinite allergica	5 (10.6%)	11 (18%)	0.3
Fumo passivo	10 (21%)	10 (17%)	0.4

Abbreviazioni: IUGR, ritardo crescita intrauterino; BMI, indice massa corporea;

Valori presentati come media (SD), se non diversamente specificato

Z-scores antropometrici basati sul riferimento di crescita dell'OMS[195]

[#] In base alla risposta alla domanda scritta "Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha avuto un respiro affannoso a riposo o respiro con fischio?"[194]

Per quanto riguarda la storia perinatale, tra i pretermine estremi quelli che hanno sviluppato BPD avevano un peso neonatale normalizzato per età gestazionale significativamente più basso (tabella 9) e, come prevedibile, avevano ricevuto più frequentemente trattamento neonatale con corticosteroidi (tabella 9). Le frequenze di fumo materno durante la gravidanza, di pre-eclampsia, di rottura delle membrane per oltre 24 h e di sepsi neonatale, erano tutte maggiori nel gruppo di soggetti con BPD, tuttavia le differenze non erano significative, probabilmente anche a causa delle limitate dimensioni del campione.

Tabella 9. Caratteristiche prenatali e perinatali dei pretermine nati a <28 settimane EG.

Caratteristiche perinatali	Pretermine		P
	BPD n. 17	No BPD n. 30	
	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
Età gestazionale, settimane	27.0 (25.2, 27.2)	26.1 (25.2, 27.0)	0.2
Peso alla nascita, kg	0.70 (0.61, 0.85)	0.88 (0.77, 0.94)	0.009
Z-score peso alla nascita [†]	-0.60 (-1.53, 0.05)	-0.05 (-0.31, 0.50)	0.006
O ₂ supplementazione, giorni	96 (73, 106)	5 (1, 39)	<0.0001

Ventilazione meccanica, giorni	8 (5, 15)	2 (1, 4)	0.0002
CPAP, giorni	33 (26, 40)	25 (18, 31)	0.004
	n (%)	n (%)	
Gravidanza gemellare	4 (23%)	11 (37%)	0.3
Surfactante	14 (82%)	24 (80%)	0.8
Steroidi antenatali	15 (88%)	24 (80%)	0.4
Steroidi postnatali	10 (59%)	3 (10%)	0.0003
PDA*	9 (52%)	16 (53%)	0.9
IVH 3-4°	3 (18%)	1 (3%)	0.1
NEC	2 (12%)	1 (1%)	0.5
Sepsi	11 (64%)	13 (43%)	0.15
Fumo materno in gravidanza	3 (18%)	1 (3%)	0.3
Pre-eclampsia materna	6 (35%)	4 (13%)	0.1
PROM (>24 h)	4 (23%)	4 (13%)	0.4
Corioamniotite istologica [§]	5 (29%)	16 (53%)	0.1

Abbreviazioni: IUGR, ritardo di crescita intrauterino; CPAP, pressione positiva delle vie aeree continua; BPD, displasia bronc; PDA Dotto arterioso pervio; PROM, rottura prolungata delle membrane (> 24 h)

[†] Z-score peso neonatale basato su Fenton *et al.*[190]

*BPD definita come FiO₂ >21% a 36 settimane età gestazionale.

*PDA che ha richiesto trattamento farmacologico o chirurgico

[§] Corioamniotite istologica definita secondo Redline *et al.*[191]

Per quanto riguarda la funzionalità respiratoria, sono state riscontrate differenze significative in tutti gli outcomes tra i pretermine estremi e i controlli a termine, eccetto per il Sacin (tabella 10). Tra i pretermine estremi, c'erano differenze significative tra il gruppo con BPD e senza BPD per FEV₁ z-score, FVC z-score e TLco z-score medio, ma non per gli outcomes del MBW (LCI, Scond, Sacin).

Tabella 10. Funzionalità respiratoria nei pretermine estremi <28 settimane e nei controlli a termine.

	Bambini <28 settimane (N=47)	Controlli (N=60)	Δ (95% CI)	<28 sett. BPD (N=17)	<28 sett. NO-BPD (N=30)	Δ (95% CI)
Maschi	25 (53%)	27 (50%)	-	10 (59%)	14 (50%)	-
Età	11.3±2.0	11.6±1.9	-	11.1±2.1	11.4±1.9	-
zFEV ₁	-0.41±1.13	0.26±0.83	-0.67 (-1.04 to -0.30)**	-1.18±0.85	0.02±1.05	-1.20 (-1.98; -0.82)**
zFVC	-0.31±1.00	0.16±0.76	-0.47 (-0.81 to -0.13)*	-0.98±0.71	0.07±0.95	-1.05 (-1.58; -0.51)**
zFEV ₁ /FVC	-0.18±1.05	0.09±0.64	-0.27 (-0.59 to 0.06)	-0.41±0.92	-0.04±1.11	-0.36 (-1.00; 0.28)
zTLco°	-0.51±0.83	0.27±0.69	-0.78 (-1.08 to -0.49)**	-0.95±0.79	-0.28±0.76	-0.66 (-1.16; -0.17)*
LCI	7.44±0.91	7.01±0.44	0.43 (0.16 to 0.69)*	7.69±1.12	7.30±0.76	0.39 (-0.16; 0.94)
Scond	0.031±0.021	0.021±0.011	0.010 (0.003 to 0.015)**	0.035±0.018	0.028±0.019	0.007 (-0.004; 0.018)
Sacin	0.059±0.026	0.051±0.020	0.008 (-0.001 to 0.017)	0.063±0.028	0.056±0.027	0.007 (-0.009; 0.022)

Abbreviazioni: FEV₁, volume espiratorio forzato nel primo secondo; FVC, capacità vitale forzata; TLco, transfer factor del monossido di carbonio; LCI, lung clearance index

Valori espressi come media (DS) e differenza media non aggiustata (95% CI), a meno che non diversamente specificato

Z-scores spirometrici e TLco secondo i valori di referenza della Global Lung Function Initiative.[60,200].

° TLco disponibile solo per 44 pretermine estremi e 56 controlli.

*P<0.05; **p<0.001

Dal confronto separato degli outcomes respiratori de prematuri estremi con e senza BPD, rispetto a quelli dei soggetti a termine, emergeva che mentre i soggetti con BPD presentavano differenze significative in tutti gli outcomes, quelli senza BPD non avevano differenze significative solo alla spirometria (FEV₁ e FVC) e Sacin del MBW.

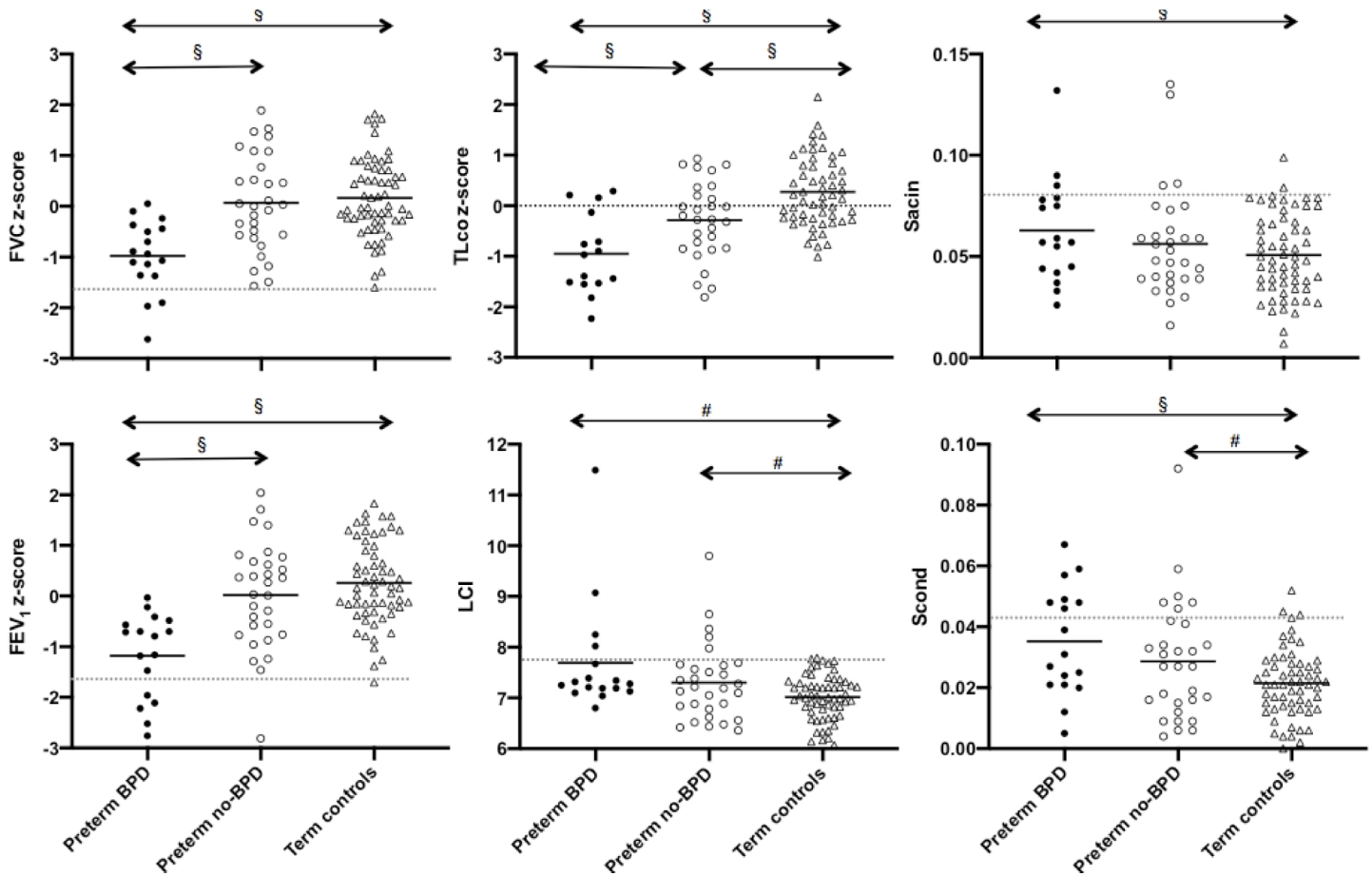


Figura 10. Outcomes ai test di funzionalità respiratoria in età scolare de pretermine estremi con BPD (n. 17, cerchi neri), senza BPD (n. 30, cerchi bianchi) e controlli a termine (n. 60, triangoli bianchi). # P<0.05; § P<0.001

Nonostante la distribuzione di valori di LCI, Scnd e Sacin nella popolazione di controllo non fosse gaussiana, I limiti di norma per i parametri del MBW sono stati ugualmente definiti sulla base del 95° percentile dei controlli poiché, in assenza di valori di referenza pubblicati, e considerando che ci può essere una discreta variabilità da centro a centro, specialmente nei valori degli indici di fase III[75,140], non è possibile usare riferimenti diversi dalla popolazione di controllo per la valutazione dei risultati di questo test.[75] Il limite superiore di norma (LLN) per LCI è risultato di 7.73, per Scnd 0.043 e per Sacin 0.079. Il limite inferiore di norma per indici spirometrici e TLco, come spiegato nei metodi, è stato invece definito al 5° percentile (-1.64 z-scores) della popolazione di riferimento.

[60,200]

Tra i 44 pretermine estremi che hanno effettuato tutti i test correttamente, 25/44 (57%) avevano tutti i risultati entro i limiti di normalità, mentre 19/44 (43%) avevano almeno 1 test patologico. Scond è risultato essere l'indice più frequentemente anormale (13/44, 29%), mentre LCI era patologico in 8/44 (18%) e il FEV₁ z-score nel 14% dei casi (6/44) (figura 11).

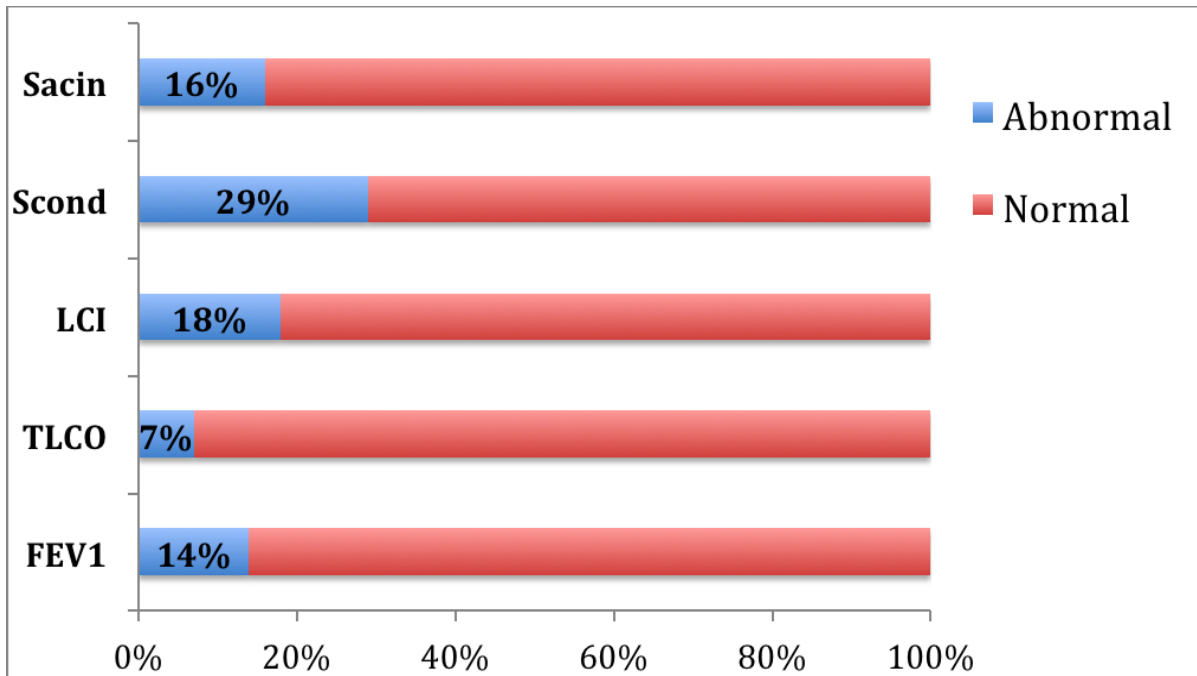


Figura 11. Proporzioni di soggetti nati <28 settimane di gravidanza (n. 44) con risultati patologici ai singoli outcomes respiratori considerati. Limiti di normalità: 5° pc della popolazione di riferimento per FEV₁ e TLCO z-scores; 95° pc del gruppo di controllo per LCI, Sacin, Scond.

Anche applicando il limite inferiore di normalità per FEV₁ z-score basato sulla popolazione di controllo invece che su quella di riferimento (5° pc del FEV₁ -1.25 z-scores invece di -1.64 z-scores), la proporzione di pretermine estremi con FEV₁ anormale era comunque inferiore a quella con Scond patologico (20% vs 29%, P = 0.3)

Tra i 17 pretermine estremi con BPD, 5/17 (29%) avevano FEV₁ patologico e 7/17 avevano Scond patologico (41%) (P = 0.7).

Per quanto riguarda gli indici di funzionalità delle vie aeree di conduzione, in tutta la popolazione dei pretermine estremi c'era solo una correlazione debole negativa con significatività borderline tra FEV₁ z-score e Scond (Pearson $r = -0.28$ (95% CI -0.53 to 0.00); $p = 0.05$; i.e. all'aumentare di Scond, FEV₁ tende debolmente a diminuire), ma restringendo l'analisi ai 17 soggetti con BPD si evidenziava una moderata correlazione negativa ($r = -0.50$, 95% CI -0.79, -0.03, $P = 0.03$). Cinque dei sei pretermine estremi con FEV₁ patologico avevano anche Scond anormale (figura 12). Un'ulteriore porzione di pretermine con Scond patologico non avevano FEV₁ al di fuori dei limiti di normalità ma intorno a -1 z-score, che rappresenta comunque un valore basso (figura 12).

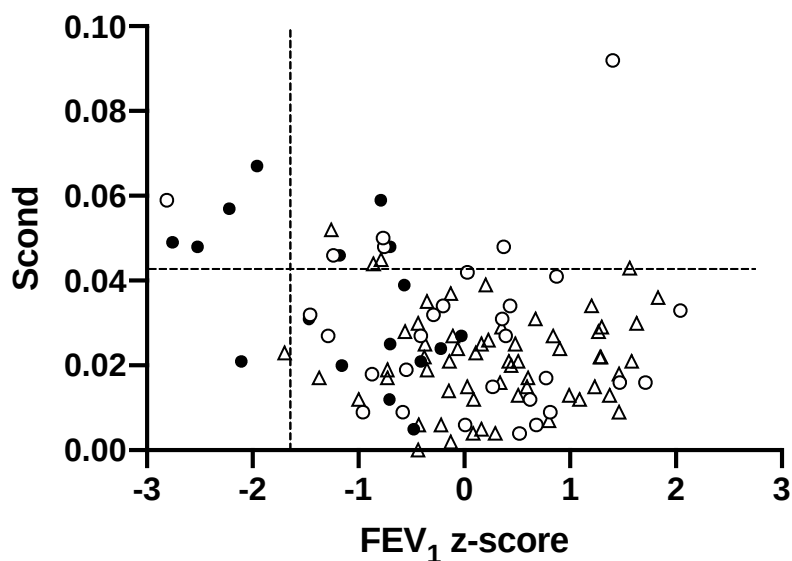


Figura 12. Scatter plot di Scond vs FEV₁ z-score in 47 pretermine estremi e 60 controlli di 8-14 anni di età. I cerchi neri rappresentano pretermine estremi con BPD (n. 17), quelli bianchi pretermine estremi senza BPD e i triangoli sono i controlli a termine.

Invece tra gli indici di funzionalità delle vie aeree intracinarie, non c'era correlazione significativa tra Sacin e TLco z-score, ed anche lo scatter plot di queste due misure negli stessi soggetti indica l'assenza di una chiara associazione tra le 2 misure (figura 13).

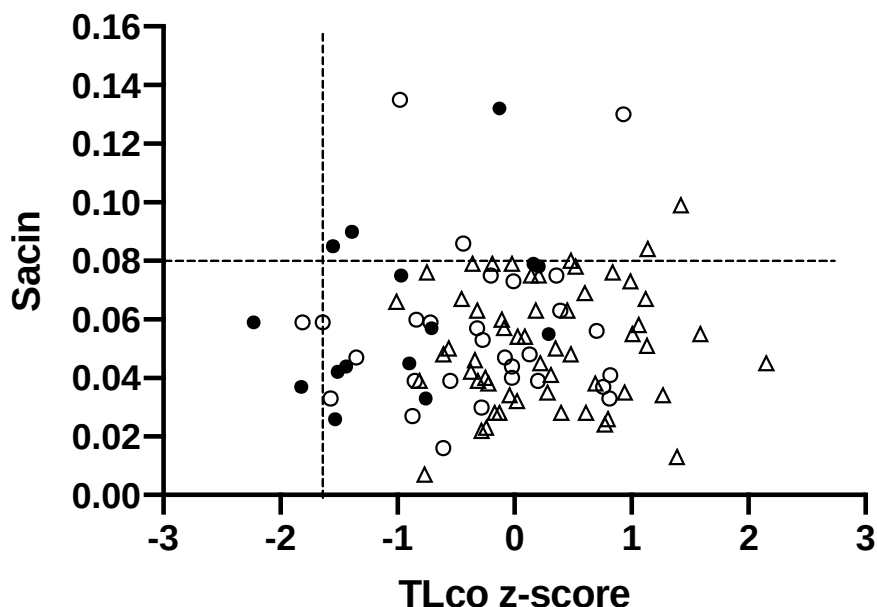


Figura 13. Scatter plot di Sacin vs TLco z-score in 47 pretermine estremi e 60 controlli di 8-14 anni di età. I cerchi neri rappresentano pretermine estremi con BPD (n. 17), quelli bianchi pretermine estremi senza BPD e i triangoli sono i controlli a termine.

Per valutare la relazione tra le variabili perinatali e postnatali considerate e l'outcome

Scond, che era risultato quello più frequentemente alterato nei pretermine estremi, è stato

eseguito un modello di regressione lineare multipla (tabella 11). Una storia di asma

corrente aveva un'associazione significativa positiva con Scond ($B = 0.019$, 95% CI 0.000,

0.038, $P = 0.04$), mentre l'aumento unitario dell'età corrente all'epoca dei test respiratori

aveva un'associazione negativa ma non clinicamente significativa perchè di entità molto

lieve ($B = -0.004$, 95% CI -0.007, -0.001, $P = 0.004$) (tabella 11).

Tabella 11. Modello di regressione lineare multipla per outcome Scond in 47 pretermine estremi di 8-14 anni d'età.

Scond	B	95% CI	P
Maschio	0.00	-0.005, 0.015	NS

Età corrente	-0.004	-0.007, -0.001	0.004
Età gestazionale†	0.003	-0.003, 0.011	NS
Peso neonatale <10° pc*	-0.011	-0.030, 0.006	NS
Steroidi prenatali	0.007	-.007, 0.022	NS
Surfactante	-0.003	-0.018, -0.010	NS
BPD	0.003	-0.012, 0.019	NS
O ₂ giorni	0.000	-0.000, 0.001	NS
Intubazione giorni	0.000	-.0006, 0.011	NS
CPAP	0.000	-.0002, 0.0008	NS
Sintomi d'asma#	0.019	0.000, 0.038	0.04

Abbreviazioni: BPD broncodisplasia polmonare; IUGR, ritardo di crescita intrauterino.

*Z-scores peso alla nascita basati su Fenton et al 2013[190]

†Aumento unitario di settimane età gestazionale alla nascita

#In base alla risposta alla domanda scritta "Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha avuto un respiro affannoso a riposo o respiro con fischio?"[194]

DISCUSSIONE

Lo studio sull'impatto dello IUGR sulla funzionalità respiratoria dei grandi pretermine (< 32 settimane EG) in età scolare ha mostrato che la restrizione di crescita fetale ha un impatto preponderante sulla funzionalità delle vie aeree di calibro maggiore, rappresentate dal FEV₁. L'effetto negativo dello IUGR sul FEV₁, era mediato per circa un terzo dalla BPD, mentre per il resto dipendeva direttamente dalle conseguenze del ritardo di crescita intrauterino sullo sviluppo polmonare, indipendentemente dalla BPD, o da altre variabili non valutate nella *mediation analysis*. Il ritardo di crescita intrauterino non sembra invece avere un effetto ulteriore, oltre quello dovuto alla grande prematurità e alla BPD, sulla funzionalità delle piccole vie aeree (LCI) e sull'efficienza degli scambi gassosi (TLco). La valutazione dell'utilità del MBW per studiare gli effetti dello IUGR sulla funzionalità polmonare dei grandi pretermine è stata limitata dal fatto che gli indici dello slope di fase III, Scond e Sacin, avevano un alto *failure rate* che ne ha precluso la comparazione con gli altri indici di funzionalità polmonare. In ogni caso, per quanto riguarda il MBW, da questo studio emerge che nel follow-up dei grandi pretermine, l'LCI non aggiunge particolari informazioni ulteriori rispetto a quelle derivanti dal FEV₁ e pertanto la sua utilità in questo gruppo appare limitata.

La valutazione dell'utilità del MBW nell'*assessment* della funzionalità respiratoria dei pretermine estremi <28 settimane ha dimostrato invece che, tenendo presente i limiti una valutazione basata su valori di riferimento derivanti dalla popolazione di controllo e non da teorici validati, Scond è l'indice più frequentemente patologico in questo gruppo. Nei soggetti con BPD c'è un buon grado di coerenza tra Scond e FEV₁, con la tendenza ad avere valori più alti di Scond nei soggetti con FEV₁ minore. LCI e Sacin, invece, non sembrano aggiungere informazioni particolarmente utili ai fini del follow-up respiratorio.

Sacin era l'unico indice non significativamente differente tra pretermine estremi e controlli (anche se i BPD analizzati separatamente mostrano valori maggiori). Poiché Sacin riflette l'inomogeneità ventilatoria intracrinare, tale dato suggerisce un certo *catch-up* postnatale dell'alveolarizzazione nei pretermine estremi, che comunque mostrano un deficit della diffusività polmonare (basso TLco). Questo potrebbe dipendere in maniera preponderante dalle alterazioni dello sviluppo vascolare capillare polmonare piuttosto che della superficie alveolare, nel qual caso ci saremmo aspettati anche valori alterati di Sacin e maggior coerenza nei risultati di Sacin e TLco.

Validazione del device per MBW

Nella fase di validazione sui bambini, il tasso di esclusione dei singoli trials del MBW è risultato inferiore rispetto a quello riportato da *Singer et al.* nella validazione dell'Exhalyzer D in età pediatrica (36% vs 50%, $P = 0.01$).[206] Il coefficiente di ripetibilità (CR) inter-test (riflette il range di variabilità della misura entro cui le differenze possono anche dipendere da ragioni tecniche o fisiologiche oltre che da differenze dovute ad alterazioni patologiche) per LCI nella nostra popolazione di giovani adulti era simile a quelli riportati da *Singer et al* [202], così come il CR di Scond(0.011 vs 0.008) e Sacin (0.039 vs 0.031). Nel complesso, da questa fase di validazione le misurazioni del MBW hanno mostrato una buona ripetibilità e dati coerenti con quelli di letteratura. Un elemento da sottolineare è che il CR per Scond era prossimo al valore medio della popolazione di giovani adulti testati (rispettivamente 0.011 e 0.013), il che può rendere più difficoltosa la valutazione di differenze di lievi entità di Scond, che potrebbero dipendere da motivi tecnici o fisiologici piuttosto che da alterazioni fisiopatologiche.

Studio 1: gli effetti dello IUGR sulla funzionalità respiratoria in età scolare di grandi pretermine

Confronto dei risultati con i dati di letteratura

Solo uno studio precedente ha valutato l'impatto della IUGR sulla funzionalità polmonare in bambini pretermine, confrontando soggetti nati a <30 settimane EG con e senza una storia prenatale di flusso telediastolico invertito o assente in arteria ombelicale (un criterio di IUGR precoce).[183] Questo gruppo rappresenta solo una porzione minoritaria dei soggetti con IUGR, la maggior parte dei quali non arriva ad avere una quadro ecodoppler così grave, ma avrà piuttosto un'alterazione della biometria fetale associate ad alterazioni dell'indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale e/o uterine. Infatti, sono questi (biometria e flussimetria) i parametri valutati nella recente definizione di IUGR di una *Consensus* internazionale eseguita secondo la procedura Delphi.[163] Quello presente, è stato il primo studio ad aver valutato la funzionalità respiratoria in soggetti con IUGR, definito secondo i criteri di Gordjin et al.[163] Questo ci ha permesso un reclutamento più accurato della popolazione di studio rispetto a *Morsing et al*,[183] con la conseguenza di una valutazione più precisa e comprensiva degli effetti del ritardo di crescita intrauterino sulla funzionalità respiratoria a lungo termine nei grandi pretermine.

Al di là delle differenze metodologiche, le differenze di FEV₁ z-score medio tra i prematuri con e senza IUGR riportate da *Morsing et al* erano quasi uguali a quelle dello studio presente (~0.6 z-score), anche se in quel lavoro erano risultate non significative, a differenza del nostro. Un'altra differenza è data dal fatto che *Morsing et al* non avevano trovato un'associazione tra BPD (definita come nel presente studio) e *outcomes*

spirometrici, nonostante la frequenza di BPD fosse più alta nel gruppo IUGR.[183] Questo dato appare poco congruente con i nostri *findings* e con quelli della letteratura, d'altronde gli autori stessi precisavano che tale risultato anomalo era probabilmente influenzato dalle scarse dimensioni del campione (90 soggetti, compresi i controlli a termine).[183]

Alcuni studi hanno valutato la funzionalità polmonare in bambini pretermine che sono nati SGA, considerato come un proxy per IUGR. *Ronkainen et al.* hanno trovato che i bambini in età scolare nati a <32 settimane EG con un peso alla nascita <-2 z-scores erano a rischio di FEV₁ ridotto rispetto ai propri pari con peso alla nascita normale,

indipendentemente dalla BPD.[126] Gli autori hanno definito la BPD come il fabbisogno di supplementazione di ossigeno a 28 giorni di vita, riportando frequenze simili nel gruppo SGA e non SGA. Nel presente studio, adottando una definizione più restrittiva di BPD (supplementazione di O₂ a 36 settimane di PMA), abbiamo trovato che questa variabile era molto più frequente tra i prematuri con IUGR rispetto a quelli con crescita fetale normale (42% vs 10%), ed era responsabile del 35% dell'effetto totale negativo della restrizione di crescita fetale sul FEV₁ dei pretermine in età scolare. Inoltre, l'associazione negativa tra SGA e diffusività polmonare riportata da *Ronkainen et al* non è stata confermata nel nostro gruppo IUGR. Ipotizziamo che questi risultati incoerenti possano dipendere, almeno in parte, da differenze nelle popolazioni degli studi, in quanto è noto che i bambini con SGA e quelli con IUGR possono avere outcomes clinici diversi.[155,207]

Thunqvist et al[147] trovato valori spirometrici simili in bambini pretermine nati a EG più precoci (<27 settimane) con e senza peso alla nascita <-2 z-scores. E' possibile che in tali soggetti prematuri gli effetti dello IUGR sulla funzione polmonare siano superati da quelli legati all'im maturità dei polmoni alla nascita; tuttavia, dato il numero limitato di individui

con SGA valutati in quello studio (n = 14),[147] sarà necessario verificare questo dato in studi futuri.

Un peso alla nascita più basso per EG è risultato associato ad un più basso FEV₁ z-score in un'ampia metanalisi che ha coinvolto più di 25.000 bambini, l'8% dei quali (n = 2053) era nato prematuramente.[15] Un risultato interessante di quell'articolo è che i bambini con z-scores di peso alla nascita <-2, che avevano il FEV₁ z-score più basso, avevano un rapporto FEV₁/FVC conservato,[15] indicando probabilmente dimensioni polmonari proporzionalmente ridotte rispetto a quelle corporee. Allo stesso modo, nel nostro gruppo IUGR, nonostante l'alta frequenza della BPD, che di solito è associata alla limitazione del flusso aereo,[4,7] l'indice di *Tiffenau* era relativamente preservato (tabella 5), suggerendo un quadro misto di compromissione dello sviluppo delle vie aeree di calibro maggiore e di riduzione della crescita polmonare. La metanalisi ha inoltre evidenziato un aumento del rischio di asma nei bambini con basso peso alla nascita per GA.[15]

Due studi hanno specificamente studiato il rapporto tra pattern di crescita fetale e rischio di asma in coorti di bambini nati per lo più a termine.[181,182] Turner et al. hanno trovato che una crescita fetale persistentemente bassa a partire dal primo trimestre di gravidanza era associata ad un aumento del rischio di asma a 5 e 10 anni di età (odds ratio 2.8; 95% CI, 1.2-6.9),[181] Den Dekker et al. non hanno trovato un'associazione tra il pattern di crescita fetale e l'asma in età scolare,[182] in modo coerente con i nostri risultati nei sopravvissuti di nascite molto pretermine (tabella 4). Questi studi hanno anche dimostrato che soprattutto il FEV₁, ma anche il FVC, era più basso nei bambini con scarsa crescita fetale, con associazioni parzialmente dipendenti dal modello di crescita del peso infantile in uno studio.[182] Nel complesso, questi risultati sembrano coerenti con i nostri findings di

riduzione di FEV₁ e FVC z-score in bambini pretermine con IUGR rispetto ai loro omologhi con crescita fetale normale, con differenze statisticamente significative solo per FEV₁.

Interpretazione dei risultati e possibili meccanismi fisiopatologici

Evidenze da modelli animali di IUGR rivelano alcuni meccanismi fisiopatologici che possono aver contribuito ai nostri *findings*. Tuttavia, la cautela è necessaria quando si applicano i risultati di questi studi agli esseri umani, a causa dell'eterogeneità dei modelli e dei contesti sperimentali utilizzati, al di là delle differenze nello sviluppo respiratorio tra animali e umani.[166] Su scala macroscopica, i feti di agnello che subiscono una prolungata denutrizione fetale indotta da insufficienza placentare, mostrano una crescita polmonare limitata proporzionale alla ridotta crescita corporea.[167] Nella nostra coorte, sebbene i bambini pretermine con IUGR abbiano avuto un recupero delle dimensioni del corpo rispetto a quelli senza storia di IUGR (tabella 4), una crescita polmonare limitata potrebbe spiegare perché avevano ridotti FEV₁ e FVC z-score, con conservazione relativa del rapporto FEV₁/FVC (tabella 5).

Negli studi su animali, la denutrizione che si verifica durante lo stadio sacculare dello sviluppo polmonare influisce principalmente sull'alveolarizzazione, sulla crescita vascolare polmonare e sull'efficienza della barriera alveolare-capillare, con conseguente riduzione della capacità di diffusione post-natale.[14,208] Tutti i bambini grandi pretermine coinvolti in questo studio hanno sperimentato condizioni simili durante la maggior parte dello stadio sacculare che si è verificato al di fuori dell'utero. Probabilmente, per questo motivo nei grandi prematuri non ci sono state differenze significative nei punteggi di TLco z-score a seconda del pattern di crescita fetale, anche se la loro capacità diffusiva polmonare era inferiore rispetto ai controlli a termine (figura 9)

È interessante notare che solo i bambini pretermine con IUGR avevano un'efficienza del gas mixing ridotta (LCI elevato) rispetto ai bambini nati a ≥ 37 settimane GA. Tuttavia, poiché alle analisi di regressione solo BPD ma non IUGR era associato a un maggiore LCI (tabella 7), è probabile che questo risultato dipendesse dalla maggiore frequenza della BPD nel gruppo IUGR.

Sebbene i meccanismi esatti che colleghino lo IUGR, la compromissione della maturazione polmonare e le conseguenze a lungo termine sulla salute respiratoria negli esseri umani, siano ancora lungi dall'essere compresi, sicuramente i cambiamenti epigenetici innescati dalla restrizione di crescita fetale e che influenzano le vie di segnalazione coinvolte nella maturazione delle vie aeree, hanno ruolo importante in questo processo.[174]

Un risultato incoraggiante è stato che i risultati spirometrici sia dei grandi pretermine con BPD che senza BPD erano migliori di quelli riportati in coorti precedenti di grandi pretermine nati nell'era del surfactante.[5,209] E' possibile che questi risultati positivi riflettano i miglioramenti dell'assistenza respiratoria perinatale che si sono verificati in questo periodo e che potrebbero migliorare gli *outcomes* respiratori a lungo termine di questi bambini.

Punti di forza e debolezze dello studio sullo IUGR

Un punto di forza di questo studio è che rappresenta la prima valutazione della funzione polmonare in bambini prematuri con diagnosi di IUGR secondo gli standard internazionali recentemente pubblicati.[163] L'integrazione dei risultati di diversi test respiratori secondo i valori di riferimento raccomandati dall'ERS/ATS.[60,200]

Tra le limitazioni, le misurazioni hanno incluso solo i bambini in grado di eseguire correttamente le prove di funzionalità respiratoria, quindi i risultati potrebbero aver sottostimato il *burden* dell'*impairment* respiratorio nella popolazione complessiva dei grandi pretermine. Agli investigatori era noto lo stato di nascita dei partecipanti e avrebbero potuto essere influenzati da questa conoscenza nell'esecuzione dei test. Lo studio era sottodimensionato per la *mediation analysis*, quindi l'effetto totale di IUGR su FEV₁ non ha raggiunto la significatività statistica. Inoltre, alcuni potenziali confondenti, come il fumo materno durante la gravidanza, non sono stati inclusi nella *mediation analysis* a causa di una frequenza molto bassa nella nostra popolazione di studio. Infine il disegno cross-sectional dello studio non consente di valutare se l'effetto dannoso di IUGR sulla funzione polmonare è mantenuto nel tempo. Le conclusioni dello studio saranno esposte insieme a quelle del secondo studio, nella parte finale.

Studio 2: gli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità respiratoria in età scolare

MBW: confronto con la letteratura e interpretazione dei risultati

Sono poco numerosi gli studi che hanno valutato il MBW nella popolazione dei prematuri estremi in età scolare. Come nel nostro studio, Lum et al. hanno riportato differenze significative nel LCI medio da SF₆ MBW tra prematuri estremi nati a <26 settimane EG e controlli a termine valutati a 11 anni.[19] Un'altra similitudine è che anche in quello studio non c'erano differenze significative nell'inomogeneità della ventilazione generale (LCI) tra prematuri con o senza BPD (tabella 10). Nella coorte *Epicure*, LCI identificava il 58% di pretermine estremi con almeno un test respiratorio patologico e la spirometria il 63%.[19]

Nel nostro studio, LCI era più frequentemente patologico del FEV₁ z-score nei pretermine estremi (47% vs 31%) ma la differenza non era significativa. Inoltre, LCI non differenziava tra prematuri con o senza BPD. Alla luce di questi risultati, possiamo anche noi concludere come Lum et al che, sebbene il gas mixing polmonare è frequentemente alterato nei prematuri estremi, l'utilizzo di LCI nel follow-up respiratorio di questi soggetti non sembra aggiungere informazioni in più rispetto al FEV₁.

Yammine et al hanno valutato LCI e indici dello slope di fase III (Scond e Sacin) in una coorte di pretermine, comprendente un sottogruppo di pretermine estremi (n. 38), e in controlli a termine (n. 46).[75] A differenza del presente studio, LCI non distingueva tra prematuri e controlli. Tuttavia, per quanto riguarda i risultati di Scond e Sacin, ci sono numerosi punti in comune con i nostri *findings*. Anzitutto la media dei valori di questi indici nel sottogruppo di pretermine estremi di Yammine et al è simile alla nostra, specialmente per Scond (Scond: 0.033 vs 0.031; Sacin: 0.070 vs 0.059). Questo è un primo dato incoraggiante, considerando che l'analisi dello slope di fase III è una tecnica in parte ancora in evoluzione e non propriamente validata in studi in vivo.[28] La buona riproducibilità dei risultati tra i due centri lascia ben sperare sulle possibilità di incrementare l'uso di questa tecnica in futuro e di migliorarne la standardizzazione, in particolare per ciò che riguarda il controllo di qualità *respiro per respiro* che, sebbene basato sui criteri indicati dalla Consensus ERS,[35] può presentare un certo grado di variabilità operatore-dipendente. Nello studio di Yammine et al, Scond è risultato >95° pc della popolazione dei controlli in oltre il 50% dei pretermine, mentre nel presente studio poco meno del 30% dei pretermine estremi avevano Scond anormale. In entrambi gli studi, comunque, la frequenza di Scond anormale era più del doppio di quella di FEV₁ z-

score $<5^\circ$ pc della popolazione di riferimento e Scond non presentava differenze significative tra soggetti con e senza BPD (sebbene nel nostro studio i valori medi fossero più alti nei primi). Questi dati sembrano indicare che l'inomogeneità delle ventilazione originante dalle vie aeree di conduzione di piccolo calibro (gradi di ramificazione nell'albero bronchiale 8° - 16° , per i quali la spirometria è poco sensibile) è un fenomeno frequente nei prematuri estremi e riflette verosimilmente alterazioni a questo livello che non riguardarono solo i soggetti con BPD. Tali rilievi sono coerenti con i dati degli studi di imaging polmonare, attraverso TAC toracica, che mostrano un'alta frequenza di aree di ipoattenuazione in inspirio nei pretermine estremi (in particolare nei soggetti con BPD), indicanti zone di ipoperfusione e/o ipoventilazione.[121] Mentre il deficit di vascolarizzazione non inficia l'inomogeneità della ventilazione, la presenza di aree di disventilazione, che nei prematuri estremi possono dipendere dalla combinazione di alterazioni strutturali e di anomalie della meccanica polmonare,[210,211] può esitare in un aumento della *convection-dependent inhomogeneity* (CDI) delle vie aeree conduttive di piccolo calibro che incide sul valore di Scond. Un altro fattore che potrebbe contribuire all'aumento del CDI nei pretermine estremi, è la crescita postnatale disnaptica del polmone (sviluppo postnatale sproporzionato del parenchima rispetto alle vie aeree, avendo il primo maggior margine di *catch-up*), che è uno dei meccanismi che si ritiene sia alla base della limitazione di flusso, con conseguente pattern ostruttivo alla spirometria, tipici dei prematuri con BPD.[77,212] La disinapsi tra parenchima e vie aeree conduttive potrebbe contribuire infatti ad aumentare le differenze nella distribuzione della ventilazione tra le unità polmonari che condividono i *branching point* nell'albero bronchiale.[30]

Nel modello di regressione lineare multipla per Scond nei pretermine estremi, la presenza di asma corrente è risultata significativamente associata ad un aumento di 0.019 punti di Scond ($P = 0.04$), corrispondente quasi al 100% del valore medio dei controlli (0.021). Questo effetto non era influenzato dalla BPD (solo uno dei quattro soggetti con asma corrente aveva BPD) ed è coerente con i dati della letteratura che indicano che gli asmatici hanno frequentemente un pattern con LCI lievemente mosso e Scond nettamente aumentato,[53–55] a causa dell'infiammazione e remodelling delle vie aeree conduttive. Anche l'età crescente aveva un'associazione significativa negativa con Scond, segno di un miglioramento con la crescita del CDI originante dalle vie aeree di conduzione. Tuttavia l'entità dell'associazione (diminuzione di Scond di 0.004 pre ogni anno di età crescente tra 8 e 14 anni) era così limitata, che probabilmente la sua rilevanza sul piano clinico è scarsa o nulla. La BPD invece, non è risultata associata con Scond. Questo risultato riflette il fatto che, nonostante i pretermine estremi con BPD e valori più bassi di FEV_1 tendessero ad avere valori patologici di Scond (figura 12), c'era una porzione di soggetti con BPD e valori di FEV_1 z-score compresi tra 0 e -1, che avevano valori normali di Scond (figura 12).

Per quanto riguarda l'indice Sacin, nello studio di Yammine et al[75], come nel nostro, non c'erano differenze significative tra pretermine e controlli (tabella 10) e, nel presente studio, neanche tra pretermine estremi con o senza BPD. Questo dato potrebbe indicare un *catch-up* post neonatale dello sviluppo della regione intracinare e degli alveoli che sarebbe coerente con le evidenze degli studi di RMN toracica elio-3 su adolescenti pretermine.[74] D'altro lato, come già dimostrato in altri studi,[11,145,148] il nostro gruppo di pretermine estremi mostrava una capacità diffusiva del polmone significativamente peggiore rispetto ai controlli a termine, con i risultati più bassi nei soggetti con BPD

(tabella 10). Possiamo solo speculare sulla spiegazione alla base di questi rilievi. Anzitutto bisogna considerare che un alterato TLco può dipendere anche da un inadeguato sviluppo del letto microvascolare del parenchima polmonare,[148] e dati recenti hanno mostrato differenze significative di Vc (volume capillare) tra prematuri estremi e controlli.[141] E' possibile quindi che, ai fini dei risultati del TLCO nei prematuri estremi, l'effetto negativo dell'alterata microvascolarizzazione polmonare sia preponderante rispetto a quello positivo del *catch-up* alveolare. D'altro canto, se da un lato è vero che il processo di alveolarizzazione continua nella vita post-natale, è anche verosimile che le alterazioni della matrice extracellulare legate alla prematurità estrema e alla BPD, che determinano alterazioni dello sviluppo degli alveoli e della struttura della membrana alveolo-capillare, [90,91] abbiano effetti persistenti sull'efficienza del funzionamento della membrana alveolo-capillare in questi soggetti. Questo potrebbe giustificare un'alterata diffusività di membrana (Dm) nei pretermine estremi, come riportato in alcuni studi,[62,140] anche in presenza di *catch-up* alveolare post-neonatale, e sarebbe coerente con i nostri rilievi di un alterazione del TLco pur in presenza di Sacin normale, così come con la scarsa coerenza tra i due indici nel nostro studio (figura 13).

Come già accennato, allo stato attuale un problema legato all'utilizzo degli indici dello slope di fase III è quello della riproducibilità tra centri diversi. Inoltre questi indici, specialmente Scond, presentano un coefficiente di ripetibilità piuttosto alto,[206] che fa sì che differenze tra soggetti o variazione dei risultati nel tempo nello stesso soggetto di entità piuttosto limitata, potrebbe dipendere da motivi tecnici o fisiologici piuttosto che cambiamenti fisiopatologici. E, infine, c'è il problema di una potenziale variabilità operatore-dipendente nel controllo di qualità *respiro per respiro* necessario per il calcolo di

Scond e Sacin. Tutti questi motivi potrebbero aver contribuito alle differenze riportate da *Sorensen et al*, negli outcomes degli indici dello slope di fase III rispetto al nostro studio e a quello di Yammine et al.[75,140] Tale gruppo danese ha trovato valori significativamente più alti di LCI e Sacin in una coorte di pretermine estremi in età scolare rispetto a un gruppo di controlli a termine.[140] Tuttavia i valori di Sacin nel gruppo BPD e non BPD erano, mediamente, circa il doppio che nel presente studio e in quello di *Yammine et al*.[75,140] I valori di Scond riportati da *Sorensen et al* invece erano simili ai nostri e a quelli di Yammine et al. Al di là di differenze dovute a motivi tecnici nell'effettuazione del test, risulta difficile giustificare l'enorme *gap* nei valori di Sacin dei pretermine estremi tra lo studio di *Sorensen* e gli altri studi disponibili, compreso il nostro: non c'è motivo infatti per cui i prematuri estremi danesi dovrebbero avere una *diffusion-convection ventilation inhomogeneity* (DCDI) molto maggiore di quelli svizzeri o italiani, tanto più che le differenze sono consistenti anche tra i controlli a termine dei diversi studi. L'indice Sacin, in particolare, dipendendo solo dall'analisi dello slope del primo respiro, è fortemente influenzato dal controllo di qualità post-analisi secondo i criteri ERS, [35] poiché l'inclusione di un primo respiro del washout che non soddisfi i criteri di qualità, influenzerà fortemente il valore di Sacin. Appare quindi evidente la necessità di una maggiore standardizzazione nel calcolo degli indici di fase III, specialmente per Sacin, prima che si possa pensare di estenderne l'uso nel campo clinico.

Spirometria e TLCO: confronto con la letteratura e interpretazione dei risultati

Un confronto accurato dei nostri findings spirometrici è possibile solo con studi che abbiano utilizzato i valori teorici del GLI-2012 come il presente studio.[200]

L'impatto della prematurità estrema sulla spirometria nel nostro studio riguardava essenzialmente i bambini con BPD, mentre quelli senza storia di BPD avevano z-scores spirometrici prossimi alla media della popolazione generale. Questo dato è coerente con quanto evidenziato in altre coorti recenti di pretermine estremi[147] e rappresenta una novità positiva e incoraggiante rispetto a studi precedenti relativi a coorti più vecchie, che avevano riportato valori subnormali anche nei pretermine estremi senza BPD.[80,144–146] Tali cambiamenti nell'epidemiologia del danno respiratorio a lungo termine legato alla prematurità riflettono verosimilmente i miglioramenti che si sono avuti nella qualità dell'assistenza respiratoria neonatale nell'epoca del surfattante esogeno, con la diffusione di strategie di supporto ventilatorio che mirano a limitare l'invasività e il barotrauma.[213]

I risultati spirometrici nei prematuri estremi con BPD del nostro studio sono stati invece molto meno incoraggianti. Questi soggetti mostravano valori mediamente bassi di FEV₁, ma anche di FVC z-score, con tendenza a un pattern ostruttivo lieve (FEV₁/FVC z-score medio -0.41 ± 0.92). Le differenze rispetto ai pretermine estremi senza BPD erano di circa -1 z-score di FEV₁ e FVC (circa 10% del teorico). Nonostante l'avanzamento dell'assistenza respiratoria perinatale, il valore medio di FEV₁ z-scores dei nostri pretermine estremi con BPD in età scolare (-1.18 ± 0.85 z-scores, ovvero $86\% \pm 10\%$ del teorico GLI-2012) e, soprattutto, la differenza di FEV₁ z-score con i controlli a termine (circa 1.5 z-scores oltre il 15% del teorico), non sono migliori di quelli riportati in coorti di soggetti con BPD in età scolare nati fino a 20 anni prima (ma sempre dell'era del surfactante).[12,144]. Anche altre coorti di pretermine estremi con BPD in età scolare nati dopo il 2000, come quelli del presente studio, hanno riportato differenze medie di FEV₁ di -1.3 – 1.5 z-scores rispetto ai controlli a termine.[140,147] Questi dati indicano che,

nonostante il miglioramento dell'assistenza respiratoria perinatale, come l'incidenza di BPD non è diminuita negli ultimi 20 anni[214] a causa della sopravvivenza di neonati sempre più prematuri e complicati, probabilmente per lo stesso motivo anche gli *outcomes* respiratori a lungo termine dei soggetti con BPD non stanno migliorando nel tempo. Tale dato appare particolarmente preoccupante perché, da un lato ci sono evidenze crescenti del *tracking* fino all'età adulta di un basso FEV₁ nei prematuri in età scolare,[7,18,215] dall'altro è ormai acclarato che un basso picco di FEV₁ in età adulta aumenta il rischio di BPCO precoce [21] e mortalità per cause cardio-respiratorie.[23] Una certa porzione dei pretermine estremi con BPD già nella quarta o quinta decade di vita (in alcuni casi anche prima) potrebbe andare in contro a limitazioni della vita quotidiana a causa della scarsa riserva respiratoria, con scarsissime prospettive di miglioramento attraverso la terapia medica.[76] Inoltre l'assenza di strategie di prevenzione di comprovata efficacia per migliorare la traiettoria di sviluppo della funzionalità polmonare dei prematuri con BPD, pone anche un problema di gestione clinica per quanto riguarda il follow-up respiratorio. Infatti, è molto frustrante non solo per la famiglia, ma anche per il medico che ha in cura il soggetto, assistere all'evoluzione nel tempo di una scarsa traiettoria di funzionalità respiratoria, rispetto alla quale non si può offrire di meglio che generiche raccomandazioni sull'importanza di stili di vita corretti per preservare la già scarsa funzionalità polmonare.

[216]

Un dato interessante del nostro studio è che nei prematuri estremi con BPD, è emersa una buona coerenza tra i risultati del FEV₁ e di Scond, dimostrata da un lato da una correlazione moderata negativa e, dall'altro, dal fatto che quasi tutti i BPD con valori patologici di FEV₁ (5/6) avevano anche Scond patologico. Il remodelling delle vie aeree di

conduzione e la crescita disnaptica del polmone potrebbero essere i comuni denominatori che determinano una certa coerenza nei risultati di questi due indici. Inoltre, per quanto Scond sia particolarmente influenzato dalla CDI originante dalle vie aeree conduttive di piccolo calibro (ramificazioni 8°-16°) che, in proporzione, hanno una superficie molto maggiore delle vie aeree di calibro maggiore, anche la CDI originante a questo livello avrà un effetto su Scond.[217]

Per quanto riguarda la capacità diffusiva del polmone nei pretermine estremi, i nostri dati mostrano che questa è più colpita in quelli con BPD (valore medio -0.95 ± 0.79 z-scores) che senza (-0.28 ± 0.76). Le differenze di TLco tra prematuri estremi e controlli a termine sono coerenti con quanto evidenziato da studi precedenti che hanno mostrato un deficit di diffusività del 7-10% nei primi rispetto ai secondi.[11,145,148] Come accennato nella parte di discussione su Sacin, è verosimile che tali deficit siano il frutto congiunto dell'alterato sviluppo capillare polmonare che comporta una diminuzione del Vc (Volume capillare) [141] e dell'alterazione della matrice extracellulare che può contribuire ad un'alterazione della parete alveolare, risultando in un alterata capacità diffusiva della membrana alveolo-capillare.[140] Anche la una diminuzione della superficie alveolare complessiva potrebbe contribuire a questo risultato, tuttavia, essa dovrebbe essere parzialmente compensata dal *catch-up* post neonatale, stando ai dati di He-3 RMN toracica e Sacin.[74,75]

Punti di forza e debolezze dello studio sui pretermine estremi

Un punto di forza di questo studio è che ha eseguito un *assessment* della funzionalità delle vie aeree distali e più prossimali dei pretermine estremi, basato sull'integrazione d'informazioni derivanti da diversi test, tra cui gli indici dello slope di fase III, che sono stati finora poco esplorati in questo gruppo.

Tra le limitazioni, come per lo studio su IUGR, il *burden* di danno respiratorio cronico nei prematuri estremi potrebbe essere sottostimato perché solo coloro che non avevano esiti cognitivi o comportamentali (e.g. deficit concentrazione) sono stati in grado di eseguire i test respiratori.

L'interpretazione dei risultati del MBW presenta alcune limitazione importanti, primo fra tutte il fatto che, in assenza di valori teorici pubblicati, i limiti di normalità sono stati stabiliti sulla base della nostra popolazione di controllo, piuttosto limitata e priva di una distribuzione gaussiana. Quest'approccio è stato scelto sulla base di quanto fatto in autorevoli studi precedenti sul MBW.[36,75] L'interpretazione in chiave clinica di risultati patologici degli indici del MBW non è possibile in assenza di dati prospettici che diano un'indicazione su eventuali differenze nell'evoluzione del danno respiratorio e nella prognosi a lungo termine dei prematuri estremi con o senza valori patologici al MBW. Questi dati, a dire il vero, non sono disponibili neanche per la spirometria nei pretermine. Tuttavia, per il FEV₁ è possibile applicare ai pretermine le osservazioni provenienti dalla popolazione generale sulla relazione tra basso picco di FEV₁ in età giovane adulta e comorbidità cardiorespiratoria futura.

Le differenze riscontrate tra gruppi nel valore medio di Scond erano inferiori al coefficiente di ripetibilità calcolato in fase di validazione del MBW. Questo non ci permette di escludere con certezza che almeno una parte di tali differenze dipendessero da ragioni tecniche o fisiologiche piuttosto che da variazioni nel grado di CDI e di danno respiratorio. Inoltre, dal confronto con i dati di letteratura, è emerso come i nostri risultati non fossero comparabili con uno dei due studi che hanno valutato Sacin nei pretermine.[75,140] Questo pone

il ??? della maggiore standardizzazione che dovrà essere conseguita per gli indici dello slope di fase III, prima che l'uso di tali indici possa essere esteso all'ambito clinico.

Conclusioni

In conclusione lo studio sugli effetti della restrizione di crescita fetale sulla funzionalità polmonare in età scolare ha mostrato che lo IUGR ha un impatto sulla funzione delle vie aeree di calibro maggiore e dovrebbe essere considerato come un fattore di rischio aggiuntivo alla grande prematurità e alla BPD, per esiti respiratori a lungo termine. Invece, indici di funzionalità di regioni più periferiche del polmone, quali LCI e TLco, non hanno mostrato differenze nei grandi pretermine in base al pattern di crescita fetale.

Lo studio sugli effetti della prematurità estrema sulla funzionalità respiratoria in età scolare ha mostrato che, mentre i soggetti senza BPD hanno una normalizzazione degli indici spirometrici, quelli con BPD hanno una riduzione media di FEV₁ di circa il 10% del teorico rispetto ai propri omologhi senza BPD, e del 15% del teorico rispetto ai controlli a termine. Tra tutti quelli valutati, Scond era l'indice più frequentemente patologico nei pretermine estremi, riflettendo verosimilmente la presenza di danno cronico delle piccole vie aeree o crescita disnaptica del polmone, che non riguardava solo i soggetti con BPD.

L'indice Sacin non presentava differenze significative tra pretermine estremi e controlli, indicando probabilmente un catch-up dell'alveolarizzazione in questi soggetti. Tuttavia persisteva un deficit di diffusività polmonare nei pretermine estremi con BPD che, verosimilmente, dipende da alterazioni persistenti della membrana alveolo-capillare e dal deficit di sviluppo della rete capillare più che da una diminuzione della massa alveolare. Tra gli indici del MBW, posto che LCI non appare di particolare utilità nel follow-up dei pretermine estremi, gli studi futuri dovrebbero anzitutto cercare di migliorare la

standardizzazione e la ripetibilità inter-centro degli indici di fase III Scond e Sacin, per poi valutare prospetticamente se le frequenti alterazioni di Scond riscontrate in questa popolazione, abbiano un correlato clinico a lungo termine.

REFERENZE

- 1 Stocks J, Hislop A, Sonnappa S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. *Lancet Respir Med* 2013;**1**:728–42. doi:10.1016/S2213-2600(13)70118-8
- 2 Bush A. Lung Development and Aging. *Ann Am Thorac Soc* 2016;**13**:S438–46. doi:10.1513/AnnalsATS.201602-112AW
- 3 Gien J, Kinsella JP. Pathogenesis and Treatment of Bronchopulmonary Dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 2011;**23**:305–13. doi:10.1097/MOP.0b013e328346577f
- 4 Simpson SJ, Logie KM, O’Dea CA, *et al.* Altered lung structure and function in mid-childhood survivors of very preterm birth. *Thorax* 2017;**72**:702–11. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208985
- 5 Cazzato S, Ridolfi L, Bernardi F, *et al.* Lung function outcome at school age in very low birth weight children. *Pediatr Pulmonol* 2013;**48**:830–7. doi:10.1002/ppul.22676
- 6 Vom Hove M, Prenzel F, Uhlig HH, *et al.* Pulmonary outcome in former preterm, very low birth weight children with bronchopulmonary dysplasia: a case-control follow-up at school age. *J Pediatr* 2014;**164**:40-45.e4. doi:10.1016/j.jpeds.2013.07.045
- 7 Doyle LW, Andersson S, Bush A, *et al.* Expiratory airflow in late adolescence and early adulthood in individuals born very preterm or with very low birthweight compared with controls born at term or with normal birthweight: a meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med* 2019;**7**:677–86. doi:10.1016/S2213-2600(18)30530-7
- 8 Gibson A-M, Reddington C, McBride L, *et al.* Lung function in adult survivors of very low birth weight, with and without bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2015;**50**:987–94. doi:10.1002/ppul.23093
- 9 McEvoy CT, Jain L, Schmidt B, *et al.* Bronchopulmonary Dysplasia: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. *Ann Am Thorac Soc* 2014;**11**:S146–53. doi:10.1513/AnnalsATS.201312-424LD
- 10 Fawke J, Lum S, Kirkby J, *et al.* Lung Function and Respiratory Symptoms at 11 Years in Children Born Extremely Preterm. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**182**:237–45. doi:10.1164/rccm.200912-1806OC
- 11 Satrell E, Røksund O, Thorsen E, *et al.* Pulmonary gas transfer in children and adolescents born extremely preterm. *Eur Respir J* 2013;**42**:1536–44. doi:10.1183/09031936.00027112
- 12 Doyle LW, Adams A-M, Robertson C, *et al.* Increasing airway obstruction from 8 to 18 years in extremely preterm/low-birthweight survivors born in the surfactant era. *Thorax* 2017;**72**:712–9. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208524

- 13 Harding R, De Matteo R. Chapter 19 - The Influence of Nutrition on Lung Development before and after Birth. In: *The Lung (Second Edition)*. Boston: : Academic Press 2014. 349–68. doi:10.1016/B978-0-12-799941-8.00019-5
- 14 Arigliani M, Spinelli A, Liguoro I, *et al.* Nutrition and Lung Growth. *Nutrients* 2018;**10**:919. doi:10.3390/nu10070919
- 15 den Dekker HT, Sonnenschein-van der Voort AMM, de Jongste JC, *et al.* Early growth characteristics and the risk of reduced lung function and asthma: A meta-analysis of 25,000 children. *J Allergy Clin Immunol* 2016;**137**:1026–35. doi:10.1016/j.jaci.2015.08.050
- 16 Kotecha SJ, Watkins WJ, Heron J, *et al.* Spirometric lung function in school-age children: effect of intrauterine growth retardation and catch-up growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**181**:969–74. doi:10.1164/rccm.200906-0897OC
- 17 Simpson SJ, Turkovic L, Wilson AC, *et al.* Lung function trajectories throughout childhood in survivors of very preterm birth: a longitudinal cohort study. *Lancet Child Adolesc Health* 2018;**2**:350–9. doi:10.1016/S2352-4642(18)30064-6
- 18 Vollsæter M, Røksund OD, Eide GE, *et al.* Lung function after preterm birth: development from mid-childhood to adulthood. *Thorax* 2013;**68**:767–76. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202980
- 19 Lum S, Kirkby J, Welsh L, *et al.* Nature and severity of lung function abnormalities in extremely pre-term children at 11 years of age. *Eur Respir J* 2011;**37**:1199–207. doi:10.1183/09031936.00071110
- 20 Lange P, Celli B, Agustí A, *et al.* Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2015;**373**:111–22. doi:10.1056/NEJMoa1411532
- 21 Bui DS, Lodge CJ, Burgess JA, *et al.* Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life. *Lancet Respir Med* 2018;**6**:535–44. doi:10.1016/S2213-2600(18)30100-0
- 22 Agustí A, Noell G, Brugada J, *et al.* Lung function in early adulthood and health in later life: a transgenerational cohort analysis. *Lancet Respir Med* 2017;**5**:935–45. doi:10.1016/S2213-2600(17)30434-4
- 23 Vasquez MM, Zhou M, Hu C, *et al.* Low Lung Function in Young Adult Life Is Associated with Early Mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**195**:1399–401. doi:10.1164/rccm.201608-1561LE
- 24 Hyatt RE, Schilder DP, Fry DL. Relationship between maximum expiratory flow and degree of lung inflation. *J Appl Physiol* 1958;**13**:331–6. doi:10.1152/jappl.1958.13.3.331
- 25 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al.* Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;**26**:319–38. doi:10.1183/09031936.05.00034805
- 26 Kirkby J, Welsh L, Lum S, *et al.* The EPICure study: Comparison of pediatric spirometry in community and laboratory settings. *Pediatr Pulmonol* 2008;**43**:1233–41. doi:10.1002/ppul.20950
- 27 Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 1963;**12**:131–55.

- 28 Robinson PD, Goldman MD, Gustafsson PM. Inert gas washout: theoretical background and clinical utility in respiratory disease. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2009;**78**:339–55. doi:10.1159/000225373
- 29 Macklem PT, Mead J. Resistance of central and peripheral airways measured by a retrograde catheter. *J Appl Physiol* 1967;**22**:395–401. doi:10.1152/jappl.1967.22.3.395
- 30 Verbanck S, Paiva M. Gas mixing in the airways and airspaces. *Compr Physiol* 2011;**1**:809–34. doi:10.1002/cphy.c100018
- 31 Robinson PD PL. Multiple-breath washout. *Eur Respir Monogr* 2010;**47**:87–104. doi:10.1183/1025448x.00011909
- 32 Verbanck S, Paiva M, Schuermans D, *et al.* Relationships between the lung clearance index and conductive and acinar ventilation heterogeneity. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2012;**112**:782–90. doi:10.1152/jappphysiol.01221.2011
- 33 Aurora P. Multiple-breath washout in preschool children--FRC and ventilation inhomogeneity. *Paediatr Respir Rev* 2006;**7 Suppl 1**:S14-16. doi:10.1016/j.prrv.2006.04.019
- 34 Beydon N, Davis SD, Lombardi E, *et al.* An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**175**:1304–45. doi:10.1164/rccm.200605-642ST
- 35 Robinson PD, Latzin P, Verbanck S, *et al.* Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single- breath tests. *Eur Respir J* 2013;**41**:507–22. doi:10.1183/09031936.00069712
- 36 Aurora P, Bush A, Gustafsson P, *et al.* Multiple-Breath Washout as a Marker of Lung Disease in Preschool Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**:249–56. doi:10.1164/rccm.200407-8950C
- 37 Aurora P, Gustafsson P, Bush A, *et al.* Multiple breath inert gas washout as a measure of ventilation distribution in children with cystic fibrosis. *Thorax* 2004;**59**:1068–73. doi:10.1136/thx.2004.022590
- 38 Gustafsson PM, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003;**22**:972–9.
- 39 Horsley AR, Gustafsson PM, Macleod KA, *et al.* Lung clearance index is a sensitive, repeatable and practical measure of airways disease in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 2008;**63**:135–40. doi:10.1136/thx.2007.082628
- 40 Aurora P, Stanojevic S, Wade A, *et al.* Lung clearance index at 4 years predicts subsequent lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:752–8. doi:10.1164/rccm.200911-1646OC
- 41 Kraemer R, Blum A, Schibler A, *et al.* Ventilation Inhomogeneities in Relation to Standard Lung Function in Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**:371–8. doi:10.1164/rccm.200407-948OC
- 42 Nyilas S, Bauman G, Sommer G, *et al.* Novel magnetic resonance technique for functional imaging of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2017;**50**:1701464. doi:10.1183/13993003.01464-2017

- 43 Stahl M, Wielpütz MO, Graeber SY, *et al.* Comparison of Lung Clearance Index and Magnetic Resonance Imaging for Assessment of Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;**195**:349–59. doi:10.1164/rccm.201604-0893OC
- 44 Davies J, Sheridan H, Bell N, *et al.* Assessment of clinical response to ivacaftor with lung clearance index in cystic fibrosis patients with a G551D-CFTR mutation and preserved spirometry: a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2013;**1**:630–8. doi:10.1016/S2213-2600(13)70182-6
- 45 Crawford AB, Makowska M, Paiva M, *et al.* Convection- and diffusion-dependent ventilation maldistribution in normal subjects. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 **59**:838–46.
- 46 Verbanck S, Schuermans D, Van Muylem A, *et al.* Ventilation distribution during histamine provocation. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 **1997**;**83**:1907–16.
- 47 Gustafsson PM, De Jong PA, Tiddens H a. WM, *et al.* Multiple-breath inert gas washout and spirometry versus structural lung disease in cystic fibrosis. *Thorax* 2008;**63**:129–34. doi:10.1136/thx.2007.077784
- 48 Horsley AR, Macleod KA, Robson AG, *et al.* Effects of cystic fibrosis lung disease on gas mixing indices derived from alveolar slope analysis. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;**162**:197–203. doi:10.1016/j.resp.2008.06.014
- 49 Theilmann RJ, Darquenne C, Elliott AR, *et al.* Characterizing Lung Disease in Cystic Fibrosis with Magnetic Resonance Imaging and Airway Physiology. *PloS One* 2016;**11**:e0157177. doi:10.1371/journal.pone.0157177
- 50 Smith LJ, Collier GJ, Marshall H, *et al.* Patterns of regional lung physiology in cystic fibrosis using ventilation magnetic resonance imaging and multiple-breath washout. *Eur Respir J* 2018;**52**. doi:10.1183/13993003.00821-2018
- 51 Verbanck S, Paiva M, Schuermans D, *et al.* Acinar and conductive ventilation heterogeneity in severe CF lung disease: back to the model. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;**188**:124–32. doi:10.1016/j.resp.2013.05.011
- 52 Sonnappa S, Bastardo CM, Wade A, *et al.* Symptom-pattern phenotype and pulmonary function in preschool wheezers. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:519-526.e1-7. doi:10.1016/j.jaci.2010.04.018
- 53 Macleod KA, Horsley AR, Bell NJ, *et al.* Ventilation heterogeneity in children with well controlled asthma with normal spirometry indicates residual airways disease. *Thorax* 2009;**64**:33–7. doi:10.1136/thx.2007.095018
- 54 Keen C, Olin A-C, Wennergren G, *et al.* Small airway function, exhaled NO and airway hyper-responsiveness in paediatric asthma. *Respir Med* 2011;**105**:1476–84. doi:10.1016/j.rmed.2011.04.004
- 55 Gustafsson PM. Peripheral airway involvement in CF and asthma compared by inert gas washout. *Pediatr Pulmonol* 2007;**42**:168–76. doi:10.1002/ppul.20554
- 56 Verbanck S, Schuermans D, Noppen M, *et al.* Evidence of Acinar Airway Involvement in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**159**:1545–50. doi:10.1164/ajrccm.159.5.9809017

- 57 Thompson BR, Douglass JA, Ellis MJ, *et al.* Peripheral lung function in patients with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1322–8. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.054
- 58 Graham BL, Brusasco V, Burgos F, *et al.* 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2017;**49**. doi:10.1183/13993003.00016-2016
- 59 Johnson DC. Importance of adjusting carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and carbon monoxide transfer coefficient (KCO) for alveolar volume. *Respir Med* 2000;**94**:28–37. doi:10.1053/rmed.1999.0740
- 60 Stanojevic S, Graham BL, Cooper BG, *et al.* Official ERS technical standards: Global Lung Function Initiative reference values for the carbon monoxide transfer factor for Caucasians. *Eur Respir J* 2017;**50**:1700010. doi:10.1183/13993003.00010-2017
- 61 Roughton FJW, Forster RE. Relative Importance of Diffusion and Chemical Reaction Rates in Determining Rate of Exchange of Gases in the Human Lung, With Special Reference to True Diffusing Capacity of Pulmonary Membrane and Volume of Blood in the Lung Capillaries. *J Appl Physiol* 1957;**11**:290–302. doi:10.1152/jappl.1957.11.2.290
- 62 Chang DV, Assaf SJ, Tiller CJ, *et al.* Membrane and Capillary Components of Lung Diffusion in Infants with Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;**193**:767–71. doi:10.1164/rccm.201506-1219OC
- 63 Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;**82**:F69-74.
- 64 Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res* 2017;**367**:427–44. doi:10.1007/s00441-016-2545-0
- 65 Silva DMG, Nardiello C, Pozarska A, *et al.* Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2015;**309**:L1239–72. doi:10.1152/ajplung.00268.2015
- 66 Stocks J, Hislop A, Sonnappa S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. *Lancet Respir Med* 2013;**1**:728–42. doi:10.1016/S2213-2600(13)70118-8
- 67 Narayanan M, Owers-Bradley J, Beardsmore CS, *et al.* Alveolarization continues during childhood and adolescence: new evidence from helium-3 magnetic resonance. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**185**:186–91. doi:10.1164/rccm.201107-1348OC
- 68 Quanjer PH. Lung function, race and ethnicity: a conundrum. *Eur Respir J* 2013;**41**:1249–51. doi:10.1183/09031936.00053913
- 69 Leslie FM. Multigenerational epigenetic effects of nicotine on lung function. *BMC Med* 2013;**11**:27. doi:10.1186/1741-7015-11-27
- 70 Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic Control of Gene Expression in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:1295–301. doi:10.1164/rccm.201010-1579PP
- 71 Gibbs K, Collaco JM, McGrath-Morrow SA. Impact of Tobacco Smoke and Nicotine Exposure on Lung Development. *Chest* 2016;**149**:552–61. doi:10.1378/chest.15-1858

- 72 Joss-Moore LA, Albertine KH, Lane RH. Epigenetics and the developmental origins of lung disease. *Mol Genet Metab* 2011;**104**:61–6. doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.018
- 73 Joss-Moore L, Carroll T, Yang Y, *et al.* Intrauterine growth restriction transiently delays alveolar formation and disrupts retinoic acid receptor expression in the lung of female rat pups. *Pediatr Res* 2013;**73**:612–20. doi:10.1038/pr.2013.38
- 74 Narayanan M, Beardsmore CS, Owers-Bradley J, *et al.* Catch-up Alveolarization in Ex-Preterm Children. Evidence from ³He Magnetic Resonance. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;**187**:1104–9. doi:10.1164/rccm.201210-18500C
- 75 Yammine S, Schmidt A, Sutter O, *et al.* Functional evidence for continued alveolarisation in former preterms at school age? *Eur Respir J* 2016;**47**:147–55. doi:10.1183/13993003.00478-2015
- 76 Bolton CE, Bush A, Hurst JR, *et al.* Lung consequences in adults born prematurely. *Thorax* 2015;**70**:574–80. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206590
- 77 Jones M. Effect of preterm birth on airway function and lung growth. *Paediatr Respir Rev* 2009;**10 Suppl 1**:9–11. doi:10.1016/S1526-0542(09)70005-3
- 78 Baraldi E, Filippone M. Chronic Lung Disease after Premature Birth. *N Engl J Med* 2007;**357**:1946–55. doi:10.1056/NEJMra067279
- 79 Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**163**:1723–9. doi:10.1164/ajrccm.163.7.2011060
- 80 Fortuna M, Carraro S, Temporin E, *et al.* Mid-childhood lung function in a cohort of children with “new bronchopulmonary dysplasia.” *Pediatr Pulmonol* Published Online First: 13 April 2016. doi:10.1002/ppul.23422
- 81 Walsh MC, Wilson-Costello D, Zadell A, *et al.* Safety, reliability, and validity of a physiologic definition of bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2003;**23**:451–6. doi:10.1038/sj.jp.7210963
- 82 Niedermaier S, Hilgendorff A. Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts. *Mol Cell Pediatr* 2015;**2**. doi:10.1186/s40348-015-0013-7
- 83 Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003;**8**:73–81. doi:10.1016/S1084-2756(02)00193-8
- 84 Merritt TA, Deming DD, Boynton BR. The ‘new’ bronchopulmonary dysplasia: challenges and commentary. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;**14**:345–57. doi:10.1016/j.siny.2009.08.009
- 85 De Paepe ME, Mao Q, Powell J, *et al.* Growth of pulmonary microvasculature in ventilated preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;**173**:204–11. doi:10.1164/rccm.200506-9270C
- 86 Khemani E, McElhinney DB, Rhein L, *et al.* Pulmonary artery hypertension in formerly premature infants with bronchopulmonary dysplasia: clinical features and outcomes in the surfactant era. *Pediatrics* 2007;**120**:1260–9. doi:10.1542/peds.2007-0971

- 87 Thibeault DW, Truog WE, Ekekezie II. Acinar arterial changes with chronic lung disease of prematurity in the surfactant era. *Pediatr Pulmonol* 2003;**36**:482–9. doi:10.1002/ppul.10349
- 88 Thébaud B, Ladha F, Michelakis ED, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 2005;**112**:2477–86. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541524
- 89 Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, *et al.* Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 2005;**57**:38R-46R. doi:10.1203/01.PDR.0000159630.35883.BE
- 90 Mižíková I, Morty RE. The Extracellular Matrix in Bronchopulmonary Dysplasia: Target and Source. *Front Med* 2015;**2**:91. doi:10.3389/fmed.2015.00091
- 91 Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie II, *et al.* Collagen scaffolding during development and its deformation with chronic lung disease. *Pediatrics* 2003;**111**:766–76. doi:10.1542/peds.111.4.766
- 92 Viscardi RM. Perinatal inflammation and lung injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;**17**:30–5. doi:10.1016/j.siny.2011.08.002
- 93 Keszler M, Sant'Anna G. Mechanical Ventilation and Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin Perinatol* 2015;**42**:781–96. doi:10.1016/j.clp.2015.08.006
- 94 Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, *et al.* Oxygen Toxicity in Premature Infants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;**181**:60–7. doi:10.1006/taap.2002.9387
- 95 Trembath A, Laughon M. Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin Perinatol* 2012;**39**:585–601. doi:10.1016/j.clp.2012.06.014
- 96 Bhandari A, Panitch HB. Pulmonary outcomes in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006;**30**:219–26. doi:10.1053/j.semperi.2006.05.009
- 97 Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;**11**:354–62. doi:10.1016/j.siny.2006.03.004
- 98 Yoder BA, Coalson JJ, Winter VT, *et al.* Effects of antenatal colonization with ureaplasma urealyticum on pulmonary disease in the immature baboon. *Pediatr Res* 2003;**54**:797–807. doi:10.1203/01.PDR.0000091284.84322.16
- 99 Lau J, Magee F, Qiu Z, *et al.* Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**193**:708–13. doi:10.1016/j.ajog.2005.01.017
- 100 Ballard AR, Mallett LH, Pruszynski JE, *et al.* Chorioamnionitis and subsequent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth weight infants: a 25-year cohort. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2016;**36**:1045–8. doi:10.1038/jp.2016.138
- 101 Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 2009;**123**:1314–9. doi:10.1542/peds.2008-0656

- 102 Van Marter LJ, Dammann O, Allred EN, *et al.* Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr* 2002;**140**:171–6. doi:10.1067/mpd.2002.121381
- 103 Young SM, Liu S, Joshi R, *et al.* Localization and stretch-dependence of lung elastase activity in development and compensatory growth. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 2015;**118**:921–31. doi:10.1152/jappphysiol.00954.2014
- 104 Sanchez-Esteban J, Cicchiello LA, Wang Y, *et al.* Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 2001;**91**:589–95. doi:10.1152/jappl.2001.91.2.589
- 105 Quinn TP, Schlueter M, Soifer SJ, *et al.* Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;**282**:L897–903. doi:10.1152/ajplung.00044.2001
- 106 Copland IB, Martinez F, Kavanagh BP, *et al.* High tidal volume ventilation causes different inflammatory responses in newborn versus adult lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**169**:739–48. doi:10.1164/rccm.200310-14170C
- 107 May M, Ströbel P, Preissshofen T, *et al.* Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants. *Eur Respir J* 2004;**23**:113–21. doi:10.1183/09031936.03.00038403
- 108 Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**163**:1176–80. doi:10.1164/ajrccm.163.5.2006053
- 109 Bland RD, Mokres LM, Ertsey R, *et al.* Mechanical ventilation with 40% oxygen reduces pulmonary expression of genes that regulate lung development and impairs alveolar septation in newborn mice. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2007;**293**:L1099–110. doi:10.1152/ajplung.00217.2007
- 110 Mokres LM, Parai K, Hilgendorff A, *et al.* Prolonged mechanical ventilation with air induces apoptosis and causes failure of alveolar septation and angiogenesis in lungs of newborn mice. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2009;**298**:L23–35. doi:10.1152/ajplung.00251.2009
- 111 Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, *et al.* Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**159**:945–58. doi:10.1164/ajrccm.159.3.9804027
- 112 Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, *et al.* Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res* 2002;**52**:387–92. doi:10.1203/00006450-200209000-00014
- 113 Ratner V, Starkov A, Matsiukevich D, *et al.* Mitochondrial dysfunction contributes to alveolar developmental arrest in hyperoxia-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;**40**:511–8. doi:10.1165/rcmb.2008-0341RC
- 114 Balasubramaniam V, Mervis CF, Maxey AM, *et al.* Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**292**:L1073–1084. doi:10.1152/ajplung.00347.2006

- 115 Deng H, Mason SN, Auten RL. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**162**:2316–23. doi:10.1164/ajrccm.162.6.9911020
- 116 Ahmed MN, Suliman HB, Folz RJ, *et al.* Extracellular superoxide dismutase protects lung development in hyperoxia-exposed newborn mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**:400–5. doi:10.1164/rccm.200202-1080C
- 117 Poindexter BB, Martin CR. Impact of Nutrition on Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin Perinatol* 2015;**42**:797–806. doi:10.1016/j.clp.2015.08.007
- 118 Ehrenkranz RA, Dusick AM, Vohr BR, *et al.* Growth in the neonatal intensive care unit influences neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2006;**117**:1253–61. doi:10.1542/peds.2005-1368
- 119 Tour AT la, Spadola L, Sayegh Y, *et al.* Chest CT in bronchopulmonary dysplasia: Clinical and radiological correlations. *Pediatr Pulmonol* 2013;**48**:693–8. doi:10.1002/ppul.22714
- 120 Mahut B, De Blic J, Emond S, *et al.* Chest computed tomography findings in bronchopulmonary dysplasia and correlation with lung function. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;**92**:F459-464. doi:10.1136/adc.2006.111765
- 121 van Mastrigt E, Logie K, Ciet P, *et al.* Lung CT imaging in patients with bronchopulmonary dysplasia: A systematic review. *Pediatr Pulmonol* 2016;**51**:975–86. doi:10.1002/ppul.23446
- 122 Aukland SM, Rosendahl K, Owens CM, *et al.* Neonatal bronchopulmonary dysplasia predicts abnormal pulmonary HRCT scans in long-term survivors of extreme preterm birth. *Thorax* 2009;**64**:405–10. doi:10.1136/thx.2008.103739
- 123 Pramana IA, Latzin P, Schlapbach LJ, *et al.* Respiratory symptoms in preterm infants: burden of disease in the first year of life. *Eur J Med Res* 2011;**16**:223–30. doi:10.1186/2047-783x-16-5-223
- 124 Leps C, Carson C, Quigley MA. Gestational age at birth and wheezing trajectories at 3-11 years. *Arch Dis Child* 2018;**103**:1138–44. doi:10.1136/archdischild-2017-314541
- 125 Um-Bergström P, Hallberg J, Thunqvist P, *et al.* Lung function development after preterm birth in relation to severity of Bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pulm Med* 2017;**17**:97. doi:10.1186/s12890-017-0441-3
- 126 Ronkainen E, Dunder T, Kaukola T, *et al.* Intrauterine growth restriction predicts lower lung function at school age in children born very preterm. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* 2016;**101**:F412–7. doi:10.1136/archdischild-2015-308922
- 127 Saarenpää H-K, Tikanmäki M, Sipola-Leppänen M, *et al.* Lung Function in Very Low Birth Weight Adults. *Pediatrics* 2015;**136**:642–50. doi:10.1542/peds.2014-2651
- 128 Vrijlandt EJLE, 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. doi:10.1164/rccm.200507-11400C
- 129 Latzin P, Roth S, Thamrin C, *et al.* Lung volume, breathing pattern and ventilation inhomogeneity in preterm and term infants. *PloS One* 2009;**4**:e4635. doi:10.1371/journal.pone.0004635

- 130 Ronkainen E, Dunder T, Peltoniemi O, *et al.* New BPD predicts lung function at school age: Follow-up study and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol* 2015;**50**:1090–8. doi:10.1002/ppul.23153
- 131 Hakulinen AL, Järvenpää AL, Turpeinen M, *et al.* Diffusing capacity of the lung in school-aged children born very preterm, with and without bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1996;**21**:353–60. doi:10.1002/(SICI)1099-0496(199606)21:6<353::AID-PPUL2>3.0.CO;2-M
- 132 Narang I, Bush A, Rosenthal M. Gas transfer and pulmonary blood flow at rest and during exercise in adults 21 years after preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;**180**:339–45. doi:10.1164/rccm.200809-1523OC
- 133 Korhonen P, Laitinen J, Hyödynmaa E, *et al.* Respiratory outcome in school-aged, very-low-birth-weight children in the surfactant era. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 2004;**93**:316–21. doi:10.1080/08035250410023593
- 134 MacLean JE, DeHaan K, Fuhr D, *et al.* Altered breathing mechanics and ventilatory response during exercise in children born extremely preterm. *Thorax* 2016;**71**:1012–9. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207736
- 135 Nordlund B, James A, Ebersjö C, *et al.* Differences and similarities between bronchopulmonary dysplasia and asthma in schoolchildren. *Pediatr Pulmonol* 2017;**52**:1179–86. doi:10.1002/ppul.23741
- 136 Balinotti JE, Chakr VC, Tiller C, *et al.* Growth of lung parenchyma in infants and toddlers with chronic lung disease of infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**181**:1093–7. doi:10.1164/rccm.200908-1190OC
- 137 Ahlfeld SK, Gao Y, Conway SJ, *et al.* Relationship of Structural to Functional Impairment during Alveolar-Capillary Membrane Development. *Am J Pathol* 2015;**185**:913–9. doi:10.1016/j.ajpath.2014.12.007
- 138 Chang DV, Assaf SJ, Tiller CJ, *et al.* Membrane and Capillary Components of Lung Diffusion in Infants with Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;**193**:767–71. doi:10.1164/rccm.201506-1219OC
- 139 Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 1998;**29**:710–7. doi:10.1016/s0046-8177(98)90280-5
- 140 Sørensen JK, Buchvald F, Berg AK, *et al.* Ventilation inhomogeneity and NO and CO diffusing capacity in ex-premature school children. *Respir Med* 2018;**140**:94–100. doi:10.1016/j.rmed.2018.06.006
- 141 Drummond D, Hadchouel A, Le Bourgeois M, *et al.* Decreased pulmonary capillary volume in adolescents born very preterm. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 Published Online First: 18 September 2019. doi:10.1111/apa.15023
- 142 Holditch-Davis D, Merrill P, Schwartz T, *et al.* Predictors of Wheezing in Prematurely Born Children. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs JGNN NAACOG* 2008;**37**:262–73. doi:10.1111/j.1552-6909.2008.00238.x

- 143 Islam JY, Keller RL, Aschner JL, *et al.* Understanding the Short- and Long-Term Respiratory Outcomes of Prematurity and Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;**192**:134–56. doi:10.1164/rccm.201412-2142PP
- 144 Fawke J, Lum S, Kirkby J, *et al.* Lung Function and Respiratory Symptoms at 11 Years in Children Born Extremely Preterm. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**182**:237–45. doi:10.1164/rccm.200912-1806OC
- 145 Kaplan E, Bar-Yishay E, Prais D, *et al.* ENcouraging pulmonary outcome for surviving, neurologically intact, extremely premature infants in the postsurfactant era. *Chest* 2012;**142**:725–33. doi:10.1378/chest.11-1562
- 146 Hacking DF, Gibson A-M, Robertson C, *et al.* Respiratory function at age 8-9 after extremely low birthweight or preterm birth in Victoria in 1997. *Pediatr Pulmonol* 2013;**48**:449–55. doi:10.1002/ppul.22619
- 147 Thunqvist P, Tufvesson E, Bjermer L, *et al.* Lung function after extremely preterm birth-A population-based cohort study (EXPRESS). *Pediatr Pulmonol* 2018;**53**:64–72. doi:10.1002/ppul.23919
- 148 Welsh L, Kirkby J, Lum S, *et al.* The EPICure study: maximal exercise and physical activity in school children born extremely preterm. *Thorax* 2010;**65**:165–72. doi:10.1136/thx.2008.107474
- 149 Baker CD, Abman SH. Impaired Pulmonary Vascular Development in Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology* 2015;**107**:344–51. doi:10.1159/000381129
- 150 Bush A. COPD: a pediatric disease. *COPD* 2008;**5**:53–67. doi:10.1080/15412550701815965
- 151 Belgrave DCM, Buchan I, Bishop C, *et al.* Trajectories of Lung Function during Childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;**189**:1101–9. doi:10.1164/rccm.201309-1700OC
- 152 Marconi AM, Ronzoni S, Bozzetti P, *et al.* Comparison of Fetal and Neonatal Growth Curves in Detecting Growth Restriction. *Obstet Gynecol* 2008;**112**:1227–34. doi:10.1097/AOG.0b013e31818bdc7e
- 153 Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2004;**191**:481–7. doi:10.1016/j.ajog.2004.01.036
- 154 Torchin H, Ancel P-Y, Goffinet F, *et al.* Placental Complications and Bronchopulmonary Dysplasia: EPIPAGE-2 Cohort Study. *Pediatrics* 2016;**137**:e20152163. doi:10.1542/peds.2015-2163
- 155 Zaw W, Gagnon R, da Silva O. The risks of adverse neonatal outcome among preterm small for gestational age infants according to neonatal versus fetal growth standards. *Pediatrics* 2003;**111**:1273–7.
- 156 Morrow LA, Wagner BD, Ingram DA, *et al.* Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**196**:364–74. doi:10.1164/rccm.201612-2414OC

- 157 Lal MK, Manktelow BN, Draper ES, *et al.* Chronic lung disease of prematurity and intrauterine growth retardation: a population-based study. *Pediatrics* 2003;**111**:483–7. doi:10.1542/peds.111.3.483
- 158 Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau P-H, *et al.* Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr* 2010;**157**:733-739.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2010.05.002
- 159 Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, *et al.* Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* 2009;**124**:e450-458. doi:10.1542/peds.2008-3249
- 160 Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2004;**191**:481–7. doi:10.1016/j.ajog.2004.01.036
- 161 Zaw W, Gagnon R, da Silva O. The risks of adverse neonatal outcome among preterm small for gestational age infants according to neonatal versus fetal growth standards. *Pediatrics* 2003;**111**:1273–7. doi:10.1542/peds.111.6.1273
- 162 Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* 2016;**10**:67–83. doi:10.4137/CMPed.S40070
- 163 Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, *et al.* Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;**48**:333–9. doi:10.1002/uog.15884
- 164 Baschat AA. Fetal growth restriction - from observation to intervention. *J Perinat Med* 2010;**38**:239–46. doi:10.1515/JPM.2010.041
- 165 Dall’Asta A, Brunelli V, Prefumo F, *et al.* Early onset fetal growth restriction. *Matern Health Neonatol Perinatol* 2017;**3**. doi:10.1186/s40748-016-0041-x
- 166 Swanson AM, David AL. Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta* 2015;**36**:623–30. doi:10.1016/j.placenta.2015.03.003
- 167 Cock ML, Albuquerque CA, Joyce BJ, *et al.* Effects of intrauterine growth restriction on lung liquid dynamics and lung development in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2001;**184**:209–16. doi:10.1067/mob.2001.108858
- 168 Orgeig S, Crittenden TA, Marchant C, *et al.* Intrauterine growth restriction delays surfactant protein maturation in the sheep fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;**298**:L575-583. doi:10.1152/ajplung.00226.2009
- 169 Rozance PJ, Seedorf GJ, Brown A, *et al.* Intrauterine growth restriction decreases pulmonary alveolar and vessel growth and causes pulmonary artery endothelial cell dysfunction in vitro in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;**301**:L860-871. doi:10.1152/ajplung.00197.2011
- 170 Lipsett J, Tamblyn M, Madigan K, *et al.* Restricted fetal growth and lung development: a morphometric analysis of pulmonary structure. *Pediatr Pulmonol* 2006;**41**:1138–45. doi:10.1002/ppul.20480

- 171 Maritz GS, Cock ML, Louey S, *et al.* Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatr Pulmonol* 2001;**32**:201–10.
- 172 Maritz GS, Cock ML, Louey S, *et al.* Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep. *Pediatr Res* 2004;**55**:287–95.
doi:10.1203/01.PDR.0000106314.99930.65
- 173 Rees S, Ng J, Dickson K, *et al.* Growth retardation and the development of the respiratory system in fetal sheep. *Early Hum Dev* 1991;**26**:13–27.
- 174 Joss-Moore LA, Lane RH, Albertine KH. Epigenetic Contributions to the Developmental Origins of Adult Lung Disease. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 2015;**93**:119–27.
doi:10.1139/bcb-2014-0093
- 175 Joss-Moore LA, Wang Y, Baack ML, *et al.* IUGR decreases PPAR γ and SETD8 Expression in neonatal rat lung and these effects are ameliorated by maternal DHA supplementation. *Early Hum Dev* 2010;**86**:785–91. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.08.026
- 176 Zana-Taieb E, Pham H, Franco-Montoya ML, *et al.* Impaired alveolarization and intra-uterine growth restriction in rats: a postnatal genome-wide analysis. *J Pathol* 2015;**235**:420–30. doi:10.1002/path.4470
- 177 Alejandro Alcázar MA, Morty RE, Lendzian L, *et al.* Inhibition of TGF- β Signaling and Decreased Apoptosis in IUGR-Associated Lung Disease in Rats. *PLoS ONE* 2011;**6**.
doi:10.1371/journal.pone.0026371
- 178 Sonnenschein-van der Voort AMM, Gaillard R, de Jongste JC, *et al.* Foetal and infant growth patterns, airway resistance and school-age asthma. *Respirol Carlton Vic* 2016;**21**:674–82. doi:10.1111/resp.12718
- 179 Pike KC, Crozier SR, Lucas JSA, *et al.* Patterns of fetal and infant growth are related to atopy and wheezing disorders at age 3 years. *Thorax* 2010;**65**:1099–106.
doi:10.1136/thx.2010.134742
- 180 Sonnenschein-van der Voort AMM, Jaddoe VWV, Raat H, *et al.* Fetal and infant growth and asthma symptoms in preschool children: the Generation R Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**185**:731–7. doi:10.1164/rccm.201107-12660C
- 181 Turner S, Prabhu N, Danielan P, *et al.* First- and second-trimester fetal size and asthma outcomes at age 10 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:407–13.
doi:10.1164/rccm.201012-20750C
- 182 den Dekker HT, Jaddoe VWV, Reiss IK, *et al.* Fetal and Infant Growth Patterns and Risk of Lower Lung Function and Asthma. The Generation R Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**197**:183–92. doi:10.1164/rccm.201703-06310C
- 183 Morsing E, Gustafsson P, Brodzki J. Lung function in children born after foetal growth restriction and very preterm birth. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 2012;**101**:48–54.
doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02435.x
- 184 Hoo A-F, Stocks J, Lum S, *et al.* Development of lung function in early life: influence of birth weight in infants of nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**:527–33.
doi:10.1164/rccm.200311-15520C

- 185 Dezateux C, Lum S, Hoo A-F, *et al.* Low birth weight for gestation and airway function in infancy: exploring the fetal origins hypothesis. *Thorax* 2004;**59**:60–6.
- 186 Gray D, Willemse L, Visagie A, *et al.* Determinants of early-life lung function in African infants. *Thorax* 2017;**72**:445–50. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207401
- 187 Kotecha SJ, Edwards MO, Watkins WJ, *et al.* Effect of preterm birth on later FEV₁: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2013;**68**:760–6. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-203079
- 188 Saad NJ, Patel J, Burney P, *et al.* Birth Weight and Lung Function in Adulthood: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Am Thorac Soc* 2017;**14**:994–1004. doi:10.1513/AnnalsATS.201609-746SR
- 189 McNulty W, Usmani OS. Techniques of assessing small airways dysfunction. *Eur Clin Respir J* 2014;**1**. doi:10.3402/ecrj.v1.25898
- 190 Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr* 2013;**13**:59. doi:10.1186/1471-2431-13-59
- 191 Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, *et al.* Amniotic infection syndrome: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc* 2003;**6**:435–48. doi:10.1007/s10024-003-7070-y
- 192 Khong TY, Mooney EE, Ariel I, *et al.* Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* 2016;**140**:698–713. doi:10.5858/arpa.2015-0225-CC
- 193 Asher MI, Keil U, Anderson HR, *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995;**8**:483–91.
- 194 Asher MI, Montefort S, Björkstén B, *et al.* Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 2006;**368**:733–43. doi:10.1016/S0140-6736(06)69283-0
- 195 WHO | Growth reference data for 5-19 years. WHO. <http://www.who.int/growthref/en/> (accessed 3 Nov 2017).
- 196 LMSGrowth | Health for all Children. <http://www.healthforallchildren.com/shop-base/shop/software/lmsgrowth/> (accessed 3 Nov 2017).
- 197 Wanger J, Clausen JL, Coates A. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005;**26**:511–22. doi:10.1183/09031936.05.00035005
- 198 Standard Operating Procedure: Multiple Breath Nitrogen Washout. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:EkvWdYHCspoj:www.mbwtraining.com/ECFS_MBW_SOP.pdf+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=uk&client=firefox-b-d (accessed 23 Oct 2019).
- 199 Kirkby J, Bonner R, Lum S. Interpretation of pediatric lung function: impact of ethnicity. *Pediatr Pulmonol* 2013;**48**:20–6. doi:10.1002/ppul.22538

- 200 Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, *et al.* Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J* 2012;**40**:1324–43. doi:10.1183/09031936.00080312
- 201 Graham BL, Brusasco V, Burgos F, *et al.* Executive Summary: 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2017;**49**:16E0016. doi:10.1183/13993003.E0016-2016
- 202 Singer F, Houltz B, Latzin P, *et al.* A Realistic Validation Study of a New Nitrogen Multiple-Breath Washout System. *PLOS ONE* 2012;**7**:e36083. doi:10.1371/journal.pone.0036083
- 203 Jensen R, Stanojevic S, Klingel M, *et al.* A Systematic Approach to Multiple Breath Nitrogen Washout Test Quality. *PLOS ONE* 2016;**11**:e0157523. doi:10.1371/journal.pone.0157523
- 204 Lum S, Stocks J, Stanojevic S, *et al.* Age and height dependence of lung clearance index and functional residual capacity. *Eur Respir J* 2013;**41**:1371–7. doi:10.1183/09031936.00005512
- 205 Valeri L, Vanderweele TJ. Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychol Methods* 2013;**18**:137–50. doi:10.1037/a0031034
- 206 Singer F, Kieninger E, Abbas C, *et al.* Practicability of nitrogen multiple-breath washout measurements in a pediatric cystic fibrosis outpatient setting. *Pediatr Pulmonol* 2013;**48**:739–46. doi:10.1002/ppul.22651
- 207 Cooke RWI. Conventional birth weight standards obscure fetal growth restriction in preterm infants. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* 2007;**92**:F189–92. doi:10.1136/adc.2005.089698
- 208 Joyce BJ, Louey S, Davey MG, *et al.* Compromised respiratory function in postnatal lambs after placental insufficiency and intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2001;**50**:641–9. doi:10.1203/00006450-200111000-00018
- 209 Hadchouel A, Rousseau J, Rozé J-C, *et al.* Association between asthma and lung function in adolescents born very preterm: results of the EPIPAGE cohort study. *Thorax* 2018;**73**:1174–6. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-211115
- 210 Henschen M, Stocks J, Brookes I, *et al.* New aspects of airway mechanics in pre-term infants. *Eur Respir J* 2006;**27**:913–20. doi:10.1183/09031936.06.00036305
- 211 Plopper CG, Nishio SJ, Schelegle ES. Tethering tracheobronchial airways within the lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**:2–3. doi:10.1164/rccm.2211002
- 212 Duke JW, Gladstone IM, Sheel AW, *et al.* Premature birth affects the degree of airway dysanapsis and mechanical ventilatory constraints. *Exp Physiol* 2018;**103**:261–75. doi:10.1113/EP086588
- 213 Owen LS, Manley BJ, Davis PG, *et al.* The evolution of modern respiratory care for preterm infants. *The Lancet* 2017;**389**:1649–59. doi:10.1016/S0140-6736(17)30312-4
- 214 Lui K, Lee SK, Kusuda S, *et al.* Trends in Outcomes for Neonates Born Very Preterm and Very Low Birth Weight in 11 High-Income Countries. *J Pediatr* Published Online First: 3 October 2019. doi:10.1016/j.jpeds.2019.08.020

- 215 Gough A, Linden M, Spence D, *et al.* Impaired lung function and health status in adult survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 2014;**43**:808–16.
doi:10.1183/09031936.00039513
- 216 Twisk JW, Staal BJ, Brinkman MN, *et al.* Tracking of lung function parameters and the longitudinal relationship with lifestyle. *Eur Respir J* 1998;**12**:627–34.
doi:10.1183/09031936.98.12030627
- 217 Paiva M, van Muylem A, Engel LA. Slope of phase III in multibreath nitrogen washout and washin. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1982;**18**:273–80.