

Effetti della somministrazione di granulocyte colony stimulating factor sui livelli di insulin-like growth factor e sulla beta2-microglobulina nel liquido di lavaggio broncoalveolare di neonati prematuri*

Ettore Capoluongo[§], Giovanni Vento[#], Franco Ameglio^{*}, Paola Lulli[§], Concetta Santonocito[#], Stefano Angelo Santini[§], Sandro Rocchetti[§], Mirca Antenucci[§], Cinzia Carrozza[§], Costantino Romagnoli[#], Bruno Giardina[§], and Cecilia Zuppi[§]

[§] Biochemistry and Clinical-Biochemistry Institute

[#] Division of Neonatology, Catholic University, 00168 - Rome, Italy

^{*} Laboratory of Clinical Pathology of the General Hospital

"S. Giovanni Calibita" Fatebenefratelli/AFAR, Rome, Italy

ABSTRACT

Effects of g-csf on insulin-like growth factor system and beta2-microglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluids of preterm neonates

We studied the effects of the therapy with recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor (rhG-CSF) on the IGF-I and β_2 -microglobulin (B2M) levels in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) of six neutropenic preterm infants who developed chronic lung disease (CLD) and we compared the results with eleven non-neutropenic neonates with CLD, and 13 non-neutropenic without CLD. With the exception of the first day values, there was a clear similarity between non-neutropenic and neutropenic CLD patients. In contrast, non-neutropenic patients without CLD showed significantly lower values of free IGF-I and B2M. These findings suggest that 1) the mechanisms leading to CLD might be mediated by high levels of IGF-family molecules soon after birth 2) B2M could be a marker of BALF cellularity with potential inflammatory properties 3) G-CSF treatment induces an increased synthesis of IGF-I molecules by cells recruited in the lung, with possible enhancement of the fibrogenic mechanisms.

RIASSUNTO

Abbiamo studiato gli effetti della somministrazione di Granulocyte Colony Stimulating Factor ricombinante (rhG-CSF) sui livelli di alcune molecole del sistema IGF-I e della β_2 -microglobulina (B2M) dosati nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) di 6 neonati immaturi neutropenici che hanno successivamente sviluppato malattia cronica polmonare (CLD) e abbiamo confrontato i risultati con quelli di 11 non-neutropenici CLD positivi e con quelli di 13 non-neutropenici senza CLD. Ad eccezione dei valori della prima giornata, abbiamo osservato nei pazienti con CLD, non-neutropenici e neutropenici, livelli simili dei parametri considerati. Invece i pazienti non-neutropenici che non hanno successivamente sviluppato CLD avevano valori più bassi di IGF-I e di B2M. I nostri risultati suggeriscono che: 1) i meccanismi favorevoli alla CLD possono essere determinati subito dopo la nascita da molecole del sistema IGF-I; 2) la B2M può essere considerato un marker di cellularità con potenziali proprietà infiammatorie; 3) il trattamento con G-CSF induce una aumentata sintesi di IGF-I da parte di cellule reclutate nel polmone, con possibile stimolo di meccanismi profibrotici.

INTRODUZIONE

La malattia cronica polmonare (CLD) del neonato prematuro, soprattutto se con basso peso alla nascita, è uno dei maggiori problemi che i neonatologi incontrano, soprattutto a causa dei suoi effetti negativi sulla morbilità e per l'alto rischio di mortalità (1, 2). La patogenesi della CLD non è ancora chiarita, anche se sono noti molti fattori di rischio (3-6). Rilevanza patogenetica è stata attribuita ai processi infiammatori polmonari (1-3) determinati dall'aumentata sintesi di citochine pro-infiammatorie o anti-infiammatorie/fibrogeniche ritrovabili anche nel liquido di

lavaggio broncoalveolare (BALF) (1-3, 5). Queste citochine potrebbero essere responsabili dei processi fibrotici caratteristici della CLD (1). Inoltre, nella fibrosi polmonare idiopatica degli adulti è stato osservato un aumento dell'Insulin-like Growth Factors (IGFs) (6) e molti Autori indicano l'IGF-I come potente mediatore pro-fibrogenico, in quanto agisce come mitogeno (7) e stimola la sintesi del collagene dai fibroblasti (8). L'IGF-I presente nel siero è principalmente di sintesi epatica, indotta dall'ormone della crescita, ma è anche secreto da molte cellule come i fibroblasti e le cellule endoteliali (7-10). L'IGF-I nel polmone viene sintetizzato nei macrofagi alveolari (9) che sono

*Lavoro premiato al Congresso SIBioC 2004, Padova. Accettato nel 2005.

responsabili degli alti livelli di tale molecola osservati nella fibrosi polmonare idiopatica degli adulti (11), nella sclerosi sistemica (12), nella pneumoconiosi (13), nella sarcoidosi polmonare (14) e nella malattia polmonare interstiziale dei bambini (15, 16). La bio-disponibilità di IGF-I è determinata da sei proteine IGF-leganti (IGFBPs 1-6) che fungono da riserva delle molecole di IGF-I mantenendole inattive (15) e da modulatori delle interazioni IGF-I/recettore. In circolo la binding protein più rappresentata è la IGFBP-3 (11) che forma un grosso complesso con l'IGF-I ed un'altra subunità acido-labile (17). La forma biologicamente attiva è l'IGF-I libero non legato a proteine di trasporto (17).

L'IGF-I modula anche la sintesi di alcune citochine (18,19), infatti è noto che agisce da induttore della polarizzazione dei linfociti TH-2 che producono e rilasciano grandi quantità di Transforming Growth Factor beta-1 (TGF- β 1), un potente mediatore profibrotico (18), che a sua volta induce la produzione di IGF-I nei fibroblasti polmonari (16-18). In ultimo, anche il Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF-alfa), una citochina pro-infiammatoria, che si comporta come mediatore dei processi fibrotici, sembra essere responsabile della produzione sia di IGF-I che di TGF- β 1 (18). A conferma di queste considerazioni, in nostri precedenti lavori (3, 4) abbiamo trovato livelli aumentati di TGF- β 1, Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), e Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in neonati pre-termine con broncodiplasia polmonare severa (BPD) e inoltre tali citochine correlavano con lo stadio della malattia polmonare. In particolare i livelli di TGF- β 1 erano associati a prognosi peggiore sotto il profilo dell'outcome clinico (3).

Un altro fattore di rischio di CLD può essere la neutropenia. I neonati pretermine con neutropenia grave sono usualmente trattati con Granulocyte Colony Stimulating Factor ricombinante umano (rhG-CSF) (20). Questo fattore di crescita stimola la proliferazione dei precursori mieloidi e la maturazione e la funzionalità dei neutrofili e dei monociti ed è pertanto somministrato nei neonati prematuri neutropenici al fine di prevenire lo sviluppo di infezioni sistemiche (20-23).

Tabella I

Dati caratteristici dei pazienti

Variabili	Non-neutropenici		Neutropenici Gruppo C CLD-positivi (N=6)	P1	P2
	Gruppo A CLD-negativi (N=13)	Gruppo B CLD-positivi (N=11)			
GA, settimane	31 (29-32)	28 (26-32)	27 (26-32)	< 0.001	NS
BW, grammi	31 (29-32)	1013 (590-153)	835 (650-156)	< 0.001	NS

P1: test non parametrico ANOVA eseguito sui gruppi A, B, C;

P2: test di Mann-Whitney per i gruppi B e C;

GA: età gestazionale. BW: peso alla nascita;

* Mediana e (range);

* I gruppi B e C erano significativamente diversi dal gruppo A;

NS = Non significativo

Scopo del nostro studio è stato di determinare, nell'Epithelial Lining Fluid (ELF) di neonati pretermine trattati e non trattati con rhG-CSF, i livelli di alcune molecole del sistema IGF-I (IGF-I totale, IGF-I libero e IGFBP-3) e anche della beta2-microglobulina (B2M) nota come fattore profibrotico (24). I livelli dei parametri studiati sono stati quindi associati con i dati clinici.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Le caratteristiche dei 30 bambini immaturi studiati, ricoverati nel Reparto di Terapia Intensiva Neonatale della nostra Università sono riportate in Tabella I. Sono stati inclusi nello studio solo bambini nati da parto spontaneo che richiedevano intubazione endotracheale e ricovero in Terapia Intensiva. Sono stati esclusi neonati con malformazioni congenite, con infezioni pre o postnatali nella prima settimana di vita, con asfissia grave, o bambini trattati con desametasone.

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi: Gruppo A) 13 neonati non-neutropenici CLD-negativi che hanno sviluppato Respiratory Distress Syndrome (RDS) ma con radiografia toracica al 28° giorno negativa. Gruppo B) 11 neonati pre-termine non-neutropenici che hanno sviluppato RDS seguita da CLD (dipendenza da ossigeno terapia e rx torace positivo al 28° giorno di vita); Gruppo C) 6 neonati pretermine neutropenici (neutrofili <1.0 x10⁹/L), con RDS trattati con rhG-CSF e che hanno successivamente sviluppato CLD.

Tutti i neonati sono stati trattati con terapia surfattante (200 mg/kg di Curosurf-Chiesi, Italia) nelle prime sei ore di vita. I pazienti neutropenici venivano trattati, dal primo giorno di vita, con rhG-CSF alla dose di 10 microg/kg/die e terapia antibiotica. Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico della nostra Università.

Raccolta dei campioni di BALF. Il BALF è stato raccolto il primo giorno di vita (dopo terapia con surfattante entro le prime 24 ore di vita) e al terzo giorno. Nel gruppo C (neutropenici) è stato raccolto anche al 2° e 4° giorno (24 h dopo la somministrazione di rhG-CSF).

I campioni di BALF, centrifugati a 800 x g per 5 min a 4 °C, erano divisi in due aliquote e conservati a -80°C fino all'analisi. Per normalizzare le concentrazioni dei diversi analiti misurati su BALF ed esprimere le concentrazioni in termini di ELF, è stato utilizzato il rapporto urea siero/BALF come indicato in letteratura (25). L'urea è stata dosata con metodo colorimetrico (Urea Nitrogen su Olympus AU400) in duplicato.

I campioni di BALF sono

stati analizzati per la conta delle cellule con Bayer H*3 Automatic Analyzer (Bayer Diagnostics S.r.l., Milano, Italia), come riportato in letteratura (26).

L'IGF-I è stato dosato con metodo commerciale ELISA (Nichols Advantage) automatizzato su Liaison (Byk Gulden Italia, Cormano, Milano, Italia)

L'IGF-I libero è stato misurato con metodo RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. USA, commercializzato in Italia dalla Pantec srl, Torino - Italia). Il CV a livello di 0.03 ng/ml era < 6.5% su controlli in quintuplicato.

L'IGFBP-3 è stato misurato con metodo RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. USA, commercializzato in Italia da Pantec Torino - Italia). Il CV % a livello di 23,7 era < 5.8% su controlli in quintuplicato.

La Beta2-Microglobulina è stata dosata con metodo immunonefelometrico (DADE Behring, SpA Milano, Italia). Il CV % a livello di 0.49 ng/mL era < 3.0% su controlli in quintuplicato.

I risultati dei dosaggi sui campioni di BALF erano ottenuti in triplicato.

Analisi Statistica

Sono stati applicati tests non parametrici per il numero limitato di pazienti, in particolare per il confronto tra gruppi è stato usato il Mann-Whitney test e per il confronto dei

dati nel tempo il test di Wilcoxon per dati appaiati o il test di Friedman.

RISULTATI

Analisi delle caratteristiche dei pazienti (Tabella I)

I tre gruppi di pazienti A, B, C, differivano significativamente per età gestazionale e peso alla nascita. Mentre i gruppi B e C (ambidue CLD positivi) non presentavano significative differenze, il gruppo A era significativamente diverso sia da B che da C. Le altre variabili quali sesso, appropriatezza dell'età gestazionale, uso di steroidi prenatali e mortalità erano omogeneamente distribuite (dati non mostrati).

Analisi delle concentrazioni degli analiti (Tabella II)

Confronto dei Gruppi A e B

L'età gestazionale e il peso alla nascita erano significativamente più alti nel Gruppo A. Il Gruppo B (non-neutropenici CLD-positivi) presentava al primo e al terzo giorno valori di IGF-I libero più alti rispetto al Gruppo A (non-neutropenici CLD-negativi). Inoltre l'IGF-I libero aumentava significativamente ($P = 0.03$) tra il primo e il terzo giorno solo nel gruppo B.

Tabella II

Andamenti delle Mediane (ranges) nel tempo delle concentrazioni nell'ELF e della cellularità nel BALF dei parametri studiati

	Giorni	Non-neutropenici		Neutropenici	P1=	P=2
		Gruppo A (N=13)	Gruppo B (N=11)	Gruppo C (N=6)		
IGF-1 libero ng/ml	1	1,4 (0,6-2,4)	2,2 (0,8-6,1)	1,1 (0,6-4,1)	0,02	0,05
	3	1,4 (1-2,8)	2,2 (2-7,1)	6,8 (3,0-10,6)	0,01	0,058
P		0,21	0,03	0,03		
IGF-1 totale ng/ml	1	15,3 (0,9-59,8)	31,7 (15,1-79,6)	13,0 (2,0-17,0)	0,06	0,05
	3	14,7 (9,4-54)	35,0 (26-66,8)	29,7 (20,0-30,6)	0,02	NS
P		0,68	0,11	0,05		
IGFBP-3 ng/ml	1	889 (113-2054)	1360 (508-3899)	834 (698-969)	0,07	NS
	3	1000 (500-2145)	1660 (566-2836)	1999 (1571-2168)	0,09	NS
P		0,51	0,04	0,02		
β2-MG μg/ml	1	3,3 (1,1-9,2)	5,0 (1,7-13,8)	3,0 (2,9-3,9)	0,05	NS
	3	4,7 (1,5-10,8)	10,4 (2,3-22)	14,9 (11,0-18,7)	0,03	0,05
P		0,09	0,04	0,02		
BALF cellule Nx10 ⁹ /l	1	2,3 (1,3-4,4)	2,4 (1,0-4,5)	0,7 (0,4-0,9)	NS	0,01
	3	1,8 (1,5-5,6)	3,2 (1,9-6,1)	4,7 (3,3-7,4)	0,05	0,04
P		NS	0,05	0,01		

N = numero di pazienti; NS = non significativo.

Sono stati usati tests non parametrici per il confronto statistico: P= test non-parametrico di Wilcoxon per dati appaiati per il confronto nel tempo, P1= test non-parametrico di Mann & Whitney per dati appaiati per il confronto tra i pazienti neutropenici non-CLD vs non-neutropenici CLD, P2= test non-parametrico di Mann & Whitney per dati non appaiati per il confronto tra i pazienti neutropenici CLD vs non-neutropenici CLD.

L' IGF-I totale e la B2M erano significativamente ($P = 0.02$, $P = 0.03$, rispettivamente) più elevati nel gruppo B rispetto al Gruppo A solo il terzo giorno. Non sono state osservate differenze significative nei livelli di IGFBP-3 tra i due gruppi, sebbene, nel confronto tra giorni, la B2M e l' IGFBP-3 aumentavano significativamente ($P = 0.02$, $P = 0.03$, rispettivamente) tra il primo ed il terzo giorno solo nel gruppo B. Infine, la conta delle cellule del BALF era significativamente ($P = 0.04$) aumentata nel Gruppo B in terza giornata.

Confronto dei Gruppi B e C

L'analisi delle differenze tra i gruppi di pazienti CLD-positivi, sia non-neutropenici (B) che neutropenici (C), mostrava che prima della somministrazione di rhG-CSF il numero delle cellule e i livelli delle molecole studiate erano ridotti. Successivamente, sia il numero di cellule che i livelli delle molecole studiate aumentavano ($P < 0.04$ per tutti i parametri) nel Gruppo C, riducendosi solamente in quarta giornata (dato non tabulato) ed erano sempre significativamente più elevate ($P < 0.05$) per tutti i parametri di quelle osservate nel Gruppo B in terza giornata, ad esclusione dei livelli di IGF-I totale.

Confronto dei Gruppi A e C

Sebbene le caratteristiche di questi due gruppi fossero diverse per età gestazionale e peso alla nascita, il confronto statistico tra Gruppo A e C è simile a quello del Gruppo B e C suggerendo che i due gruppi di pazienti CLD-positivi trattati e non con rhG-CSF avevano un comportamento simile.

Interessante è il confronto dei dati tra i giorni. Infatti, l'IGF-I libero e la B2M presentavano i maggiori incrementi il terzo giorno dopo la terapia (circa + 520% e 400% rispettivamente, Fig.1), mentre l' IGF-I totale e la IGFBP-3 aumentavano di circa +100% nello stesso intervallo di tempo. Il rapporto IGF-I libero/totale, sebbene con un trend di incremento, non era significativamente aumentato dopo terapia. Inoltre il valore mediano di questo rapporto era più alto di quello riportato per il siero da altri autori (27). Una correlazione significativa è stata osservata tra i valori di B2M e di IGFBP-3 ($R=0.82$, $p<0.001$), in tutto il periodo analizzato.

DISCUSSIONE

Abbiamo determinato i livelli di IGF-I totale e libero, di IGFBP-3 e di B2M negli ELF di neonati pretermine ad alto rischio di CLD, con particolare attenzione ai bambini neutropenici trattati con rhG-CSF. Questa citochina è molto potente nell'indurre la produzione di precursori mieloidi con incremento della conta dei neutrofili e dei monociti, ma può indurre anche il rilascio di citochine pro-infiammatorie (20, 22). Recentemente è stato dimostrato che il G-CSF è in grado di indurre la polarizzazione dei linfociti TH-2 e di cellule dendritiche "suppressive", attraverso il rilascio di grandi quantità di citochine anti-infiammatorie profibrotiche, come il TGF- β 1 e l' Interleukin-10 (IL-10) (28).

I nostri dati evidenziano che la prevalenza di CLD nei prematuri trattati con rhG-CSF è significativamente più

alta (100%, $p<0.01$) che nei pazienti non trattati (46%) e che esiste una relazione statisticamente significativa tra CLD e alte concentrazioni delle quattro molecole studiate. Infatti, l'analisi delle differenze tra giorni nel gruppo di pazienti neutropenici ha mostrato che la somministrazione di rhG-CSF è seguita da i più alti livelli di IGF-I totale e libero, di IGFBP-3 e B2M nei primi tre giorni di vita, con un trend in decremento a partire dal 4° giorno. Questo comportamento potrebbe essere correlato all'aumento della conta delle cellule nel BALF per effetto dell' rhG-CSF (23). Tali valori, inoltre, pur se simili a quelli dei pazienti non neutropenici CLD-positivi, erano significativamente più elevati nel gruppo dei neutropenici in terza giornata.

Al momento non sono presenti in letteratura studi che stabiliscano se il trattamento con rhG-CSF possa indurre CLD nei prematuri, mentre i nostri dati rappresentano le prime osservazioni di una possibile relazione tra CLD e trattamento con rhG-CSF. Va sottolineato che la prevalenza di altri fattori di rischio per la CLD (infezioni postnatali, terapia antenatale con corticosteroidi, pervietà del dotto arterioso, sesso maschile) non era statisticamente diversa nei pazienti neutropenici e in quelli non neutropenici, mentre l'età gestazionale e il peso alla nascita erano più alti nei non-neutropenici CLD-negativi rispetto agli altri pazienti CLD-positivi appartenenti ai gruppi dei neutropenici e dei non-neutropenici.

Manca, per ovvie ragioni etiche, il confronto con neonati neutropenici non trattati con rhG-CSF, in quanto i protocolli terapeutici internazionali consigliano la somministrazione di rhG-CSF in associazione a terapia antibiotica, nei bambini con numero di neutrofili $< 1 \times 10^9/L$.

La determinazione di B2M è stata da noi effettuata perchè questa molecola rappresenta un buon marker di cellularità, essendo presente sulla superficie delle cellule

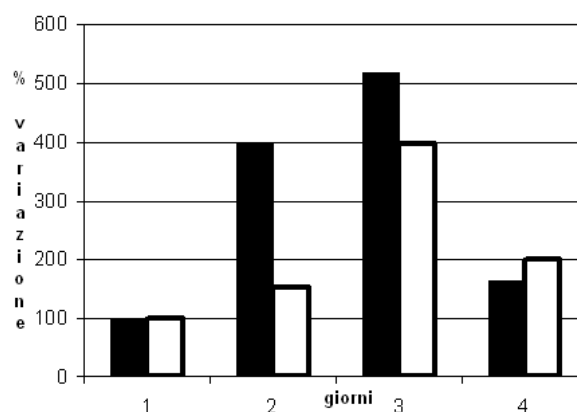


Figura 1
Percentuale di variazione nel tempo di IGF-I libero e di B2M dopo terapia con rhG-CSF

in associazione al sistema HLA di classe I e perché viene rilasciata nei fluidi intercellulari. In aggiunta, un dato interessante è rappresentato dal fatto che alcuni Autori hanno riportato un aumento di B2M nelle urine di bambini che hanno sviluppato CLD (24). Va sottolineato che gli aumentati livelli di B2M potrebbero essere determinanti nella genesi della fibrosi polmonare, essendo questa molecola associata al deposito di fibrille amiloidi formando essa stessa fibrille amiloidi (29). Ne consegue che la sinergia tra gli effetti dell' IGF-I e della B2M potrebbe potenziare i meccanismi patogenetici che inducono la CLD. Numerosi dati di letteratura, inoltre indicano che l'IGF-I è aumentato nelle malattie fibrotiche del polmone ed in modelli animali di fibrosi polmonare (6-12; 14, 15, 30, 31) anche attraverso la polarizzazione dei linfociti TH-2 con successivo incremento di citochine profibrotiche (19).

Studi recenti hanno inoltre messo in evidenza una correlazione tra depositi di IGF-I e di cellule CD68-positivo in sezioni di tessuto polmonare fibrotico, suggerendo che i macrofagi alveolari rappresentano la potenziale sorgente di IGF-I nel polmone (32).

Anche se sono già stati descritti numerosi fattori di rischio di CLD, i meccanismi patogenetici sono tuttora poco conosciuti (1). La fibrosi polmonare è un aspetto caratteristico e costante nella patogenesi della CLD, nella quale si osserva costantemente un aumentato numero di fibroblasti ed una aumentata deposizione di componenti della matrice extracellulare (17, 24, 29, 32).

I nostri risultati lasciano la possibilità di ipotizzare che il trattamento con rhG-CSF inducendo un aumento della sintesi di molecole dell'IGF-I family da parte di cellule sensibili, provochi un incremento di meccanismi fibrogenici.

Certamente i nostri dati non sono una dimostrazione che la causa dello sviluppo della CLD sia da addebitarsi all'rhG-CSF, perchè altri fattori di rischio possono influenzare sfavorevolmente l'outcome clinico, ma lo studio in modelli animali delle basi molecolari che supportano questa ipotesi potrebbe fornire ulteriori elementi di valutazione anche riguardanti una possibile revisione dei protocolli di somministrazione di questo fattore di crescita (33).

BIBLIOGRAFIA

- Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. [Review]. *Ped Pulmonol.* 1995;9:371-8
- Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J. Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 1979;95:819-23
- Vento G, Matassa PG, Ameglio F, Capoluongo E, Tortorolo L, Romagnoli C. Effects of early dexamethasone on pulmonary fibrogenic mediators and respiratory mechanics in preterm infants. *Eur Cyt Netw* 2002;13:207-14.
- Vento G, Matassa PG, Capoluongo E, Tortorolo L, Romagnoli C, Ameglio F. Glucocorticoids in preterm infants and discrepancies of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:501-2
- Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. [Review]. *Clin Immunol* 2001;99:308-19
- Pala L, Giannini S, Rosi E, Cresci B, Scano G, Mohan S, Duranti R, Rotella CM. Direct measurement of IGF-I and IGFBP-3 in bronchoalveolar lavage fluid from idiopathic pulmonary fibrosis. *J Endocrinol Invest* 2001;24:856-64.
- Cambrey A, Kwon DOJ, Gray AJ, Harrison NK, Yacoub M, Barnes PJ, Laurent GJ, and Chung KF. Insulin-like growth factor 1 is a major fibroblast mitogen produced by primary cultures of human airway epithelial cells. *Clin Sci* 1995;89:611-17
- Goldstein RH, Poliks CF, Pilch PF, Smith BD, and Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* 1989;124:964-70
- Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, and Crystal RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor 1-type molecule. *J Clin Invest.* 1988;82:1685-93
- Homma S, Nagaoka I, Abe H, Takahashi K, Seyama K, Nukiwa T, and Kira S. Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1 in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2084-89.
- Aston C, Jagirdar J, Lee TC, Hur T, Hintz RL, Rom WN. Enhanced insulin-like growth factor molecules in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1597-1603.
- Harrison NK, Cambrey AD, Myers AR, Southcott AM, Black CM, DuBois RM, Laurent GJ, and McAnulty RJ. Insulin-like growth factor-1 is partially responsible for fibroblast proliferation induced by bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis. *Clin Sci* 1994;86:141-8.
- Vanhee D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, and Tonnel AB. Mechanisms of fibrosis in coal worker's pneumoconiosis: increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1049-55.
- Allen JT, Bloor CA, Knight RA, Spiteri MA. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:250-8
- Chadelat K, Boule M, Corroyer S, Fauroux B, Delaisi B, Tournier G, and Clement A. Expression of insulin-like growth factors and their binding proteins by bronchoalveolar cells from children with and without interstitial lung disease. *Eur Respir J* 1998;11:1329-1336
- Bloor CA, Knight RA, Kedia RK, Spiteri MA, Allen JT. Differential mRNA expression of insulin-like growth factor-1 splice variants in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;15:265-72
- Rosenfeld RG, Roberts CT, editors. Contemporary endocrinology. Vol.17. The IGF systems: molecular biology, physiology, and clinical applications. Totowa, NJ: Humana Press.1999; p.227-255.
- Krein PM, Winston BW. Roles of Insuline-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor- in fibrotic lung disease. *Chest* 2002;122:289S-293S.
- Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 2003;171:3550-9
- Banerjee MC, Speer CP. The current role of colony-stimulating factors in prevention and treatment of neonatal sepsis. *Semin Neonatol* 2002;7:335-349.
- Carr R, Modi N, Dore C. G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3):CD003066. [Review].
- Escande B, Kuhn P, Gaugler C, Messer J. Neonatal neutropenia, nosocomial infection and granulocyte-colony stimulating factor *Arch Pediatr* 2003;10:93-5.

23. Giraldo P, Zuppa AA, Romagnoli C, Tortorolo G. Transient effect of granulocyte colony-stimulating factor in allo-immune neonatal neutropenia. *Biol Neonate* 2000 78:277-80.
24. Nishimaki S, Shima Y, Sato M, An H, Hashimoto M, Nishiyama Y, Iwasaki S, Tateishi I, Seki K, Yokota S. Urinary beta 2-microglobulin in premature infants with chorioamnionitis and chronic lung disease. *J Pediatr* 2003;143:120-2.
25. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 1986;60:532-8
26. G. Vento, P.G. Matassa, E. Zecca, L. Tortorolo, M. Martelli, M.P. De Carolis, L. Maggio, G. Zini, G. d'Onofrio, S. Valentini, C. Romagnoli. Effect of Dexamethasone on tracheo-bronchial aspirate fluid cytology and pulmonary mechanics in preterm infant. *Pharmacology* (in press).
27. Kawai N, Kanzaki S, Takano-Watou S, Tada C, Yamanaka Y, Miyata T, Oka M, Seino Y. Serum free Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), Total IGF-I, and IGF-Binding Protein-3 concentrations in normal children with Growth Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:82-89
28. Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, Mariotti A, Scambia G, d'Onofrio G, Leone G. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood* 2002;100:2562-71.
29. Ivanova MI, Gingery M, Whitson LJ, Eisenberg D. Role of the C-terminal 28 residues of beta2-microglobulin in amyloid fibril formation. *Biochemistry* 2003;42:13536-40.
30. Currie AE, Kelly M, Vyas JR, Pandya H, Field D, Kotecha S. Fibroblast mitogenic activity of lung lavage fluid from infants with chronic lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2002;86:193-7.
31. Krein PM, Sabatini PJB., Tinmouth W, Green FHY and Winston BW. Localization of Insulin-like Growth Factor-I in Lung Tissues of Patients with Fibroproliferative Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:83-90
32. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS: persistent elevation over time predicts outcome. *Chest* 1995;108:1303-14
33. Chetty A, Andersson S, Lassus P, Nielsen HC. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD. *Pediatr Pulmonol* 2004;37:128-36