

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla uvedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Štěpán Coufal

Bariérová funkce střeva v patogenezi nekrotizující enterokolitidy

Gut barrier function in pathogenesis of necrotizing enterocolitis

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Miloslav Kverka, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.8.2014

Podpis:

Tato práce vznikala v letech 2012 – 2014 za finanční podpory grantového projektu IGA NT/13483-4 „Novorozenci s vrozenými vadami gastrointestinálního traktu: nové přístupy k prevenci a diagnóze nekrotizující enterokolitidy a sepse.“

Děkuji MUDr. Miloslavu Kverkovi, Ph.D. za cenné rady, obětavou pomoc a čas, který mi věnoval. Dále děkuji prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. za cenné rady a připomínky a MUDr. Aleně Kokešové, Ph.D. za odbornou spolupráci a cenné rady z oboru chirurgie novorozenců. Rád bych touto cestou poděkoval také všem členům Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za ochotu a pomoc i za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je závažné a život ohrožující onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) novorozenců. Jde o poruchu adaptace GIT novorozence na extrauterinní život, která postihuje zejména nedonošené novorozence nebo novorozence trpící vrozenými vývojovými vadami GIT či srdce. Významnou roli v patogenezi NEC hraje porucha střevní bariéry a přítomnost abnormální střevní mikroflóry. Diagnostika NEC je v současné době založena na přítomnosti klinických příznaků – distenze břicha, příměs krve ve stolici a radiologickém nález *pneumosis intestini*. V časně fázi onemocnění jsou příznaky značně nespecifické a neumožňují jednoznačné odlišení NEC od jiných poruch GIT či sepse. Cílem této práce je zlepšit porozumění zánětlivé odpovědi novorozence při NEC a najít vhodný ukazatel, který by umožnil časnou diagnostiku NEC a tím i včasnou intervenci. Cytokiny mají význačnou úlohu v regulaci imunitní odpovědi. I přes popsanou souvislost některých cytokinů s NEC, nebyla zánětlivá odpověď při NEC dostatečně popsána. V rámci této diplomové práce byl podán přehled hladiny koncentrací 40 cytokinů souvisejících se zánětlivou odpovědí. Intestinal - Fatty Acid Binding Protein (i-FABP) je malý cytoplazmatický protein zralých epitelových buněk tenkého střeva. Při poškození je z buněk uvolňován do krevního oběhu a glomerulární filtrací se dostává do moči. Bylo zjištěno, že pacienti s NEC mají v čase diagnózy onemocnění vyšší i-FABP v séru než pacienti se sepsí. Během léčby se hladina i-FABP snižuje. Podobné výsledky jsou patrné i v moči. Bylo tedy zjištěno, že hladina i-FABP v séru i v moči odráží míru poškození střevního epitelu a jeví se proto jako možný ukazatel pro časnou diagnostiku NEC a její odlišení od jiných onemocnění. Cytokeratin 18 (CK18) je intracelulární protein epitelových buněk. Při apoptóze, je činností aktivovaných kaspáz štěpen. Kaspázami štěpený CK18 (ccCK18) se uvolňuje z apoptotických buněk do krevního oběhu. Nebylo prokázáno, že by kaspázami štěpený CK18 byl vhodným ukazatelem rané fáze NEC. Dalším cílem by mělo být propracování metody stanovení i-FABP až na úroveň screeningové metody, použitelné při vyšetření ohrožených skupin novorozenců.

Klíčová slova: NEC, i-FABP, CK18

Abstract

Necrotizing enterocolitis (NEC) is severe and life-threatening disease of infant gastrointestinal tract (GIT). It is a defect of GIT adaptation to extrauterine life, which affects mostly premature infants and infants afflicted by congenital developmental defects of GIT or heart. Gut barrier disruption and presence of abnormal gut microbiota has eminent role in NEC pathogenesis. Nowadays, the diagnosis of NEC is based on presence of clinical symptoms – abdominal distension, blood in stool and radiologic finding *Pneumatosis intestini*. However, the symptoms are in early stage of NEC non-specific and do not allow unambiguous distinguishing of NEC from other GIT disorders or sepsis. Aim of this thesis was to extend the understanding of inflammatory response in neonates with NEC and to find applicable biomarker for early diagnosis of NEC and thereby provide quick intervention. Cytokines have important role in immune response regulation. Although the connection between some cytokines and NEC was described, the inflammatory response during NEC was not yet properly stated. The levels of 40 cytokines related to inflammation was shown in this thesis. Intestinal – Fatty Acid Binding Protein (i-FABP) is a small cytoplasmic protein of mature epithelial cells of small intestine. It is released to bloodstream during damage of gut epithelium and it can pass through glomerular apparatus to urine. Patients with NEC have higher levels of i-FABP in serum in time of diagnosis than patients with sepsis. The level of i-FABP decreases during treatment. Similar results were obtained from urine. It was concluded, that levels of i-FABP in serum and in urine reflect the level of gut epithelia disruption and therefore might be useful biomarker for early diagnosis of NEC and also for the distinction of NEC from other diseases. Cytokeratin 18 (CK18) is intracellular protein of epithelial cells. It is cleaved by activated caspases during apoptosis. Caspase cleaved CK18 (ccCK18) is released from apoptotic cells into bloodstream. The applicability of ccCK18 as a marker of early stage of NEC was not approved in this thesis. Future aim should be to elaborate the method for i-FABP determination to the level of screening method applicable for examining of endangered groups of newborns.

Key words: NEC, i-FABP, CK18

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Přehled literatury.....	10
2.1	Nekrotizující enterokolitida.....	10
2.2	Epidemiologie onemocnění.....	11
2.3	Patologie a patofyziologie onemocnění.....	12
2.4	Patogeneze a rizikové faktory vzniku onemocnění.....	15
2.4.1	Střevní bariéra	20
2.4.1.1	Mechanická složka střevní bariéry.....	21
2.4.1.2	Imunologická složka střevní bariéry	23
2.4.1.3	Biochemická složka střevní bariéry.....	26
2.4.1.4	Mikrobiální složka střevní bariéry.....	27
2.4.1.5	Současně akceptované modely onemocnění	30
2.5	Diagnostika onemocnění.....	32
2.5.1	Ukazatele onemocnění	34
2.5.1.1	Nespecifické ukazatele	34
2.5.1.2	Specifické ukazatele.....	35
3	Cíle práce	38
4	Materiál a metody	39
4.1	Materiál	39
4.1.1	Definice studované populace	39
4.1.1.1	Vstupní kritéria	39
4.1.2	Odběr materiálu	43
4.2	Metody	44
4.2.1	Kvantitativní protilátkový mikročip pro stanovení cytokinů	44
4.2.2	Enzymatická imunoanalýza pro stanovení koncentrace cytokeratinu 18 (CK18)....	47
4.2.3	Enzymatická imunoanalýza pro stanovení koncentrace proteinu i-FABP	49
4.2.4	Statistické vyhodnocení.....	50
5	Výsledky	51
5.1	Vyšetření krevních vzorků	51
5.1.1	Vyšetření cytokinů	51
5.1.2	Vyšetření cytokeratinu 18 (CK18).....	55
5.1.3	Vyšetření i-FABP	60

5.2	Vyšetření vzorků moči.....	62
5.2.1	Vyšetření i-FABP v moči.....	62
6	Diskuze.....	68
7	Souhrn.....	75
8	Seznam použité literatury.....	76

Seznam zkratek

ccCK18	kaspázami štěpený CK18 (caspase cleaved CK18)
CK18	CytoKeratin 18
Cr	kreatinin
CRP	C-reaktivní protein (C-Reactive Protein)
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
ELBW	extrémně nízká porodní hmotnost (Extremely Low Birth Weight)
ELISA	enzymatická imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
GC	pohárkové buňky (Goblet Cells)
GIT	gastrointestinální trakt (GastroIntestinal Tract)
HRP	křenuvová peroxidáza (HorseRadish Peroxidase)
i-FABP	protein vázající mastné kyseliny ve střevě (intestinal-Fatty Acid Binding Protein)
IL-1β	InterLeukin-1beta
kDa	kiloDalton
MAMPs	molekulární vzory asociované s mikroby (Microbe-Associated Molecular Patterns)
NEC	nekrotizující enterokolitida (Necrotizing EnteroColitis)
PC	Panethovy buňky (Paneth Cells)
PRRs	receptory rozpoznávající mikrobiální vzory (Pattern Recognition Receptors)
SigA	sekreční imunoglobulin A (Secretory Immunoglobulin A)
TJ	těsné spoje (Tight Junction)
TLR	Toll Like Receptor
TMB	3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidin
TNF-α	faktor nekrotizující tumory- α (Tumor Necrosis Factor- α)
VLBW	velmi nízká porodní hmotnost (Very Low Birth Weight)
VVV	vrozené vývojové vady

1 Úvod

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je jedním z nejzávažnějších akutních onemocnění gastrointestinálního traktu novorozenců. Ačkoliv se můžeme s tímto termínem v literatuře setkat již od poloviny 20. století, patogeneze a patofyziologie onemocnění je stále nejasná. I přes intenzivní výzkum a klinickou praxi je prevence a léčba nedostačující a nekrotizující enterokolitida tak zůstává jednou z hlavních příčin mortality na neonatálních jednotkách intenzivní péče. Nekrotizující enterokolitida představuje také závažnou komplikaci pooperačního období po řešení vrozených vývojových vad gastrointestinálního traktu a je velmi častou příčinou chirurgické intervence u novorozenců.

Pro nekrotizující enterokolitidu je charakteristický velmi rychlý a neočekávaný nástup. V pokročilém stádiu onemocnění hrozí riziko perforace střeva a úmrtí novorozence. Klinické příznaky jsou v první fázi onemocnění značně nespecifické a tedy snadno zaměnitelné s jinými poruchami GIT či se sepsí. Při vyšetření je proto nutné obezřetné posuzování ohrožených novorozenců.

Diagnostický postup, který by odhalil onemocnění ještě před jeho destruktivní fází a umožnil tak zajištění správné terapie onemocnění, je stále velmi problematický a nedokonalý. Současně je diagnóza NEC založena na posouzení klinických příznaků – zejména distenzi břicha, příměsi krve ve stolici a radiologickém nálezu *pneumosis intestini*. Pro velmi rychlý nástup onemocnění, je nezbytně nutné identifikovat biologické ukazatele, které by umožnily časnou diagnostiku tohoto onemocnění a tím zajistily rychlou a včasnou intervenci.

2 Přehled literatury

2.1 Nekrotizující enterokolitida

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je jedním z nejzávažnějších akutních onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) novorozenců. S frekvencí úmrtí 10,2 až 14,5 na 100 000 živě narozených patří mezi významné příčiny smrti novorozenců ve vyspělých zemích (HOLMAN *et al.* 1989, 1997).

V roce 1888 popsal rakouský soudní patolog Paltauf v práci *Die spontane Dickdarmruptur der Neugeborenen* případy úmrtí novorozenců, které následovaly po rozsáhlé nekróze a perforaci střev (Paltauf A. 1888 cit. v KAFETZIS *et al.* 2003). Tento spis je označován jako jeden z prvních záznamů s patofyziologií podobnou NEC. V roce 1952 němečtí lékaři, pediatr Schmid a patolog Quaiser, popsali klinický a patologicko-anatomický charakter závažné formy enteritidy u novorozenců, kterou později nazvali nekrotizující enterokolitida (QUAISER 1952; SCHMID 1952). V 60. letech 20. století rozšířili Berdon *et al.* popis onemocnění o další klinické a radiografické nálezy (BERDON *et al.* 1964).

V roce 1975 Sántulli *et al.* popsali tři základní atributy patogeneze onemocnění: poškození střevní bariéry, přítomnost bakterií a intraluminálního metabolického substrátu (započetí enterální výživy) (SÁNTULLI *et al.* 1975).

V roce 1978 zavedli Bell *et al.* ucelená kritéria pro diagnózu NEC (tzv. staging systém) (BELL *et al.* 1978). Tento systém zahrnuje systémové, gastrointestinální a radiografické nálezy a umožňuje určit stupeň onemocnění a následně i příslušnou terapii. V doplněné podobě se používá dodnes.

Ačkoliv se první zmínky o tomto onemocnění objevily v literatuře již před více než 120 lety, patogeneze a patofyziologie onemocnění není dodnes zcela jasná a kompletní. I přes intenzivní výzkum a klinickou praxi je prevence, diagnostika a léčba nedostačující. Pro neočekávaný nástup a rychlý průběh onemocnění, spolu s devastujícími následky, je velmi důležitý obezřetný postup při posuzování ohrožených novorozenců, kdy jsou klinické příznaky v počáteční, rané fázi NEC značně nespecifické a tím pádem snadno zaměnitelné

s jinými poruchami GIT či s novorozeneckou sepsí (AYDEMIR *et al.* 2011). NEC je proto jednou z nejčastějších příčin chirurgické intervence u novorozenců, současně také morbidity a mortality na neonatálních jednotkách intenzivní péče.

2.2 Epidemiologie onemocnění

Incidence onemocnění se pohybuje v rozmezí 1-3 novorozence z 1000 celkově narozených, nezávisle na porodní váze či době gestace, a činí 1-7,7 % pacientů přijatých na neonatální jednotky intenzivní péče. Mortalita onemocnění dosahuje až 50 % (HOLMAN *et al.* 1989; YEE *et al.* 2012). Byla popsána snižující se incidence NEC s rostoucí porodní hmotností (viz Tab. č. 1) (GUILLET *et al.* 2006), ale také i s rostoucí délkou gestace (SANKARAN *et al.* 2004). NEC tedy postihuje zejména předčasně narozené novorozence a novorozence s nízkou porodní hmotností (viz Tab. č. 1).

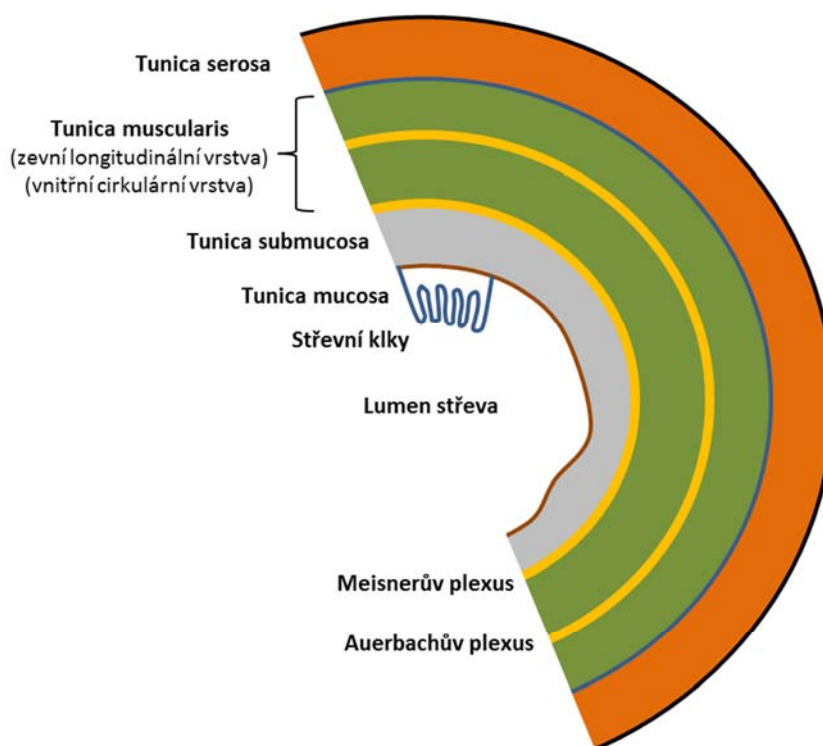
Porodní hmotnost (g)	Incidence (%)
401-750	11,5
751-1000	9
1001-1250	6
1251-1500	4

Tabulka č. 1: Vztah porodní hmotnosti a incidence NEC (informace z GUILLET *et al.* 2006).

Nebyla prokázána souvislost mezi onemocněním a ročním obdobím či geografickou lokalitou (HOLMAN *et al.* 1989). Vliv pohlaví na incidenci NEC nebyl pozorován (REES *et al.* 2010). Incidence NEC v posledních letech stoupá, především díky zlepšení neonatologické péče o předčasně narozené novorozence, protože dříve předčasně narození jedinci zemřeli v důsledku svého nedostatečného vývoje a nemohlo tedy dojít k rozvoji tohoto onemocnění. I přes další pokroky v neonatologii nedošlo v posledních 10 letech k výraznému zlepšení prevence, snížení incidence nebo mortality onemocnění.

2.3 Patologie a patofyziologie onemocnění

Během nekrotizující enterokolitidy dochází ke koagulační nekróze ve slizniční (tunica mucosa) a podslizniční (tunica submucosa) vrstvě stěny střeva (Obr. č. 1) s rizikem perforace a úmrtím novorozence. Postižena bývá nejčastěji distální část tenkého střeva - terminální kyčelník (ileum), slepé střevo (caecum) a proximální část střeva tlustého (colon). Často bývá postiženo i více segmentů najednou. Ostatní části střeva (dvanáctník – konečník) jsou postiženy zpravidla u těžkých případů NEC, tzv. NEC totalis, kde mortalita dosahuje až 100 % (BALLANCE *et al.* 1990; SHO *et al.* 2014).



Obrázek č. 1: Zjednodušená stavba stěny střeva (vytvořil Š.C. 2014).

Makroskopicky se střevo postižené NEC jeví jako nepravidelně rozšířené se ztenčenou stěnou s tmavě rudým až černým zbarvením a se ztenčenými oblastmi postiženými snětí (Obr. č. 2). V subserózní vrstvě (tunica subserosa) střeva mohou být patrná plynem naplněná ložiska (Obr. č. 3), tento jev se nazývá *pneumatosis intesini* a je jedním

z hlavních znaků diagnózy NEC při rentgenologickém vyšetření (viz kap. 2.4) (MUCHANTEF *et al.* 2013). Ložiska plynu vznikají fermentací nestrávených cukrů bakteriemi, které do stěny střeva pronikly porušenou střevní bariérou. V ložiscích byla prokázána přítomnost vodíku, metanu a oxidu uhličitého (KLIEGMAN a FANAROFF 1984). Povrch sliznice je hemoragický a zvrhovatělý. Nejzávažnější komplikací jsou perforace nekrotických částí střeva a zánět pobřišnice způsobený stolicí či střevním obsahem, tzv. sterkorální peritonitida. Pokud dojde k perforaci střeva je na povrchu pobřišnice přítomný šedo-zelený výpotek (PEREL *et al.* 1988; BALLANCE *et al.* 1990).



Obrázek č. 2: Střevo postižené NEC. Je přítomna nekróza, perforace (bílá šipka) a dilatace (černá šipka), autopsie (převzato a upraveno z [http://phil.cdc.gov/PHIL Images/02051999/00022/20G0022_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/02051999/00022/20G0022_lores.jpg)).



Obrázek č. 3: Ložiska plynu (bílé šipky) v subserózní vrstvě stěny střeva postiženého NEC (převzato z HANSEN 2000).

Mikroskopické vyšetření popisuje jako hlavní histopatologické znaky střeva postiženého NEC: akutní zánět ve slizniční a podslizniční vrstvě, edém sliznice, koagulační později transmurální nekrózu a perforace. Počáteční slizniční léze vedou k rozšíření klků. V pokročilém stádiu nemoci dochází k odlučování krycího epitelu až k úplnému rozrušení klků. Dále jsou popisovány vakuoly naplněné plynem v podslizniční vrstvě, jako součást *pneumatosis intestini*. Znamky hojení (opravy epitelu, granulace a fibrotizace tkáně) jsou přisuzovány delšímu průběhu onemocnění před samotnou klinickou manifestací. Výsledkem těchto procesů je vznik striktur střeva různém rozsahu (zúžení trubcovitého orgánu) (KOSLOSKE *et al.* 1980; KLIEGMAN a FANAROFF 1984; BALLANCE *et al.* 1990).

2.4 Patogeneze a rizikové faktory vzniku onemocnění

V současné literatuře bychom nenašli přesnou příčinu této choroby. Patogeneze onemocnění je popisována jako multifaktoriální. Hlavní rizikové faktory NEC jsou shrnuty v níže zobrazeném zjednodušeném schématu (Schéma č. 1), patří mezi ně nedonošenost, zavedení umělé výživy, abnormální mikrobiální kolonizace a hypoxicko-ischemická událost.

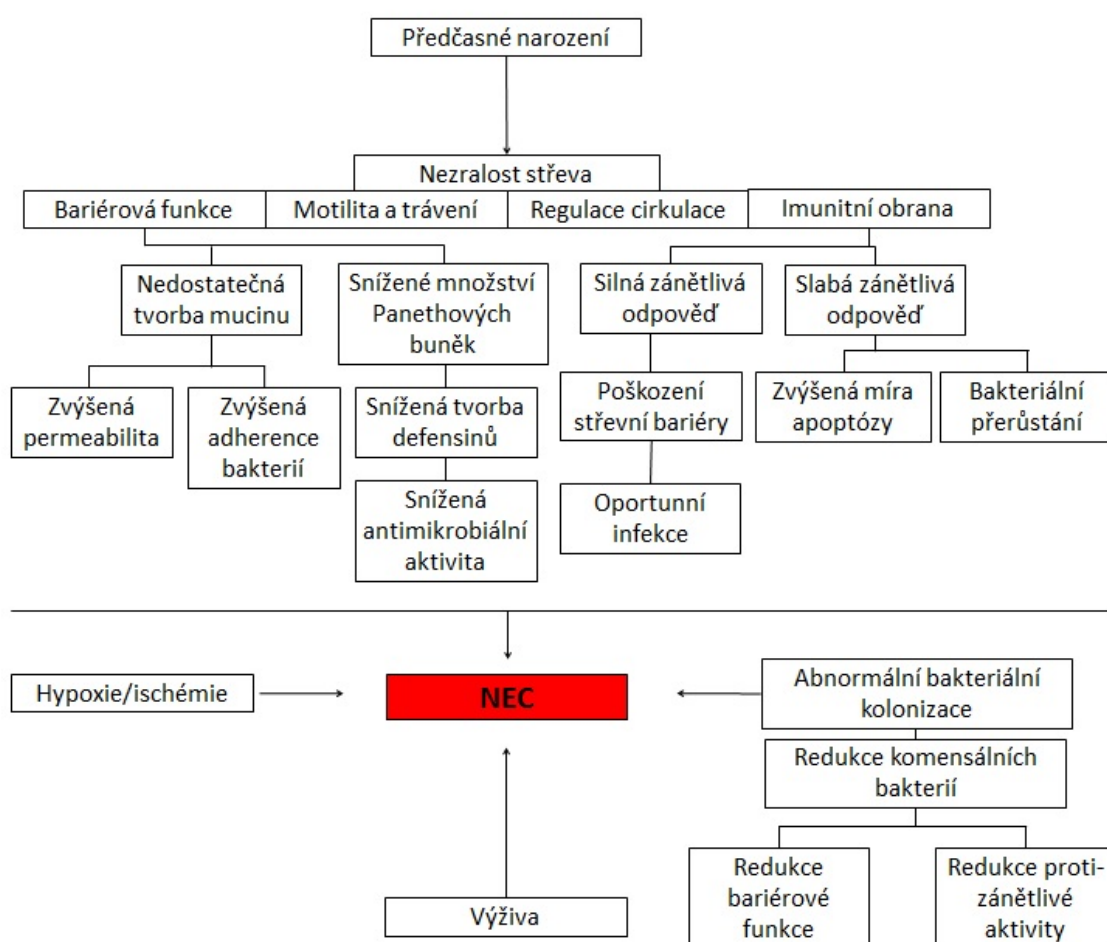


Schéma č. 1. Zjednodušená patogeneze nekrotizující enterokolitidy (NEC) (převzato a upraveno z LIN a STOLL 2006; LIN *et al.* 2008).

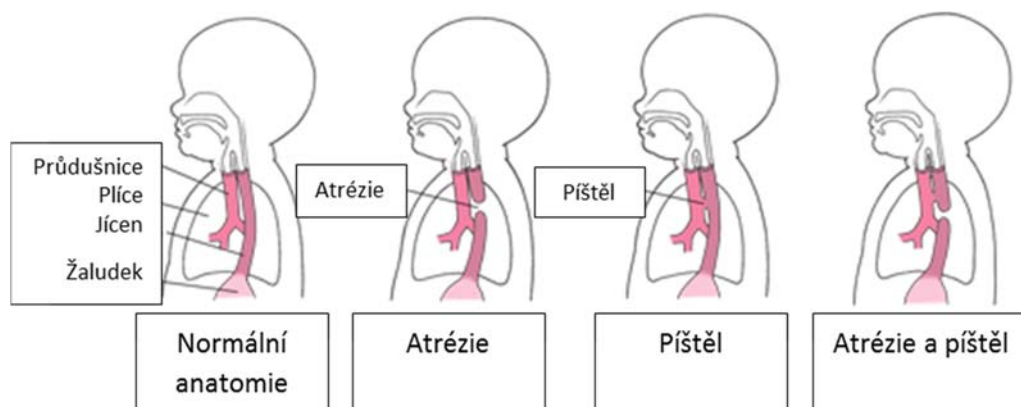
Ačkoliv není definována přesná příčina nemoci, je předčasný porod a s ním spojená vývojová nezralost novorozence považován za dominantní rizikový faktor. Předčasně narození, tj. nedonošení novorozenci, představují hlavní rizikovou skupinu (90 %). Předčasně narozený novorozenec, je jedinec narozený před dokončeným 37. týdnem gravidity (většinou 24. – 37. týden). Podle porodní hmotnosti jsou nejvíce ohroženi novorozenci s extrémně nízkou (pod 1000 g) či velmi nízkou porodní hmotností (pod 1500 g) (v anglické literatuře uváděné jako tzv. Extremely Low Birth Weight, ELBW; Very Low Birth Weight, VLBW). U nedonošených jedinců dochází k rozvoji NEC nejčastěji mezi 14. - 21. dnem po narození, v naprosté většině případů po zahájení enterální výživy (STOLL *et al.* 2004; YEE *et al.* 2012).

Donošení novorozenci (tj. narození v termínu, tedy po 37. týdnu gravidity) představují 10 % postižených. Obzvláště zajímavou skupinou novorozenců trpících NEC jsou donošení jedinci s vrozenými vývojovými vadami (VVV) GIT, zejména pak v období krátce po operačním řešení VVV (OSTLIE *et al.* 2003; ERDOĞAN *et al.* 2012). Ohroženi jsou také jedinci s VVV srdce (McELHINNEY *et al.* 2000), intrauterinní růstovou retardací (plod nedosahuje svého růstového potenciálu ve vztahu ke gestačnímu stáří) (KARAGIANNI *et al.* 2010), jedinci trpící respiračním stresem či anoxií během porodu (WILSON *et al.* 1983). Na rozdíl od nedonošených novorozenců dochází u donošených jedinců k rozvoji NEC dříve – během prvního týdne po narození (OSTLIE *et al.* 2003).

S vrozenými vývojovými vadami gastrointestinálního traktu se setkáváme zhruba u 1 z 1500 porodů. Jednou z nejvýraznějších komplikací v pooperačním období při operačním řešení VVV GIT představují septické stavy. Sepse (řecky sepo neboli hnit) je definována jako systémová odpověď organismu na infekci, je řešena u 8 % novorozenců, kteří jsou po laparotomii (chirurgické otevření břišní dutiny) bez enterostomie (chirurgické vyústění střeva). Pokud byla v rámci operačního řešení VVV GIT provedena enterostomie je sepsa řešena až u 20 % novorozenců (MUDr. Kokešová osobní sdělení). Původci sepse jsou nejčastěji střevní bakterie, které procházejí střevní bariérou. Průnik mikroorganismů střevní bariérou je způsoben zejména její nezralostí a její zvýšenou permeabilitou v novorozeneckém období (viz níže). Výsledkem je lokalizovaný zánět a následná systémová infekce.

Mezi nejčastější operačně řešené VVV GIT na Klinice dětské chirurgie Fakultní nemocnice v Motole patří atrézie jícnu, atrézie střeva, volvulus, omfalokéla a gastroschíza (MUDr. Kokešová osobní sdělení). Všechny zmíněné VVV GIT jsou život ohrožující, je nutno je včas rozpoznat a operovat.

Atrézie jícnu je vývojová vrozená vada jícnu, která je způsobena poruchou diferenciací embryonální střevní trubice v trubici trávicí a dýchací (Obr. č. 4). Jícen může být slepě ukončen, velmi často bývá píštělí spojen s průdušnicí. Napojením na průdušnici vzniká vážné riziko, kdy přijímaná potrava či obsah žaludku může vniknout do dýchacích cest a způsobit tak selhání respirace (KOVESI a RUBIN 2004).

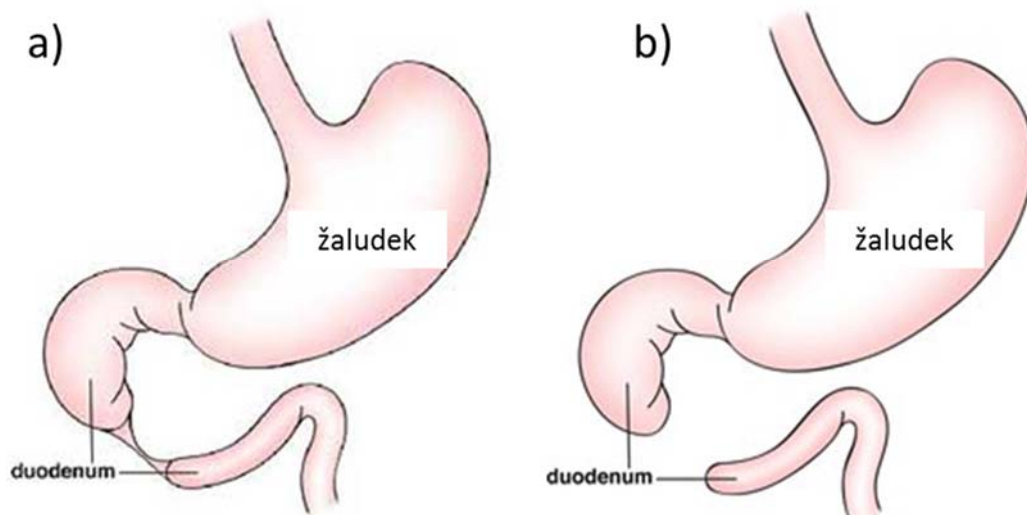


Obrázek č. 4: Zjednodušené příklady atrézie jícnu v porovnání s normálním uspořádáním

(převzato a upraveno z

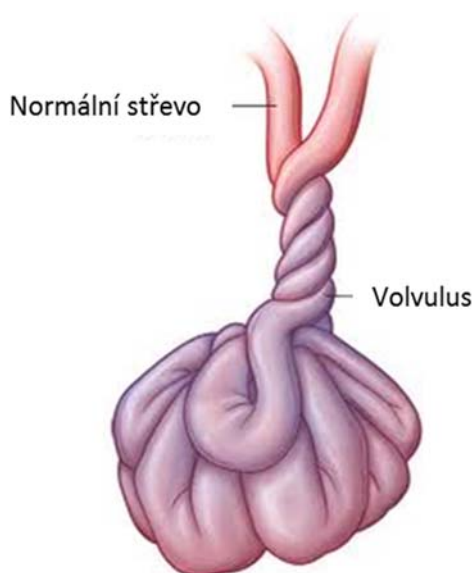
http://www.merckmanuals.com/home/childrens_health_issues/birth_defects/digestive_tract_defects.html).

Atrézie střeva představuje uzavření lumina dvanáctníku (duodenum) (Obr. č. 5), lačníku (jejunum), kyčelníku (ileum) střeva nebo tlustého střeva (méně častá je anorektální atrezie). Příčinou atrezie dvanáctníku je uváděna porucha re-kanalizace embryonálního základu střeva. Atrezie tenkého střeva vzniká při ztrátě průchodnosti některé z velkých střevních tepen plodu – např. arteria mesenterica superior (ALNOSAIR *et al.* 2014; DERENONCOURT *et al.* 2014; CHEN *et al.* 2014).



Obrázek č. 5: Zjednodušené příklady atrézie dvanáctníku (převzato a upraveno z <http://www.cincinnatichildrens.org/health/i/obstructions/>).

Volvulus je v literatuře řazen mezi rotační anomálie (tzv. zauzlení) (Obr. č. 6). Volvulus vzniká v důsledku poruchy rotace embryonálního střeva kolem arteria mesenterica superior a v důsledku poruchy upevnění střeva na zadní část peritoneální dutiny (SNYDER a CHAFFIN 1954; VARETTI *et al.* 2013).



Obrázek č. 6: Zjednodušený příklad zauzlení střeva (převzato a upraveno z <http://www.geisinger.kramesonline.com/Spanish/3,88673>).

Gastroschíza a omfalokéla jsou vrozené vývojové vady GIT, při kterých dochází k rozštěpu přední stěny břišní a vyhřeznutí nitrobřišních orgánů.

Gastrochíza je v literatuře popisována jako defekt stěny břišní, kdy se novorozenec rodí s vyhřezlými střevními kličkami a to v různém rozsahu. Vyhřezlé střevní kličky nejsou kryty, na rozdíl od u níže popsané omfalokély (Obr. č. 7). Střevo bývá edematózní a hrbolaté (LEDBETTER 2006; ERDOĞAN *et al.* 2012).



Obrázek č. 7: Příklad gastroschízy u novorozence

(převzato z http://rad.usuhs.edu/medpix/master.php3?mode=topic_images&recnum=7635&quiz=#top).

Omfalokéla je popisována jako průnik obsahu dutiny břišní do baze pupečníku. Vyhřezlé orgány jsou uzavřeny do vaku (Obr. č. 8) o různé velikosti. Malé omfalokély obsahují pouze střevní kličky, velké mohou obsahovat také játra a slezinu. Dutina břišní takovýchto jedinců bývá velmi malá, protože vývoj probíhá bez přítomnosti orgánů umístěných ve správné poloze (LEDBETTER 2006).



Obrázek č. 8: Příklad omfalokély u novorozence

(převzato z http://rad.usuhs.edu/medpix/parent.php3?mode=image_finder&authid=0&max=16#display).

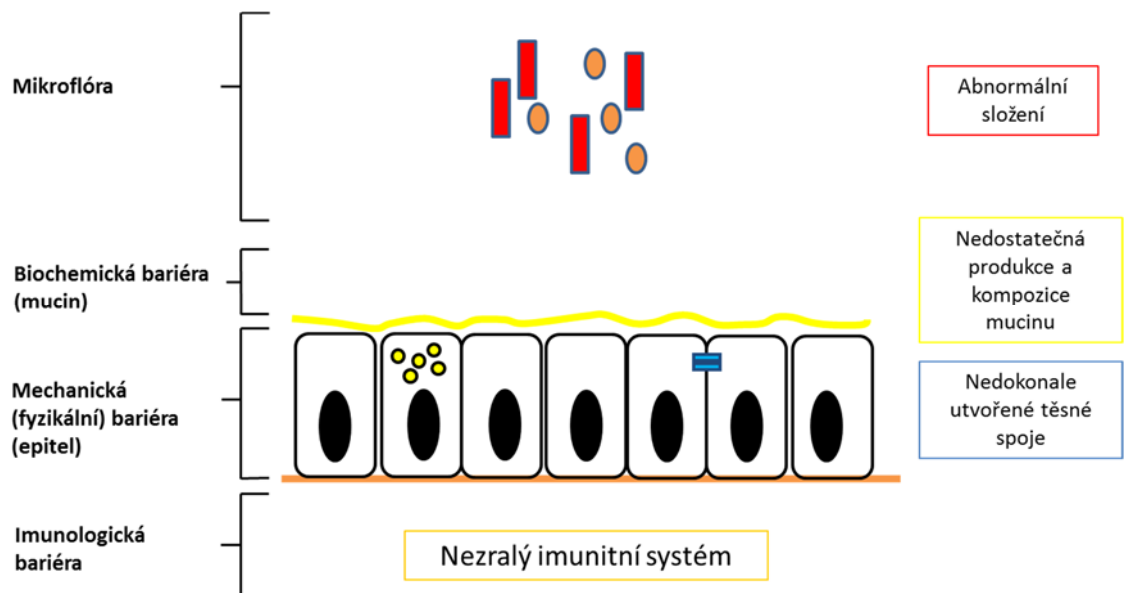
Z výše uvedeného vyplývá, že hlavním rizikovým faktorem NEC je nezralost či poškození střeva, zejména pak střevní bariéry. Bariérová funkce střeva je zajišťována komplexními mechanismy fungujícími na několika úrovních. Střevní mikroflóra je integrální součástí těchto mechanismů a podílí se na řadě vývojových a fyziologických funkcí organismu.

2.4.1 Střevní bariéra

Střevní bariéra představuje styčnou plochu mezi makroorganismem a prostředím v lumen trávicího traktu. Při zajišťování trávení a vstřebání živin, transportu iontů, plynů a udržování homeostáze vody je střevní bariéra neustále vystavována a zatěžována antigeny, patogeny a toxiny obsaženými v přijímané potravě i vodě. Střevní bariéra je zajišťována mechanickými (fyzikálními) i biochemickými prostředky, ty společně s komenzálními a symbiotickými bakteriemi (střevní mikroflórou) regulují její selektivní propustnost. Na obraně a udržování integrity střevní bariéry spolupracuje přirozená i adaptivní složka imunitního systému. Pro správnou funkci této bariéry je nezbytně nutné, aby byly všechny složky tohoto složitého komplexu vyvinuty (přítomny) a byly funkční.

Ačkoliv je anatomická diferenciací střeva lidského plodu ve 20. týdnu gestace téměř kompletní, zrání, ustanovení polopropustnosti (tzv. „gut closure“) a dotváření jednotlivých komponent probíhá dále až do porodu i po něm (ROUWET *et al.* 2002). Vývoj

střevní bariéry jako celku (Obr. č. 9) pokračuje dále až do 2 let života a je významně ovlivněn výživou mateřským mlékem a střevní mikroflórou (FOXX-ORENSTEIN a CHEY 2012). Nedonošení jedinci tak nemají zcela vyvinuté složky střevní bariéry (Obr. č. 9), což činí jejich střevní bariéru propustnější a náchylnější k poškození. Hospitalizace novorozenců na neonatálních jednotkách intenzivní péče, kde opakované podávání antibiotik, odkládání enterální výživy, umělá výživa, léčiva a nemocniční prostředí samotné jsou příčinou abnormálního složení střevní mikroflóry v kritickém časovém úseku vývoje jedince (MUDr. Kokešová osobní sdělení). K abnormálnímu složení mohou přispět i další znaky nezralosti nedonošeného novorozence: nedostatek produkce či nízká aktivita proteolytických enzymů (např. pepsin, trypsin), nízká kyselost žaludku i nedokonalá peristaltika střev. Výše zmíněné nedostatky vytvářejí prostředí pro rozvoj NEC.



Obrázek č. 9: Zjednodušené zobrazení složek střevní bariéry a její nedostatky u nedonošeného novorozence. Žlutě je značena vrstva hlenu a pohárková buňka, modře těsné spoje, oranžově basální lamina (vytvořil Š.C. 2014).

2.4.1.1 Mechanická složka střevní bariéry

Střevní bariéra tenkého střeva sestává z jednovrstevného cylindrického epitelu (Obr. č. 9). Tento epitel je tvořen několika typy buněk: enterocyty, pohárkovými buňkami, enteroendokrinními buňkami a Panethovými buňkami. Přenos antigenů z lumen tenkého střeva do lymfatické tkáně Peyeroých plaků zajišťují specializované membránové M

(Microfold) buňky. Buňky střevního epitelu vznikají ze střevních kmenových buněk, které jsou umístěny v Lieberkühnových kryptách. Střevní kmenové buňky zajišťují pravidelnou obnovu epitelu po 4-5-ti dnech. Nově vznikající buňky diferencují a migrují k vrcholům klků, aby zde nahradily buňky, které přirozeně hynou formou programované buněčné smrti - apoptózy. Tato forma úhynu buněk je fyziologická a nevede k narušení střevní bariéry. Tento směr je popisován jako krypto-vilózní osa. Panethovy buňky naopak zauímají pozici při bázi krypt.

Buňky střevního epitelu mají specializované funkce. Enterocyty se vyznačují kartáčovým lemem a slouží zejména ke vstřebávání živin. Pohárkové buňky a buňky enteroendokrinní se vyznačují produkcí a sekrecí ochranného hlenu a některých hormonů. Panethovy buňky produkují a uvolňují antimikrobiální molekuly a jsou řazeny do přirozeného imunitního systému. Membránové (M) buňky (viz výše) zajišťují přísun antigenů pro správnou funkci slizničního imunitního systému. Jako další důležité funkce buněk střevního epitelu můžeme jmenovat tvorbu a uvolňování různých trávicích enzymů, expresi adhezivních molekul, receptorů rozpoznávající mikrobiální vzory (Pattern Recognition Receptors, PRRs), receptorů pro polymerní imunoglobuliny (vyjma M buněk) a pro cytokiny. Dále produkci a uvolňování cytokinů a dalších signálních mediátorů. Pro tyto funkce jsou buňky střevního epitelu často uváděny jako součást integrální imunity na slizničních površích.

Epitelové buňky jsou polarizované a mezi sebou propojené těsnými spoji (zonula occludens). Těsné spoje (Tight Junction, TJ) jsou multiproteinové komplexy a postupně se utváří od 10. týdne gestace. Těsné spoje zajišťují těsný, přesto však dynamický spoj v apikálních částech přilehlých buněk, čímž zabraňují nekontrolovanému paracelulárnímu průniku mikroorganismů a větších makromolekul střevního obsahu z lumen střeva (POLAK-CHARCON *et al.* 1980; LEBENTHAL a LEBENTHAL 1999). Kromě těsných spojů se na zajištění integrity střevního epitelu podílejí také adhesivní spoje (zonula adhaerens) a desmozomy (macula adhaerens) (FARQUHAR a PALADE 1963).

Ačkoliv je velmi málo známo o průběhu zrání těsných spojů u lidského plodu, uvádí se, že nedonošení jedinci mají v porovnání s donošenými zvýšenou střevní permeabilitu (ROUWET *et al.* 2002).

Zvýšená propustnost, způsobená sníženou expresí proteinů těsných spojů byla popsána v *in vitro* studii po působení TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (MA *et al.* 2004). TNF- α je společně s faktorem aktivující destičky (Platelet-Activating Factor) popisován jako významný mediátor v zánětlivé kaskádě vedoucí k poškození střevního epitelu a tedy i v patogenezi NEC (CAPLAN *et al.* 1990; TRAVADI *et al.* 2006).

Narušení či pozměnění komplexu proteinů těsných spojů vedoucí k vyšší propustnosti, bylo popsáno i vlivem patogenních bakterií, které bývají v literatuře popisovány v souvislosti s patogenezi NEC: *Clostridium difficile* (HECHT *et al.* 1988, 1992), *Clostridium perfringens* (SONODA *et al.* 1999), *Escherichia coli* (SIMONOVIC *et al.* 2000).

Funkce absorpce a sekrece střevního epitelu vyžívají od 26. týdne gestace (LEBENTHAL a LEBENTHAL 1999). Sekrecí vody a chlorných aniontů „omývají“ enterocyty svůj luminální povrch a odstraňují tak patogenní bakterie a jejich toxiny (ECKMANN *et al.* 1997). Tato schopnost však nemusí být u nedonošených plně vyvinuta a může tak docházet k vyšší adhezi patogenních bakterií a zatěžování a poškození nezralého střevního epitelu.

2.4.1.2 Imunologická složka střevní bariéry

Ochrana střevní bariéry je zajišťována buňkami přirozeného i adaptivního imunitního systému. Významnou součástí přirozeného imunitního systému jsou Panethovy buňky (viz níže), dále rezidentní tkáňové makrofágy, žírné buňky a dendritické buňky. Součástí adaptivního imunitního systému jsou T, B lymfocyty a plasmatické buňky produkující sekreční imunoglobulin A (SIgA). Ochrana střevní bariéry je zajišťována i neimunitními obrannými mechanismy (nízké žaludeční pH, proteolytické enzymy – pepsin, trypsin, střevní peristaltika, tvorba mucinů a další). Všechny zmíněné složky vytvářejí ve své zralé podobě funkční ochranný celek.

Panethovy buňky (Paneth cells, PC) jsou vysoce specializované sekreční buňky lokalizované v Lieberkühnových kryptách tenkého střeva (Obr. č. 11). Mají jednu z hlavních úloh v přirozené obranyschopnosti střeva, ale také v regulaci složení a distribuci

střevní mikroflóry. Vyznačují se typickými znaky sekrečních buněk (velké endoplasmatické retikulum, dobře vyvinutý Golgiho aparát, přítomnost apikálně uložených cytoplasmatických granulí). V granulích Panethových buněk byly popsány antimikrobiální molekuly: lysozym (ERLANDSEN *et al.* 1974), α -defensiny (HD-5, HD-6) (PORTER *et al.* 1997; SALZMAN *et al.* 1998) a fosfolipáza A2 (NEVALAINEN a HAAPANEN 1993).

Degranulace následuje po stimulaci PRRs Gram-pozitivními, Gram-negativními bakteriemi či součástmi jejich buněčných stěn (např. lipopolysacharid, kyselina lipoteichová). Obsah granulí je uvolněn do lumen střeva (AYABE *et al.* 2000). Naopak produkované cytokiny jsou uvolňovány bazolaterálním směrem a slouží ke koordinaci odpovědi na vyvolávající podnět a k náboru imunitních buněk do místa postižení (viz níže).

Panethovy buňky jsou také producenty epidermálního růstového faktoru (Epidermal Growth Factor, EGF), transformujícího růstového faktoru- α (Transforming Growth Factor- α), Wnt-3 a ligandu Notch Dll4. Tyto molekuly mají důležitou roli v udržování homeostáze prostředí Lieberkühnových krypt, sídla střevních kmenových buněk a zajišťují tak jejich správnou funkci (SATO *et al.* 2011).

Panethovy buňky se objevují již během 13. týdne gestace a zrají dále od 22. a 24. týdne gestace, ve stejnou dobu dochází i ke zvyšování počtu Panethových buněk v kryptách. Zvyšování počtu probíhá až do dospělosti (společně s růstem střeva). Byla zjištěna snížená tvorba α -defensinů u nedonošených novorozenců (24. týden gestace) v porovnání s donošenými jedinci. Ve vzorcích střev odebraných během operace novorozenců pro NEC v porovnání se vzorky kontrolních novorozenců (operovaných pro atrezií střeva nebo ileus) byl zjištěn zvýšený počet Panethových buněk i exprese α -defensinů, ale nebyla zjištěna zvýšená tvorba proteinů (SALZMAN *et al.* 1998). Jiné studie naopak popsaly snížený počet Panethových buněk ve vzorcích střev odebraných novorozencům s NEC v porovnání s počty Panethových buněk u kontrolních novorozenců (operovaných pro atrezií střeva nebo spontánní střevní perforaci) (COUTINHO *et al.* 1998; ZHANG *et al.* 2012).

Deficit či vývojový defekt související s funkcí Panethových buněk činí nezralé střevo více zranitelné. Nedokonalá ochrana antimikrobiálními molekulami vede k větší bakteriální

adherenci a zátěži nezralé střevní bariéry (viz níže). Na základě výše popsaných zjištění a faktu, že přítomnost správně fungujících Panethových buněk je důležitá pro homeostázu prostředí střevních krypt, kde sídlí střevní kmenové buňky, i pro regulaci složení střevní mikroflóry, byl zaveden nový model NEC tzv. „Bottom up“ (Obr. č. 11), který přisuzuje Panethovým buňkám centrální roli v patogenezi NEC. Tento model je opakem doposud uznávaného modelu „Top down“ (Obr. č. 10).

Dalším významným nedostatkem, který limituje celkovou funkci přirozeného imunitního systému nedonošených novorozenců, byl prokázán deficit opsonizačního systému (např. snížená koncentrace komplementu v séru) i snížená baktericidní aktivita leukocytů (MCCRACKEN a EICHENWALD 1971; WRIGHT *et al.* 1975).

Významnou roli v obraně střevní bariéry zastává sekreční imunoglobulin A (SIgA). Tento imunoglobulin je tvořen jako polymerní IgA (obvykle dimer spojený J řetězcem) plasmatickými buňkami v lamina propria. Následně je prostřednictvím poly-Ig receptoru transportován skrze střevní epitel, přičemž při uvolnění do vrstvy hlenu na luminální straně bariéry (viz níže) je obohacen o sekreční komponentu, která chrání protilátku proti enzymatickému štěpení v lumen střeva.

Ve střevě SIgA plní ochranou funkci zejména neutralizací bakterií a antigenů na úrovni biochemické bariéry a na rozhraní s úrovní mikroflóry (Obr. č. 9). Mechanismus účinku SIgA je založen na agregaci bakterií, zabránění jejich adheze a penetrace, SIgA také usnadňuje pohlcování antigenů M buňkami.

Celková produkce IgA v dospělosti jedince převyšuje ostatní produkované izotypy, avšak v období po narození je produkce IgA nedostatečná. Velký význam pro ochranu střevní bariéry po narození novorozence je tak příjem SIgA v mateřském mléce, kde svým zastoupením představuje hlavní imunoglobulin. SIgA je do mateřského mléka secernován plasmatickými buňkami přilehlými k epitelu mléčné žlázy. Původ těchto buněk je popisován ve slizničním imunitním systému střeva, odkud migrují. Toto vysvětluje specifitu těchto protilátek v mléce pro antigeny střevní mikroflóry a poukazuje na

existenci společného imunitního mechanismu sliznic (ROUX *et al.* 1977; WEAVER *et al.* 1998; ELLA *et al.* 2011).

Kromě SIgA a nutričních složek obsahuje mateřské mléko další důležité komponenty, které hrají roli při zrání, funkci a obraně střevní bariéry (např. růstové faktory, hormony, enzymy, přenašeče, protizánětlivé a antimikrobiální molekuly) (MORAN *et al.* 1983; SAITO *et al.* 1993; MOYA *et al.* 1994; KVERKA *et al.* 2007; GROER *et al.* 2014). Mateřské mléko na rozdíl od umělé výživy méně zatěžuje slizniční povrch a obsaženými růstovými faktory (např. EGF) opravuje případné poškození této vrstvy. Pro výše zmíněné účinky je výživa mateřským mlékem v definovaném vyživovacím schématu popisována jako jedna z mála možností prevence NEC (SCHANLER *et al.* 1999).

Všechny hlavní součásti slizničního imunitního systému střeva jsou přítomny od 29. týdne gestace. Ačkoliv může být imunitní systém nedonošených novorozenců v době předčasného porodu vyvinut (< 29. týden gestace), dlouhodobá hospitalizace na neonatálních jednotkách intenzivní péče, umělá výživa a antibiotická terapie neumožňují potřebnou souhru vedoucí k nastavení správné funkce a regulace imunitního systému novorozence. Nedokonalá regulace nezralého imunitního systému může vést na úrovni střevní bariéry prostřednictvím slabé zánětlivé odpovědi k bakteriálnímu přerůstání, zatěžování epitelových buněk a nadměrné apoptóze epitelových buněk střeva. Na straně druhé aktivace nezralého či neregulovaného imunitního systému může vést k poškození střevní bariéry silnou zánětlivou odpovědí, průniku dalších bakterií z lumen střeva a k dalšímu podnícení zánětlivé odpovědi. Je tak možné, že počáteční slabá imunitní odpověď vyústí v silnou zánětlivou a destruktivní odpověď.

2.4.1.3 Biochemická složka střevní bariéry

Povrch bariéry tenkého střeva je chráněn vrstvou hlenu. Tato vrstva je tvořena silně glykosylovanými (O-glykosylace) proteiny, tzv. muciny. Muciny jsou kódovány *MUC* geny. Pro tenké střevo je velmi významný mucin MUC2. Produkci hlenu zajišťují pohárkové buňky (Goblet Cells, GC) již od 12. týdne gestace (Obr. č. 9). Od 27. týdne gestace se tvorba i kompozice hlenu podobá té u dospělých jedinců. Hlen sestává ze dvou

vrstev, vnitřní (tenčí) a vnější (tlustší). Tloušťka hleny a hlenových vrstev, stejně tak muciny, kterým je tvořena, se v různých částech GIT liší (CHAMBERS *et al.* 1994; MATSUO *et al.* 1997; BUISINE *et al.* 1998; ATUMA *et al.* 2001).

Kromě mechanické ochrany a lubrikace povrchu střeva, umožňuje hlen ochranu epitelu před kyselými sekrety žaludku. Společně s SIgA zajišťuje agregaci a odstraňování bakterií z lumen střeva. V ochraně epitelu před bakteriemi může vrstva hleny napomáhat i zadržováním uvolňovaných antimikrobiálních molekul (McSWEEGAN *et al.* 1987). Prostřednictvím zadržování trávicích enzymů ve vrstvě hleny je také podporováno trávení. Nezralá vrstva hleny (nedostatečná produkce i kompozice) však může vést k nedokonalé ochraně střevního epitelu, zvýšené střevní permeabilitě, bakteriální adhezi a možnému poškození střevní bariéry patogenními i nepatogenními stimuly.

2.4.1.4 Mikrobiální složka střevní bariéry

Většina epitelových povrchů lidského těla (kůže, horní cesty dýchací, urogenitální a gastrointestinální trakt) je kolonizována mikroorganismy. Ty jsou souhrnně označovány jako mikroflóra či nověji mikrobiom nebo mikrobiota. Ačkoliv se normální mikrobiom skládá zejména z bakterií, jsou zde přítomny také viry, houby i prvoci. Mikrobiota osidluje oblasti hostitele, které jim poskytují vhodné podmínky pro jejich růst a vytvářejí zde velice složitý ekosystém. Nejvíce kolonizovaným povrchem lidského těla je GIT. Protože se podmínky prostředí v různých částech GIT liší, je počet i druhové zastoupení bakterií proměnlivé. Složení střevní mikroflóry je ovlivněno od samého narození způsobem porodu, výživou a v dospělosti pak i životním stylem a složením stravy. Celkový počet bakterií ve střevní mikroflóře se odhaduje na 10^{14} s diversitou 500-1000 druhů (ECKBURG *et al.* 2005; KOENIG *et al.* 2011).

Vztah mezi makroorganismem (hostitelem) a střevní mikroflórou, tvořenou zejména komenzálními bakteriemi, je označován za mutualistický (vzájemně prospěšný). Bylo prokázáno, že střevní mikroflóra má řadu fyziologických funkcí (např. trávení a vstřebávání živin, syntéza důležitých vitamínů - např. vitamín K, regulace metabolismu tuků) i imunologických funkcí (např. účast v bariérové funkci střeva (Obr. č. 9), v ochraně

proti invazi patogenů z lumen střeva, v homeostáze střevního epitelu, v ovlivnění vývoje slizničního imunitního systému) (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.* 1983; STEPANKOVA *et al.* 1998; KOZAKOVA *et al.* 2006; WILLIAMS *et al.* 2006; KVERKA *et al.* 2011; HANSEN *et al.* 2012).

Významnou a prospěšnou roli pro hostitele mají probiotika. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které (v přiměřeném množství) přispívají ke zlepšení stavu hostitele. Současně se ukazuje prospěšný význam nejen živých probiotik, ale také jejich komponent a produktů. Jako mechanismy prospěšného působení probiotik na zdraví hostitele, byly mimo jiné popsány: zlepšení bariérové funkce střeva, stimulace slizničního imunitního systému, ovlivnění produkce pro- i protizánětlivých mediátorů i změny v zastoupení jednotlivých druhů bakterií i (MACK *et al.* 1999; MADSEN *et al.* 2001; LODINOVA-ZADNIKOVA *et al.* 2003; KOKESOVA *et al.* 2006; ZAKOSTELSKA *et al.* 2011; KMONICKOVA *et al.* 2012). Ačkoliv střevní mikroflóra přispívá ke správnému vývoji, funkci a zdraví jedince, po proniknutí skrze střevní bariéru nebo za určitých okolností či stavech (např. imunodeficience) může působit patologicky (KLIMESOVA *et al.* 2013; KVERKA a TLASKALOVA-HOGENOVA 2013).

Skutečnost, že NEC není popisována *in utero*, byla spojována s tvrzením, že se novorozenec rodí ze sterilního prostředí a tedy i se sterilním střevním obsahem. Dle současných poznatků víme, že placenta zdravých matek je osídlena specifickou mikroflórou. Již během prvního týdne po narození dochází k utvoření velmi komplexní střevní mikroflóry novorozence, která zraje a vyvíjí se v období od konce prvního do třetího roku života. Během tohoto období dochází k dynamickým změnám v jejím bakteriálním složení. U donošených novorozenců je střevní mikroflóra tvořena dominantně bakteriemi kmene *Actinobacteria* (včetně rodu *Bifidobacterium*), kmene *Proteobacteria*, rodu *Bacteroides*, méně pak kmene *Firmicutes* (zahrnující zástupce rodu *Lactobacillus*). Oproti tomu střevo novorozenců s porodní hmotností pod 1200g je velmi málo osídleno bakteriemi kmene *Actinobacteria* a naopak dominantně je osídleno bakteriemi kmene *Firmicutes* a *Tenericutes*. S novými poznatky o mikroflóře placenty je popisováno, že na počátečním osídlení střeva bakteriemi může mít velký vliv i délka gestace (AAGAARD *et al.* 2014).

Na utváření diversity, density a aktivity mikroflóry neonatálního střeva mají dále vliv vnitřní i vnější faktory. Vnitřní faktory zahrnují genotyp hostitele i celkovou zralost GIT. Mezi vnější faktory patří způsob porodu, způsob a druh výživy, užívání antibiotik, přítomnost bakterií v okolním prostředí (ZOETENDAL *et al.* 2001; PENDERS *et al.* 2006).

Mezi první kolonizátory střeva novorozence patří fakultativně anaerobní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* species), rodu *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Později dochází ke kolonizaci střeva obligátně anaerobními bakteriemi (PENDERS *et al.* 2006; MARQUES *et al.* 2010).

Bylo popsáno, že střevo novorozenců narozených vaginálním způsobem porodu je oproti porodu císařským řezem, který neumožňuje kontakt novorozence s rektovaginální flórou matky, dominantně osídleno bakteriemi rodu *Bifidobacterium* a daleko méně osídleno bakteriemi *Clostridium difficile* a *Escherichia coli*. Podobně bylo popsáno ovlivnění střevní mikroflóry novorozenců způsobem výživy. Oproti výživě mateřským mlékem byl při umělé výživě pozorován zvýšený počet bakterií *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* a zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. U jedinců krmených mateřským mlékem bylo zjištěno velké množství bakterií rodu *Bifidobacterium* (PENDERS *et al.* 2006; FAN *et al.* 2014).

Vývoj střevní mikroflóry předčasně narozených novorozenců je zatížen kritickým stavem těchto novorozenců a souvisejícími komplikacemi vyžadujícími dlouhodobou hospitalizaci na neonatálních jednotkách intenzivní péče. Vývoj je tak ovlivněn nemocničním prostředím, terapií antibiotiky, nutností parenterální výživy a častým používáním umělé výživy místo mateřského mléka. Výsledkem je abnormální složení střevní mikroflóry (intraluminální dysbióza mezi komensálními a potenciálně patogenními bakteriemi) v rané fázi života, během které se střevní mikroflóra utváří (MUDr. Kokešová osobní sdělení).

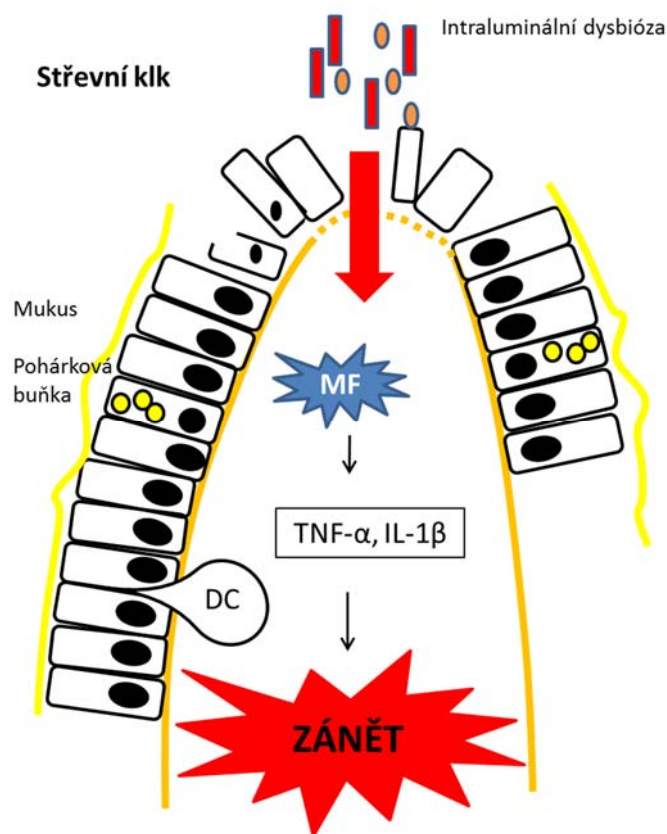
Je tak možné, že počáteční kolonizace potenciálně patogenními bakteriemi, malá diversity bakterií, následné přerůstání potenciálně patogenních bakterií spolu s nezralostí střevní bariéry a imunitního systému může vést k narušení střevní bariéry, k narušení obnovy

enterocytů, ke stimulaci nadměrné apoptózy epitelových buněk střeva a k aktivaci nekontrolovatelné střevní zánětlivé odpovědi a rozvoji NEC. Zdá se, že NEC není způsobená jednou bakterií, ale naopak celým komplexem změn ve složení střevní mikroflóry. Studium bakteriálních izolátů z krve a stolice novorozenců s NEC poukazuje na souvislost onemocnění a přítomnost bakterií *Escherichia coli*, *Klebsiella species* (zejména *Klebsiella pneumoniae*), *Clostridia species* (zejména *Clostridium difficile* a *perfringens*), *Staphylococcus species* a *Enterobacter species* (DE LA COCHETIERE *et al.* 2004; WANG *et al.* 2009; STEWART *et al.* 2012, 2013; BIZZARRO *et al.* 2014).

2.4.1.5 Současně akceptované modely onemocnění

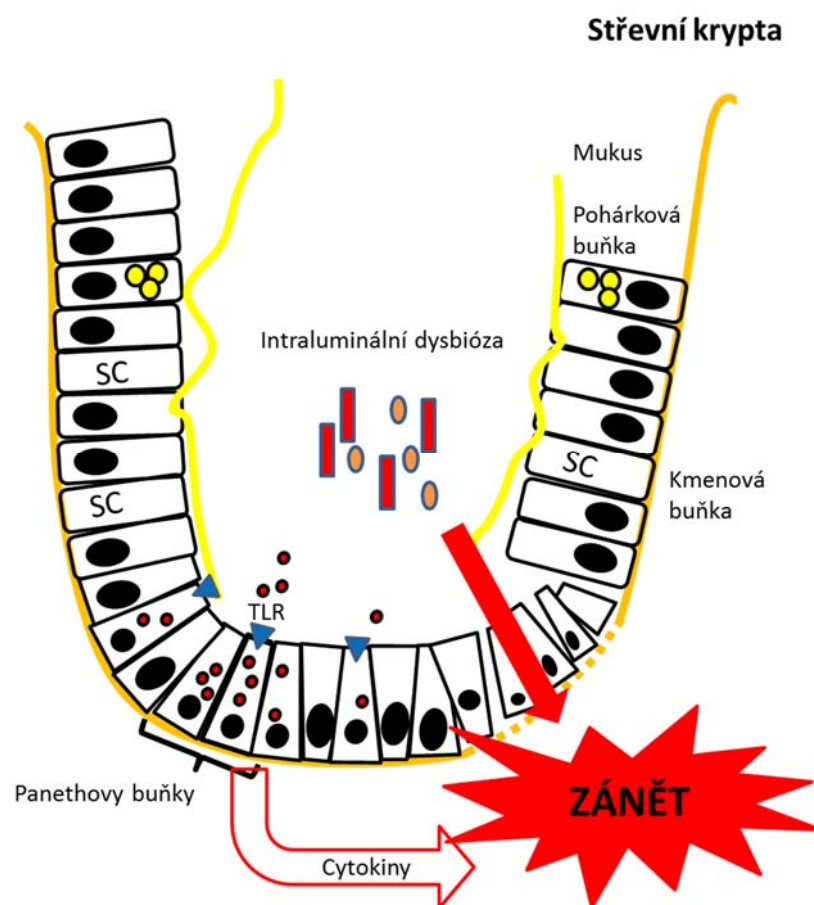
Současně jsou popisovány dva uznávané modely vzniku NEC. Původní model je označován jako tzv. Top down model (Obr. č. 10), novější model doplněný o roli Panethových buněk v patogenezi NEC jako tzv. Bottom up model (Obr. č. 11).

Top down model (Obr. č. 10) popisuje vznik onemocnění v oblasti vrcholku klku, kde intraluminální dysbióza bakterií zatěžuje nezralou střevní bariéru. Dochází k stimulaci receptorů přirozeného imunitního systému (PRRs) mikrobiálními MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Význačná role je zde připisována Toll-like receptoru 2 a 4 (TLR-2, TLR-4). Toto zatížení může vést k nadměrné apoptóze i nekróze epitelových buněk střeva. Nadměrným zatížením dochází k selhání střevní bariéry a průniku bakterií z lumen střeva. V lamina propria dochází ke spuštění silné zánětlivé odpovědi nezralým a nedokonale regulovaným imunitním systémem. Silná zánětlivá odpověď je zprostředkována uvolněním prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β (InterLeukin-1beta) a vede k dalšímu poškození střeva a koagulační nekróze klku – hlavního histologického nálezu NEC (LE MANDAT SCHULTZ *et al.* 2007; MCELROY *et al.* 2013; AFRAZI *et al.* 2014).



Obrázek č. 10: Top down model popisující patogenezi NEC v apikální části klku. Žlutě značen hlen, MF – makrofág, DC – dendritická buňka (převzato a upraveno z MCELROY *et al.* 2013).

Modernější pohled na patogenezi NEC, model Bottom up (Obr. č. 11), popisuje v centru patogeneze NEC Panethovy buňky. Zatěžování nezralé střevní bariéry intraluminální dysbiózou bakterií a stimulace PRRs Panethových buněk (např. TLR-4, TLR-5) mikrobiálními MAMPs vede k uvolňování granulí obsahujících antimikrobiální molekuly a prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β). Zatímco obsah granulí je uvolňován do lumen střeva, cytokiny jsou uvolňovány zejména bazolaterálně do lamina propria a přilehlých cév a stimulují zánětlivou odpověď. Zatížení nezralé střevní bariéry z lumenální strany intraluminální dysbiózou bakterií a zánětlivou odpovědí ze strany lamina propria, způsobí její selhání a umožní tak průnik bakterií z lumen střeva. Dochází k dalšímu zesílení zánětlivé odpovědi, která vede k dalšímu poškození střevní bariéry a tedy i k proniknutí dalších bakterií a koagulační nekróze střevní sliznice (ZHANG *et al.* 2012; MCELROY *et al.* 2013).



Obrázek č. 11: Bottom up model popisující patogenezi NEC v Lieberkühnově kryptě. Žlutě – hlen, TLR (Toll Like Reptor), SC (kmenová buňka, Stem Cell) (převzato a upraveno z MCELROY *et al.* 2013).

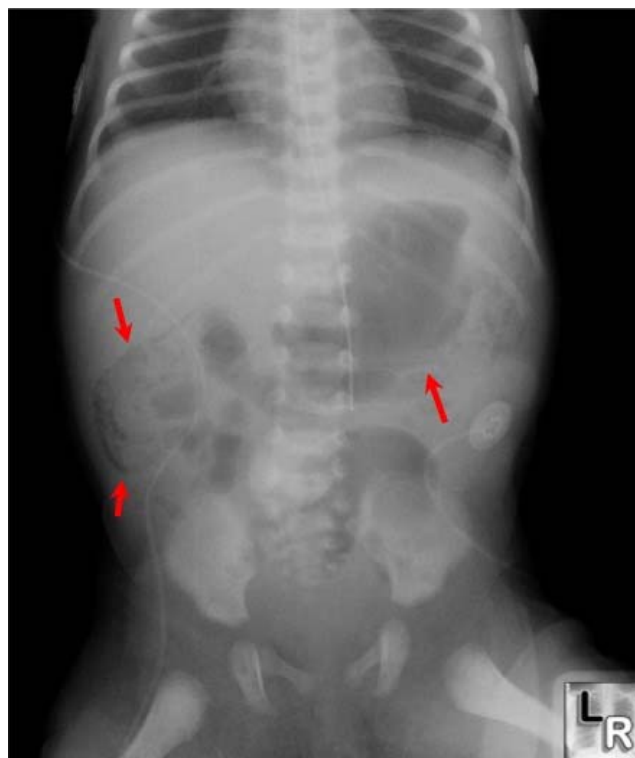
2.5 Diagnostika onemocnění

Onemocnění propuká náhle a má velmi rychlý průběh. Klinicky se onemocnění projevuje systémovými a abdominálními příznaky. Počáteční příznaky jsou značně nespecifické, a proto je onemocnění snadno zaměnitelné za jiné poruchy GIT či novorozeneckou sepsi. Mezi nejčastější počáteční příznaky patří intolerance potravy a retence (zadržování) žaludečního obsahu.

První diagnostická kritéria onemocnění byla zavedena v roce 1978, podle svého autora se nazývají Bellova kritéria. Tato kritéria zohledňovala pouze klinické a radiografické nálezy u novorozenců. Kritéria doplněná o laboratorní nálezy, která přispívají k přesnější diagnóze NEC, zavedli v roce 1986 Walsh a Kliegman. V současné době byla do diagnózy

onemocnění zavedena i ultrasonografie, která dále upřesňuje diagnózu NEC zejména v případech nejasného radiologického nálezu či přetrvávající přítomnosti nespecifických příznaků. Základní diagnostická kritéria dělí onemocnění na tři stádia: 1. podezření na NEC (jedinci jsou vyšetřováni pro podezření na NEC a pro vyloučení ostatních neonatálních poruch), 2. prokázaná NEC (potvrzení onemocnění klinickým i radiologickým vyšetřením, jsou vyloučeny ostatní poruchy GIT (př. volvulus, Hirschprungova nemoc)) a 3. klinicky pokročilá NEC (je přítomna nekróza sliznice, zánět pobřišnice a septický šok) (BELL *et al.* 1978; WALSH a KLIEGMAN 1986).

I přes značný pokrok v diagnostických metodách je dnes časná a přesná diagnóza NEC problematická. Diagnóza NEC se současně opírá o kombinaci tří hlavních faktorů - přítomnosti klinických příznaků: abdominální distenze, přítomnost krve ve stolici a radiologickém nálezu *pneumatisis intestini* (Obr. č. 12). Problematika diferenciální diagnostiky dále stěžuje tento problém, kdy záměna NEC za novorozeneckou sepsi či jiné onemocnění s nespecifickými klinickými příznaky a symptomy má za následek vzestup morbidity a mortality u této populace (MUDr. Kokešová osobní sdělení).



Obrázek č. 12: Radiologický snímek vyšetření novorozence s NEC. Červené šipky značí *pneumatisis intestini* (ložiska plynu ve stěně střešní vzniklé fermentací substrátu bakteriemi, které pronikly střešní bariérou) (převzato z <http://www.learningradiology.com/archives05/COW%20156-NEC/neccorrect.htm>).

Pro diagnózu sepse je v současnosti zavedena izolace patogenu z hemokultury. Problémem v tomto případě je časová prodleva způsobená čekáním na výsledek kultivace.

Z výše uvedeného vyplývá problematika volby optimálního léčebného postupu bez časné a správné diagnózy onemocnění. Pro opožděný projev specifických příznaků a rychlý nástup onemocnění je identifikace potenciálního biomarkeru specifického pro časnou diagnostiku NEC jediná možnost pro zahájení správné terapie. Tedy v okamžiku, kdy je ještě možnost léčby konzervativním způsobem (vysazení perorální výživy, zavedení parenterální výživy a hydratace, léčba antibiotiky a podpora životních funkcí) aniž by bylo nutné provést chirurgický zákrok (při hrozící nebo již proběhlé perforaci střeva), jako je tomu často v případě pozdní diagnózy NEC.

Vzhledem ke stavu novorozenců a k závažnosti onemocnění by ideální ukazatel (biomarker) měl být ohledně získání vzorku co nejméně invazivní, snadno získatelný a detekovatelný za co nejmenších finančních nákladů, aby vyšetření mohlo být zavedeno do standardní laboratorní praxe.

2.5.1 Ukazatele onemocnění

Studované či používané ukazatele NEC můžeme rozlišit na nespecifické (cytokiny, proteiny akutní fáze) a specifické (ukazatele poškození střevního epitelu - protein vázající mastné kyseliny ve střevě, ukazatel apoptózy epitelových buněk – kaspázami štěpená forma cytokeratinu 18).

2.5.1.1 Nespecifické ukazatele

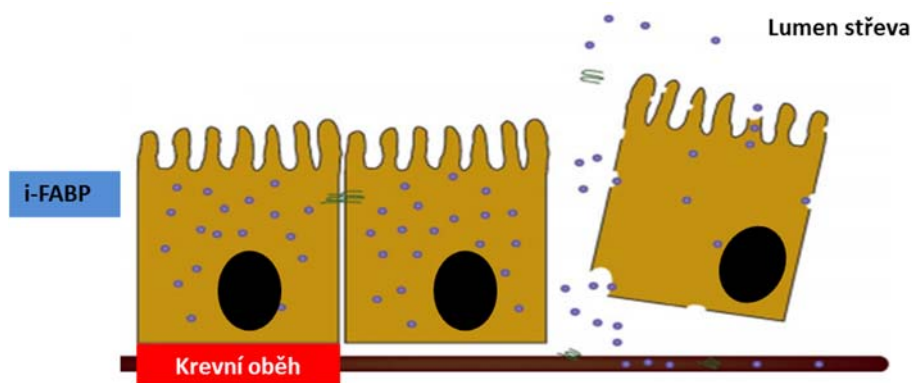
Velmi užívaným ukazatelem bakteriální infekce je protein akutní fáze, C-reaktivní protein (CRP). Byla prokázána vysoká hodnota CRP u novorozenců s prokázanou a pokročilou NEC. Stálá přítomnost vysokých hodnot po zahájení léčebné terapie značí rozvoj komplikací. Není možné odlišit zvýšení CRP způsobené NEC či sepsí (POURCYROUS *et al.* 2005).

Cytokiny mají význačnou úlohu nejen v regulaci imunitního odpovědi, ale také v apoptóze, angiogenezi, buněčném růstu a buněčné diferenciaci. Ačkoliv byly popsány cytokiny související s NEC, zánětlivá odpověď u novorozenců se sepsí či NEC je stále nedostatečně popsána. Doposud byly v souvislosti s NEC popsány následující cytokiny: faktor nekrotizující tumory- α (TNF- α) a interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) (CAPLAN *et al.* 1990; EDELSON *et al.* 1999; HARRIS *et al.* 2005; SHARMA *et al.* 2007). Studium koncentrací cytokinů v počátku klinických obtíží NEC a v průběhu terapie, byl zjištěn jejich možný diagnostický potenciál i potenciál v určení závažnosti onemocnění (NG *et al.* 2003; BENKOE *et al.* 2013).

2.5.1.2 Specifické ukazatele

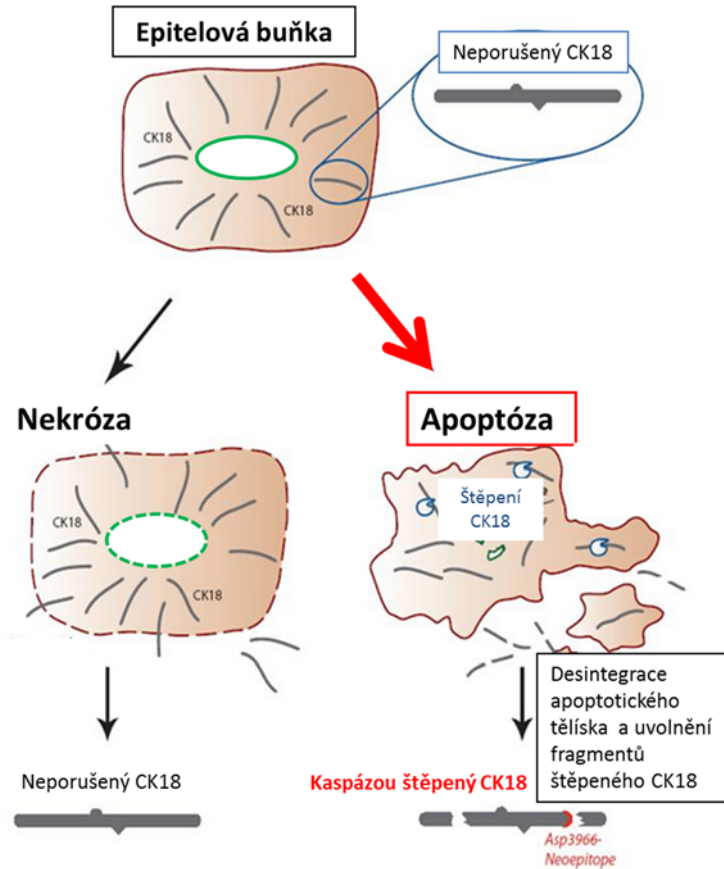
Proteiny skupiny Fatty Acid Binding Protein (FABP) jsou tkáňově specifické a nacházejí se v cytosolu buněk tkání, které jsou velmi aktivní v metabolismu dlouhých řetězců mastných kyselin. Pro buňky střevního epitelu tenkého střeva byla popsána specifická forma intestinal-FABP (i-FABP) (OCKNER *et al.* 1972; OCKNER a MANNING 1974).

i-FABP je malý protein (molekulová hmotnost 14-15 kDa) lokalizovaný v cytosolu zralých epitelových buněk střeva, kde tvoří asi 2 % jejich proteinového obsahu. V průběhu 90. let 20. století byl i-FABP popsán jako možný diagnostický ukazatel poškození střevního epitelu. Za fyziologických podmínek je i-FABP v séru detekovatelný pouze ve velmi malém množství. V případě akutní střevní ischemie a akutního střevního zánětu je i-FABP rychle uvolňován z nekrotických buněk do krevního oběhu (Obr. č. 13), kde se jeho koncentrace rychle zvyšuje (GOLLIN a MARKS 1993; KANDA *et al.* 1996). Z krevního oběhu se díky své malé molekulové hmotnosti dostává glomerulární filtrací do moči (frakční renální exkrece 28 %, poločas 11 minut). i-FABP není tvořen v epitelových buňkách sliznice močových cest a tak zjištěné hodnoty koncentrace i-FABP v moči poskytují specifickou informaci o rozsahu poškození střevního epitelu. Současné studie poukazují na význam i-FABP v diagnostice NEC a to i v její rané fázi (DERIKX *et al.* 2007; EVENNETT *et al.* 2010; MANNOIA *et al.* 2011).



Obrázek č. 13: Uvolnění i-FABP z poškozených buněk střevního epitelu tenkého střeva. Modře značeno i-FABP, zeleně těsné spoje (převzato a upraveno z DERIKX *et al.* 2010).

Cytokeratin 18 (CK18) je intracelulární protein epitelových buněk. Štěpená forma CK18, která vzniká činností aktivovaných kaspáz během apoptózy, představuje fragment CK18 obsahující specifický neoepitop. Tento fragment je v literatuře označován jako kaspázami štěpený CK18 (caspase cleaved CK18, ccCK18) (Obr. č. 14). Kaspázami štěpená forma CK18 uvolněná do krevního oběhu je popisována jako ukazatel apoptotické smrti epitelových buněk (LEERS *et al.* 1999; HÄGG *et al.* 2002). Porovnáním hladin kaspázami štěpené formy CK18 a celkového uvolněného CK18 (štěpená i neštěpená forma) lze pak určit typ převládající buněčné smrti (apoptóza – nekróza). Současné studie popisují CK18 jako možný ukazatel pro sledování účinnosti nádorových terapií u pacientů léčených pro karcinom tlustého střeva, prsu či prostaty (KRAMER *et al.* 2006; OLOFSSON *et al.* 2007; AUSCH *et al.* 2009). CK18 je také popisován jako možný ukazatel chronické hepatitidy C (BANTEL *et al.* 2004). V souvislosti s NEC nebyl význam CK18 doposud popsán.



Obrázek č. 14: Štěpení CK18 aktivovanými kaspázami během apoptotické buněčné smrti (červeně). Oproti tomu kaspázami neporušený CK18 je uvolňován při nekrotické smrti buňky (černě) (převzato a upraveno z <http://www.peviva.com/m30-apoptosense-elisa.aspx>).

3 Cíle práce

- Prvním cílem diplomové práce je zlepšit porozumění zatím stále nedostatečně popsané zánětlivé odpovědi novorozence při onemocnění NEC.
- Druhým cílem je testovat hypotézu, že nadměrná apoptóza epitelových buněk střeva je počáteční příčinou poškození střevního epitelu při onemocnění NEC.
- Třetím cílem je testovat diagnostický a screeningový potenciál proteinu i-FABP pro NEC.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Definice studované populace

Sledovaným souborem byli novorozenci s VVV GIT, jejichž stav byl komplikován sepsí nebo NEC, novorozenci se sepsí nebo NEC bez VVV GIT a novorozenci s VVV GIT bez komplikací sepsí nebo NEC. Studie se zúčastnili novorozenci, kteří byli přijati na jednotku intenzivní péče pro novorozence Kliniky dětské chirurgie Fakultní nemocnice Motol (KDCH FN Motol) od dubna 2012 do dubna 2014 a splňovali vstupní kritéria pro zařazení do studie (viz níže). Kontrolní skupinou jsou zdraví novorozenci obdobného gestačního stáří a porodní hmotnosti.

4.1.1.1 Vstupní kritéria

Do studie byli zařazeni novorozenci s diagnostikovanou VVV GIT gastroschíza, omfalokéla, volvulus, atrezie jícnu, atrezie střeva a atrezie konečníku a rekta (viz kap. 2.3).

Novorozenci s podezřením na sepsi byli do studie zařazeni při splnění dvou a více parametrů z níže uvedeného klinického vyšetření plus dvou a více parametrů hematologického vyšetření (Tab. č. 2 a 3).

Klinické vyšetření	
Kardiovaskulární systém	Tachykardie (srdeční akce nad 170/min. déle než 6 hodin, která není způsobená podávanými léky) Bradykardie (srdeční akce pod 100/min., která není způsobená podávanými léky) Hypotenze (střední arteriální tlak nižší než norma pro daný gestační věk) Pallor (bledost)

Metabolismus	<p>Teplotní instabilita (tělesná teplota nad 37,8° C nebo pod 36,2°C po dobu delší než 6 hodin při pobytu novorozence v termoneutrálním prostředí)</p> <p>Hypoglykémie (pod 2,22 mmol/l bez souvislosti s perinatálním distresem, intrauterinní růstovou retardací či diabetem matky)</p> <p>Hyperglykémie (nad 11,1 mmol/l bez souvislosti s podáním kortikoidů)</p> <p>Metabolická acidóza</p> <p>Intolerance stravy</p>
Respirační systém	<p>Apnoe (bezdeší) - u donošeného dítěte trvající déle než 20s - u nedonošeného dítěte (pod 37. týdnem gestačního věku) vzestup frekvence apnoe 3x a více během 12-ti hodin</p> <p>Nový nástup nebo akutní zhoršení respiračního distresu - u spontánně ventilujícího dítěte: grunting, retrakce, hypoxémie (saturace O₂ pod 90 % při FiO₂ 21 %), tachypnoe (dechová frekvence nad 70/min. v klidu)</p> <p>- u ventilovaného dítěte: zvýšení středního tlaku v dýchacích cestách o 2 cmH₂O kvůli dosažení saturace O₂ nad 90 % nebo parciální O₂ nad 50 torr, tachypnoe (nad 70/min. v klidu)</p>
Neurologické příznaky	<p>Letargie</p> <p>Hypotonie</p> <p>Snížená spontánní aktivita</p>

Tabulka č. 2: Vstupní kritéria pro sepsi – klinické vyšetření.

Vysvětlení pojmů: tachykardie (zrychlení srdeční frekvence), bradykardie (zpomalení srdeční frekvence), hypotenze (pokles tlaku arteriální krve), pallor (bledost), hypoglykémie (nízká hladina glukózy v krvi), hyperglykémie (vysoká hladina glukózy v krvi), metabolická acidóza (pokles koncentrace hydrogenuhličitanů pod referenční hodnoty), grunting (patologický poslechový nálezn – tzv. naříkavý nádech), retrakce (zatahování, zde např. zatahování jugula a nadklíčkových jamek – využití pomocných dýchacích svalů k dýchání), hypoxémie (snížená koncentrace O₂ v krvi), tachypnoe (zvýšená dechová frekvence), letargie (netečnost, chorobná spavost), hypotonie (patologicky snížený svalový tonus, svalová slabost).

Hematologické vyšetření	
Počet leukocytů	Leukopenie (pod 5 000/mm ³)
	Leukocytóza (nad 34 000/mm ³)
Počet neutrofilů	Neutropenie (pod 7 500/mm ³)
	Neutrofilie (nad 14 500/mm ³)
I/T	Pod 0,2
Počet trombocytů	Trombocytopenie (pod 100-150 000/mm ³)

Tabulka č. 3: Vstupní kritéria pro sepsi – hematologické vyšetření.

Vysvětlení pojmů: leukopenie (pokles počtu leukocytů), leukocytóza (zvýšení počtu leukocytů), neutropenie (pokles počtu neutrofilních granulocytů), neutrofilie (zmnožení počtu neutrofilních granulocytů), I/T (poměr nezralých neutrofilů (I) k celkovému počtu neutrofilů (T), trombocytopenie (snížení počtu krevních destiček)).

Novorozenci s podezřením na NEC byli do studie zařazeni při splnění alespoň jednoho následujícího parametru ze skupiny klinického stavu, klinického vyšetření a rentgenového (RTG) vyšetření (Tab. č. 4).

Klinický stav	<p>Intolerance stravy definovaná jako zvracení dvou a více dávek mléka za 24 hodin nebo jakékoliv zvracení obsahující žluč, přítomnost reziduí v žaludku o objemu větším než 6 ml/kg nebo jakékoliv reziduum obsahující žluč</p> <p>Epizody apnoe/bradykardie</p> <p>Epizody desaturace, která není jinak vysvětlená</p> <p>Krev ve stolici</p>
Klinické vyšetření	<p>Distenze břicha</p> <p>CRT nad 2s</p> <p>Změny zbarvení stěny břišní</p> <p>Špatná prohmatnost stěny břišní</p>

Výsledky RTG vyšetření	<i>Pneumatosis intestini</i> Plyn v portální žíle Ileus Distenze střeva Pneumoperitoneum Hladinky vzduch/tekutina Rozšíření střevní stěny Ascites nebo volná tekutina intraperitoneálně Abnormální plynatost střeva
------------------------	---

Tabulka č. 4: Vstupní kritéria pro NEC.

Vysvětlení pojmů: distenze (roztažení), CRT (test kapilárního návratu), ileus (neprůchodnost střev), pneumoperitoneum (volný vzduch intraperitoneálně), hladinky vzduch/tekutina (RTG známky neprůchodnosti střeva), ascites (vodnatelnost, nadměrné množství tekutiny v pobřišniční dutině).

Základní klinické parametry studované populace jsou shrnuty níže (Tab. č. 5).

	NEC	Sepse	VVV GIT		Kontrola
			gastroschíza	omfalokéla	
Zařazení do studie	15	15	14	4	7
Vyřazení	1	2	3	0	0
Celkový počet	14	13	11	4	7
Muž/žena (%)	57	53	64	50	71
Gestační věk	35	35	35	37	37
Porodní hmotnost	2,38	2,5	2,4	2,6	3,1
Porod císařským řezem (%)	71	45	36	0	42

Tabulka č. 5: Základní klinické parametry studované populace.

4.1.2 Odběr materiálu

Odběru materiálu předcházela podpis informovaného souhlasu rodičů. Odběr materiálu a jeho počáteční zpracování proběhl na KDCH FN Motol. Byl proveden odběr srážlivé krve, moči a střevního obsahu. Vyšetření odebraného materiálu proběhlo v laboratoři Buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Praze, v.v.i. (MBÚ AV ČR, v.v.i.), kam byl odebraný materiál při řádném skladování transportován. Všechny zamražené vzorky byly řádně skladovány až do příslušného vyšetření.

Vzorek krve (1,5 ml) byl odebrán v okamžiku splnění diagnostických kritérií sepse/NEC (dále značeno jako S1) a v den ukončení léčebné terapie antibiotiky (ATB) (dále značeno jako S2). Pro odběr krve byly použity zkumavky bez protisrážlivých látek. Zkumavky byly označeny kódem novorozence a časem odběru. Po sražení krve, bylo v laboratoři FN Motol odstředěním při 1500xg, 15 min., 4°C odděleno sérum. Sérum bylo přeneseno do nových mikrozkuvek se shodným označením a zamraženo při -20°C. Sérum bylo vyšetřeno na cytokinové spektrum, CK18 a i-FABP.

Odběr moči byl započat po splnění výše uvedených kritérií. Byl odebrán: reprezentativní vzorek z každého 6-ti hodinového sběru v období od narození do operačního výkonu nebo prvních 48 hodin života; reprezentativní vzorek z každého 6-ti hodinového sběru získaného po návratu z operačního sálu po dobu 48 hodin po operačním výkonu; reprezentativní vzorek z každého 6-ti hodinového sběru získaného po dobu 48 hodin a sice: a) od splnění klinických kritérií pro sepsi/NEC, b) po operačním řešení NEC a c) reprezentativní vzorek ze 6-ti hodinového sběru v den ukončení ATB terapie NEC. Moč byla sbírána pomocí gázových tampónů umístěných v plenkách tak, aby se zabránilo případné kontaminaci stolicí. Poté byla moč z tampónu vymačkána pomocí injekční stříkačky do sběrné zkumavky označené kódem pacienta, datem a číslem označujícím pořadí ze 6-ti hodinového sběru. V pořadí 4. a 8. byl odebraný vzorek (tedy 1x za 24 hodin) vyšetřen na kreatinin v moči. Toto vyšetření proběhlo v laboratoři FN Motol. Vzorky moči byly zamrazeny na -20°C. Moč byla vyšetřena na i-FABP.

4.2 Metody

Ve zkoumaných vzorcích byla zjišťována zánětlivá odpověď (sérum), míra apoptózy epitelových buněk (sérum), míra poškození střevního epitelu (sérum, moč). Jako laboratorní metoda byla zvolena imunoanalýza ve formě protilátkového mikročipu a Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

Důvodem volby metody protilátkových mikročipů je možnost detekce více analytů (cytokinů) v jednom vzorku séra najednou. To umožňuje současně nízkou spotřebu vzorku materiálu a zároveň vysoký informační zisk. V porovnání s klasickou metodou ELISA, zaměřenou pouze na jeden analyt, představuje toto vyšetření i časovou úsporu. Metoda se proto jeví jako výhodná pro možnost rychlého zpracování vzorků při hledání nových ukazatelů i pro časnou diagnostiku NEC za použití malého množství séra. Metoda ELISA je velmi rozšířenou detekční metodou užívanou v mnoha nemocničních laboratořích. Důvodem k výběru této metody je možnost zjišťovat i-FABP nejen ve vzorcích séra, ale také ve vzorcích moči, jako nejsnáze a neinvazivně získaného biologického materiálu novorozenců. Výhody této metody jsou: dostatečná citlivost, specifická a reprodukovatelnost. Metoda představuje možnost detekce příslušných analytů v různých vzorcích (sérum i moč) v poměrně krátkém čase. Tyto faktory podporují možné využití této metody pro časnou diagnostiku NEC v laboratorní praxi příslušných pracovišť. Zavedení tohoto postupu na pracovištích, která jsou přístrojově vybavena na zpracování vzorků metodou ELISA, není spojeno s nutností dalších finančních nákladů v souvislosti s pořízováním nových přístrojů či školení pracovníků.

4.2.1 Kvantitativní protilátkový mikročip pro stanovení cytokinů

Kvantifikace cytokinů v séru byla provedena pomocí metody kvantitativního protilátkového mikročipu (Obr. č. 15). Podstata této metody je založena na principu sendvičové imunoanalýzy. Byla použita komerční souprava Quantibody® Human Inflammation array 3 firmy RayBiotech (USA). Metoda umožňuje stanovení koncentrace 40 cytokinů (Tab. č. 6) z jednoho vzorku séra o objemu 50-100 μ l. Souprava je certifikována pro detekci cytokinů v séru. Limit detekce (LOD) vypočítává program Q-Analyzer v8.20.4 (Raybiotech, USA), poskytnutý výrobcem, pro každý experiment zvlášť

v závislosti na expozici čipu. LOD, v našem případě pro 2 experimenty, je znázorněn vždy u příslušného cytokinu v Tab. č. 6.

Přehled vyšetřovaných cytokinů					
LOD 1	LOD 2	LOD 1	LOD 2	LOD 1	LOD 2
(pg/ml)					
BLC		-			
0,0	0,6				
Eotaxin-1		Eotaxin-2		G-CSF	
7,3	5,2	2,4	0,0	0,0	4,2
GM-CSF		I-309		ICAM-1	
0,0	8,7	0,0	0,0	0,3	0,1
IFN-γ		IL-1α		IL-1β	
28,8	1,6	3,6	46,6	0,0	3,9
IL-1ra		IL-2		IL-4	
1,3	197,6	334,1	88,1	11,5	56,6
IL-5		IL-6		IL-6sR	
106,7	9,1	0,0	2,8	1,3	5,3
IL-7		IL-8		IL-10	
39,2	38,6	0,5	99,1	0,0	77,1
IL-11		IL-12p40		IL-12p70	
0,0	6,1	399,4	442,4	1,5	0,0
IL-13		IL-15		IL-16	
0,0	70,5	105,0	254,6	0,0	14,9
IL-17		MCP-1		M-CSF	
0,0	12,0	2,2	46,7	1,6	259,9
MIG		MIP-1α		MIP-1β	
182,1	23,3	966,4	0,0	6,2	0,1
MIP-1δ		PDGF-BB		RANTES	
0,0	3,1	2,0	0,3	0,2	75,5
TIMP-1		TIMP-2		TNF-α	
0,0	0,0	0,0	0,9	5,2	64,5
TNF-β		sTNFR I		sTNFR II	
3,0	68,6	0,1	0,4	0,0	0,0

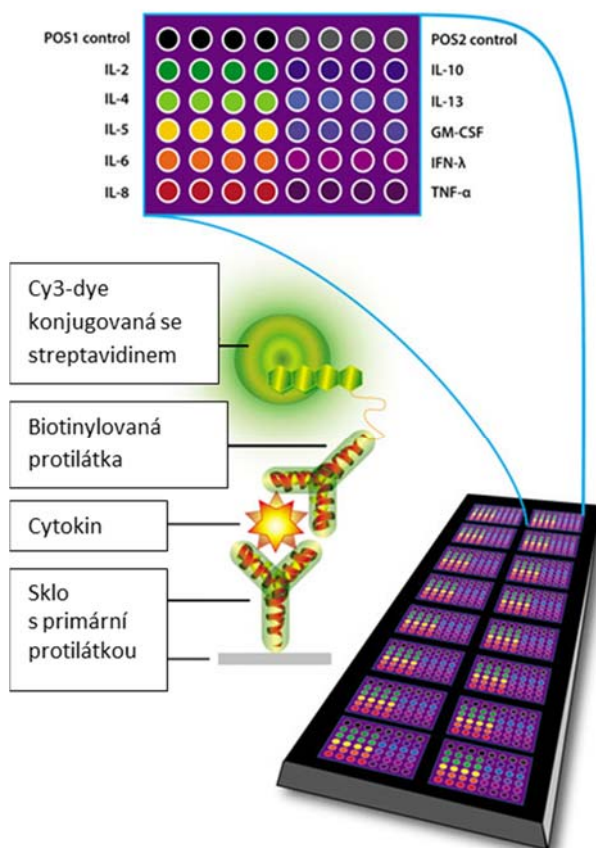
Tabulka č. 6: Přehled cytokinů zjištěných metodou protilátkového mikročipu Quantibody® Human Inflammation array 3 firmy RayBiotech (USA) (převzato a upraveno z <http://www.raybiotech.com/q-analyzer-software-for-qah-inf-3.html>)

Vysvětlení zkratk: BLC (B-Lymphocyte Chemoattractant), GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), IFN (InterFeroN), IL (InterLeukin), IL-1ra (InterLeukin – 1 receptor antagonist), MIG (Monokine Induced by Gamma - interferon), MIP (Macrophage Inflammatory Protein), TIMP (Tissue Inhibitor of MettalloProteinases), TNF (Tumor Necrosis Factor), I-309 dle nové nomenklatury CCL1 (Chemokine (C-C motif) Ligand 1)), MCP (Monocyte Chemoattractant Protein), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), sTNFR (soluble Tumor Necrosis Factor Receptor), G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor), ICAM (IntraCellular Adhesion Molecule), IL-6sR (InterLeukin – 6 soluble Receptor), M-CSF (Monocyte - Colony Stimulating Factor), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted)

Metoda byla provedena dle pokynů výrobce. Použité roztoky jsou součástí soupravy. Pokud není popsáno jinak, inkubace probíhaly při pokojové teplotě.

Zjednodušený popis postupu: před vyhotovením metody byly všechny chemikálie zahřáty na pokojovou teplotu. Mikročip s již nanesenými protilátkami proti jednotlivým cytokinům je umístěn v plastovém držáku, který rozděluje mikročip do 16-ti reakčních jamek. Před nanesením vzorků byly nespecifické vazby v reakčních jamkách zablokovány 30-ti minutovou inkubací s blokačním pufrem. Po odstranění pufru byly do jamek přidány vzorky a inkubovány 24 hodin při 4°C. Po promytí byla do reakčních jamek přidána biotinylovaná detekční protilátka (sekundární protilátka s navázaným biotinem). Po 1-2 hodinové inkubaci byla do promytých reakčních jamek přidána Cy3 dye (cyaninové barvivo) s navázaným streptavidinem. Takto byl mikročip inkubován 1 hodinu pod krycí folií. Po promytí byl plastový držák mikročipu odstraněn a skleněné dno bylo umístěno do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla naplněna promývacím roztokem, tak aby bylo sklo stále ponořeno. Pro důkladné promytí byla zkumavka se sklem ponechána na kývačce WS-10 (Edmund Bühler, Německo) 15 minut. Po odstranění promývacího roztoku bylo sklo odstředěním v centrifuze Universal 32R (Hettichlab, Německo) při 100xg, 3 min., pokojové teplotě, zbaveno kapek a nečistot. Odstranění všech nečistot je nezbytným krokem pro správné vyhodnocení detekovaných cytokinů (viz níže).

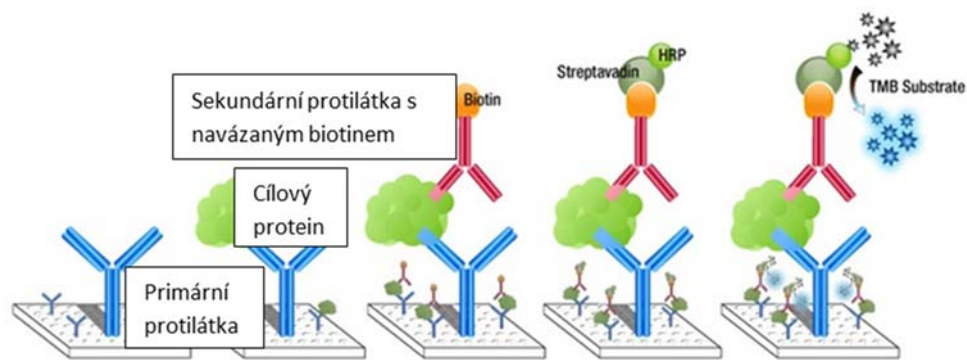
Fluorescence byla změřena v přístroji GeneTAC UC4 Microarray Scanner (Genomic Solutions, Velká Británie) pomocí programu GAT UC (verze 3.11, Genomic Solutions, Velká Británie). Koncentrace jednotlivých cytokinů byla kvantifikována porovnáním s ředící řadou příslušného standardu. Analýza obrazu byla provedena v programu AIDA Image Analyzer (verze 4.38, Raytest, Německo), kvantifikace byla provedena v programu Excel (verze MS Office 2010, Microsoft, USA) za použití tabulky poskytnuté výrobcem a získaná data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism (verze 6.0, GraphPad Software, USA). Výsledné hodnoty jsou uváděny v pg/ml.



Obrázek č. 15: Zjednodušený princip metody protilátkového mikročipu firmy RayBiotech (USA) – znázorněn typ soupravy s menším počtem detekovaných cytokinů (převzato a upraveno z <http://www.raybiotech.com/images/Quantibody-slide.gif>).

4.2.2 Enzymatická imunoanalýza pro stanovení koncentrace cytokeratinu 18 (CK18)

Kvantifikace proteinu CK18 byla v séru provedena pomocí metody ELISA. Byly použity komerční soupravy firmy Peviva (Švédsko). Souprava M65[®] ELISA, která umožňuje vyšetření štěpené i neštěpené formy CK18 a M30 Apoptosense[®] umožňující vyšetření kaspázami štěpené formy CK18 (fragment obsahující K18Asp396 neo-epitop). Podstata metody těchto souprav je princip sendvičové enzymatické imunoanalýzy (Obr. č 16). Detekční rozsah metody uvedený výrobcem je 0-2000 U/L pro M65[®] ELISA a 0-1000 U/L pro M30 Apoptosense[®], 1U/L = 1,24 pM.



Obrázek č. 16: Zjednodušené schéma principu metody sendvičové enzymatické imunoanalýzy (převzato a upraveno z <http://www.epitomics.com/products/products/c-Jun-antibody-6111-1.html>).

Vysvětlení zkratk: HRP (HorseRadish Peroxidase), TMB (3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidin).

Metoda byla provedena dle pokynů výrobce. Použité roztoky jsou součástí soupravy. Inkubace probíhaly při pokojové teplotě.

Zjednodušený popis postupu: před vyhotovením metody byly všechny chemikálie zahřáty na pokojovou teplotu. Vzorky byly nanесeny ve dvojicích do reakčních jamek 96-ti jamkové desky s již nanесenou primární protilátkou (od výrobce). Ke vzorkům byl přidán roztok konjugátu sekundární protilátky M65 nebo M30 a křenové peroxidázy (HorseRadish Peroxidase, HRP) (dle používané soupravy). ELISA deska byla po dobu 2 (M65® ELISA) nebo 4 (M30 Apoptosense®) hodin inkubována na stolní třepačce při 600 otáčkách/minutu. Reakční jamky byly promyty a do jamek byl přidán 3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidin (TMB). ELISA deska byla po dobu 20 minut inkubována pod krycí folií. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním kyseliny citronové.

Optická densita byla změřena ve spektrofotometru Multiskan Ascent 96/384 (MTX Lab System, USA) pomocí programu Ascent (verze 2.4.1, Thermo Scientific, USA) při vlnové délce 450nm a 650nm (pro odstranění výrobních vad reakčních jamek). Koncentrace CK18 byla kvantifikována porovnáním s ředící řadou příslušného standardu.

Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Excel (verze MS Office 2010, Microsoft, USA) a získaná data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism (verze 6.0, GraphPad Software, USA). Výsledné hodnoty CK18 v séru jsou uváděny v pg/ml.

4.2.3 Enzymatická imunoanalýza pro stanovení koncentrace proteinu i-FABP

Kvantifikace proteinu i-FABP byla v séru i moči provedena pomocí metody ELISA. Byla použita komerční ELISA souprava Human i-FABP HK-406-02 firmy Hycult® Biotech (Nizozemí), která selektivně detekuje lidský i-FABP. Podstata metody této soupravy je rovněž založena na principu sendvičové enzymatické imunoanalýzy (Obr. č. 16). Výrobce uvedené detekční rozsah metody je 47-3000 pg/ml. Souprava je certifikována pro detekci i-FABP v plasmě, séru i moči.

Metoda byla provedena dle pokynů výrobce. Použité roztoky jsou součástí soupravy. Inkubace probíhaly při pokojové teplotě.

Zjednodušený popis postupu: před vyhotovením metody byly všechny chemikálie zahřáty na pokojovou teplotu. Před vyšetřením moči byly vzorky, pro odstranění sedimentu, odstředěny při 1500xg, 15 min., 4°C. Vzorky séra i moči byly před vyšetřením 5 krát ředěny a nanášeny ve dvojicích do reakčních jamek 96-ti jamkové desky s již nanášenou primární protilátkou (od výrobce). Po 1 hodinové inkubaci byly jamky promyty promývacím roztokem. Do jamek byla přidána sekundární protilátka s navázaným biotinem. Po 1 hodinové inkubaci byly jamky znovu promyty a do jamek byla přidána křenová peroxidáza s navázaným streptavidinem. Deska byla inkubována 1 hodinu, následně promyta a do reakčních jamek bylo přidáno TMB. ELISA deska byla inkubována s TMB pod krycí folií po dobu 30-ti minut. Reakce byla zastavena přidáním kyseliny citronové.

Optická densita byla změřena do 20 minut od zastavení reakce stejným způsobem, jako v případě výše popsaného vyšetření CK18. Koncentrace i-FABP byla kvantifikována porovnáním s ředící řadou příslušného standardu.

Vyhodnocení dat bylo provedeno stejným způsobem, jako v případě výše popsaného vyšetření CK18.

Výsledné hodnoty i-FABP v moči jsou pro odstranění rozdílů v koncentraci moči vyjádřeny jako poměr i-FABP a kreatininu (Cr). Kreatinin v moči byl stanoven v laboratoři FN Motol (viz výše). Poměr i-FABP:Cr je vypočítán pro každý vzorek. Výsledné hodnoty moči jsou uváděné v pg/ml i-FABP na nmol Cr. Výsledné hodnoty i-FABP v séru nejsou normalizované ke kreatininu a jsou uváděné jako pg/ml.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

Výsledné hodnoty byly statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism (verze 6.0, GraphPad Software, USA). Pro testování normality rozložení hodnot byl použit Shapiro-Wilcoxon test normality. V závislosti splnění požadavku na normální rozložení byly hodnoty dále hodnoceny parametrickými (t-test) či neparametrickými testy (Wilcoxon test pro párová pozorování, Mann–Whitney test pro nepárová pozorování). Pro porovnání hodnot více skupin novorozenců byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (one way ANOVA), Kruskal-Wallis test doplněný o Dunn's multiple comparisons test. Pro hodnocení více parametrů byla použita analýza rozptylu dvojného třídění (two way ANOVA) doplněná o Bonferroniho korekci.

5 Výsledky

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá významem střevní bariéry a střevní mikroflóry při zánětlivých i autoimunitních onemocněních ve zvířecích modelech lidských onemocnění (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.* 1998; KOKESOVA *et al.* 2006; KVERKA *et al.* 2011; ZAKOSTELSKA *et al.* 2011; KLIMESOVA *et al.* 2013). Tato diplomová práce navazuje na specializaci laboratoře a je zaměřena na význam bariérové funkce střeva v patogenezi NEC. Vycházíme z hypotézy, že porucha bariérové funkce střeva je významným faktorem při rozvoji NEC. Na základě této hypotézy hledáme biologické ukazatele, které by umožnily včas toto život ohrožující onemocnění, představující závažný diagnosticko-terapeutický problém, rozpoznat a léčit.

5.1 Vyšetření krevních vzorků

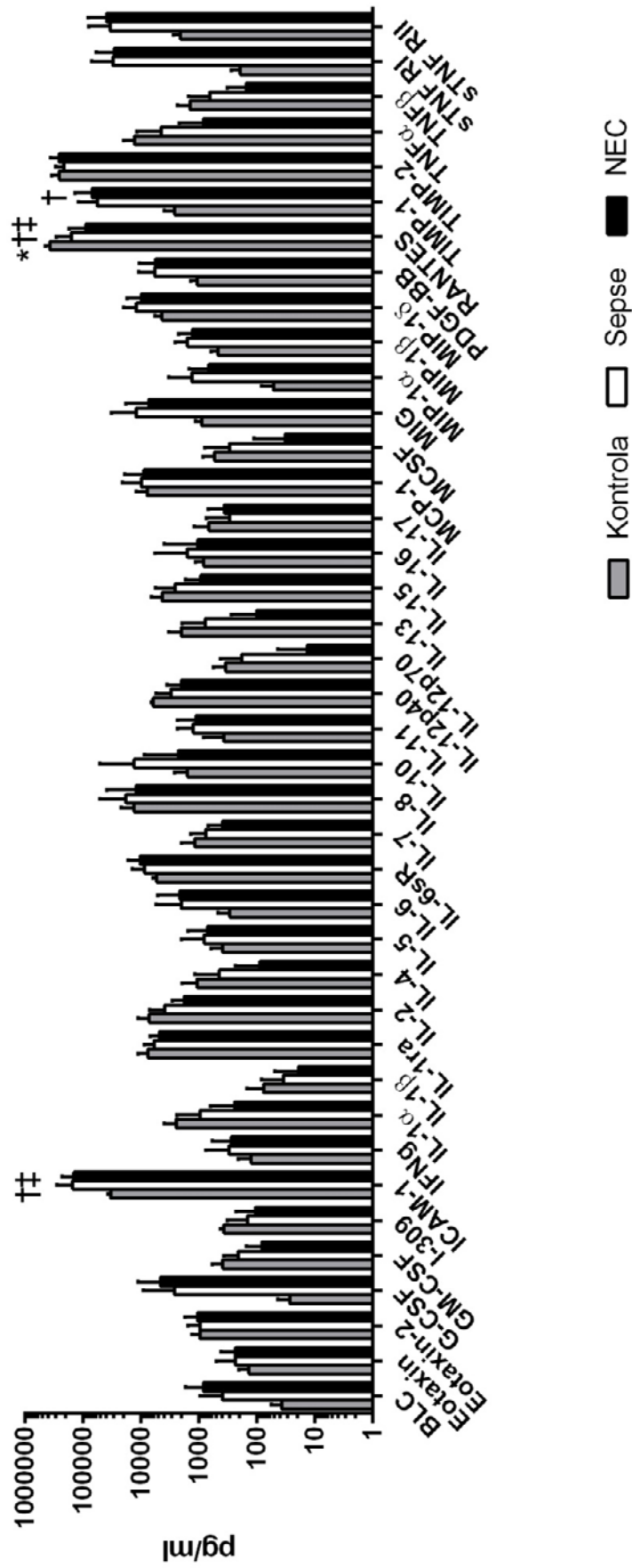
Byly vyšetřeny a porovnávány vzorky sér novorozenců. Séra byla získána z krve, která byla odebrána v den potvrzení diagnózy sepse či NEC (S1) a v den ukončení léčebné terapie ATB (S2) (viz kap. 4.2). Jako kontrolní byly použity vzorky sér od zdravých novorozenců.

5.1.1 Vyšetření cytokinů

Pro zlepšení porozumění zatím stále nedostatečně popsané zánětlivé odpovědi novorozence při NEC byly za použití metody kvantitativního protilátkového mikročipu v séru novorozenců analyzovány cytokiny související se zánětlivou odpovědí (viz Tab. č. 6). Tato metoda nebyla v této souvislosti zatím popsána a představuje možnost jak jednorázově vyšetřit 40 cytokinů v jednom vzorku.

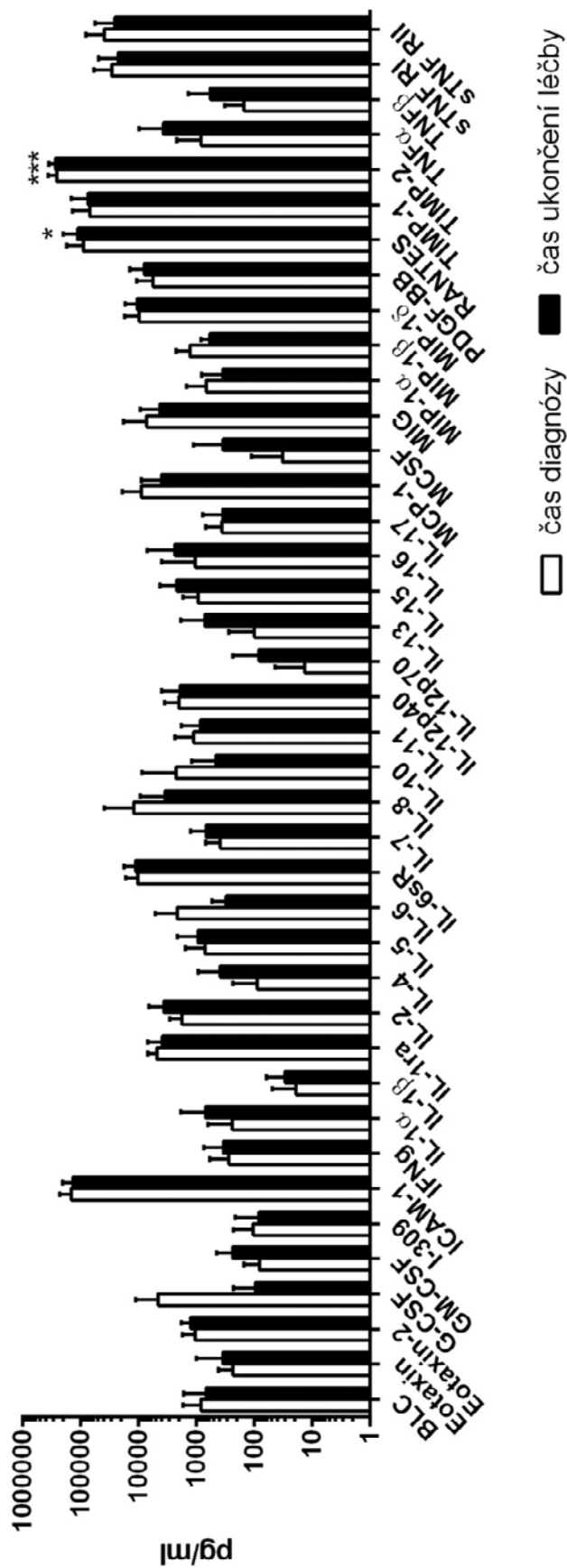
Porovnání koncentrací cytokinů novorozenců se sepsí v čase diagnózy, novorozenců s NEC v čase diagnózy a kontrolních novorozenců je znázorněno v grafu č. 1. Porovnání koncentrací cytokinů, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby NEC, je znázorněno v grafu č. 2. Porovnání koncentrací cytokinů, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby sepse, je znázorněno v grafu č. 3. Sloupce v grafech zobrazují průměrné koncentrace s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

Koncentrace cytokinů



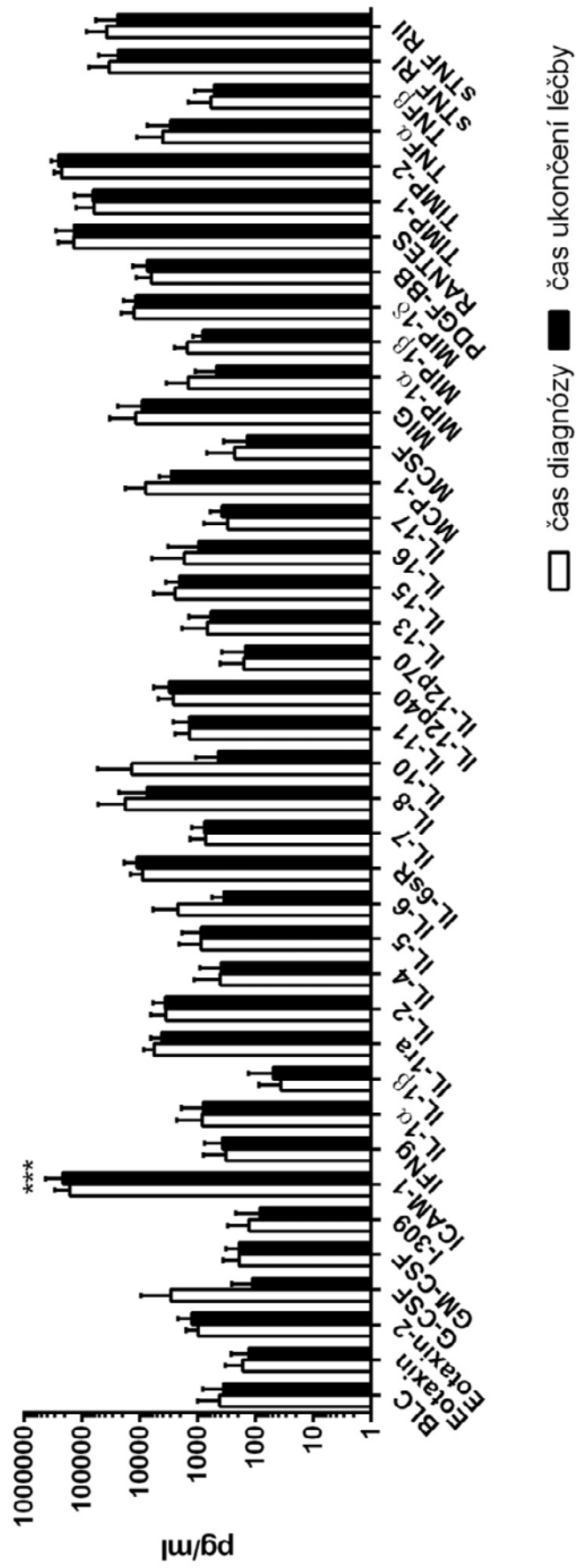
Graf č. 1: Porovnání koncentrací cytokinů u novorozenců se sepsí v čase diagnózy, novorozenců s NEC v čase diagnózy a kontrolních novorozenců. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn symboly podle hladiny statistické významnosti (* $p < 0,05$ Sepse vs. NEC; † $p < 0,05$ Kontrola vs. NEC; †† $p < 0,05$ Kontrola vs. Sepse).

Koncentrace cytokinů u novorozenců s NEC



Graf č. 2: Porovnání koncentrací cytokinů u novorozenců s NEC v čase diagnózy a v čase ukončení léčby ATB. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (* p<0,05, *** p<0,001).

Koncentrace cytokinů u novorozenců se sepsí



Graf č. 3: Porovnání koncentrací cytokinů u novorozenců se sepsí v čase diagnózy a v čase ukončení léčby ATB. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (*** p<0,001).

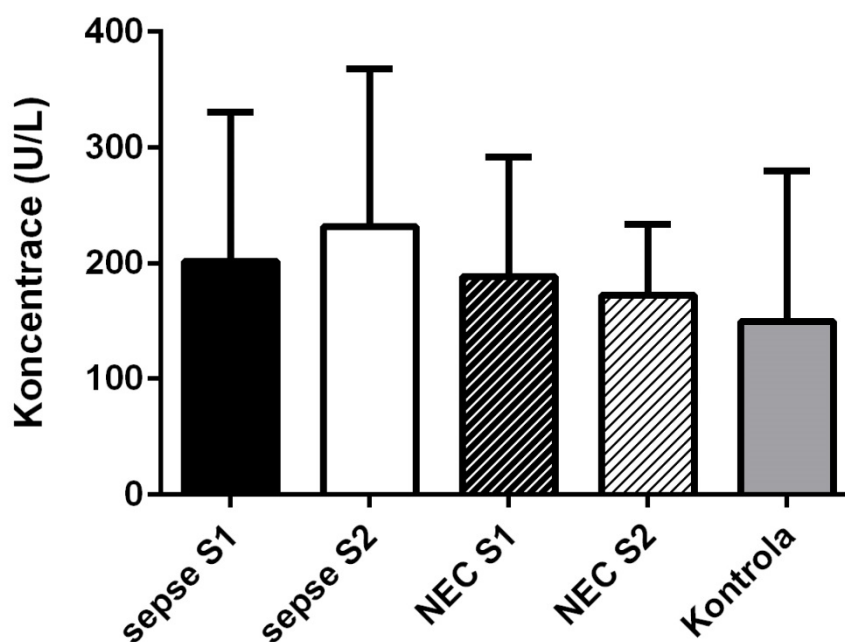
Byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace ICAM-1 u novorozenců se sepsí i u novorozenců s NEC v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům. Byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace RANTES u novorozenců se sepsí v čase diagnózy oproti novorozencům s NEC v čase diagnózy, zároveň bylo zjištěno, že koncentrace RANTES u novorozenců se sepsí nebo NEC v čase diagnózy je signifikantně nižší v porovnání s koncentrací u kontrolních novorozenců. Byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace TIMP-1 u novorozenců s NEC v čase diagnózy v porovnání s kontrolními novorozenci (viz graf č. 1). Při porovnání průměrných koncentrací cytokinů u novorozenců s NEC, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby, byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace RANTES a TIMP-2 v čase ukončení léčby (viz graf č. 2). Při porovnání průměrných koncentrací cytokinů u novorozenců se sepsí, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby, byla zjištěna signifikantně vyšší koncentrace ICAM-1 v čase ukončení léčby (viz graf č. 3).

5.1.2 Vyšetření cytokeratinu 18 (CK18)

Měřením koncentrace kaspázami štěpené formy CK18 (ccCK18) v séru novorozenců, byla testována hypotéza, že zvýšená apoptóza epitelových buněk střeva představuje iniciální fázi rozvoje NEC.

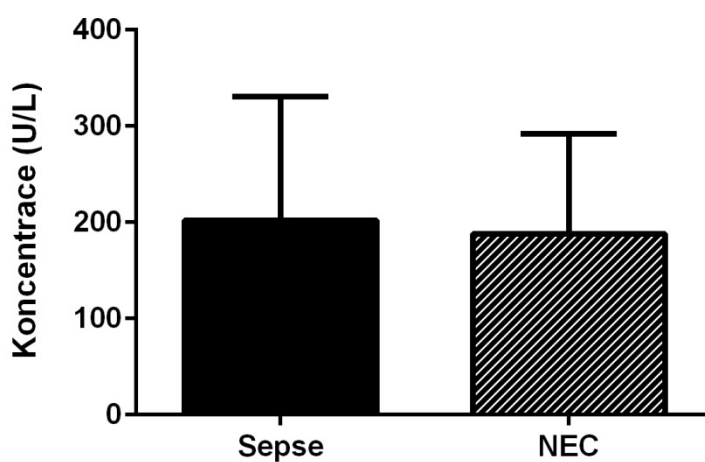
V grafu č. 4 je znázorněno porovnání koncentrací ccCK18 v séru novorozenců se sepsí nebo NEC a kontrolních novorozenců. Porovnání koncentrací ccCK18, v čase diagnózy sepse a NEC, je znázorněno v grafu č. 5. Porovnání koncentrací ccCK18, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby NEC, je znázorněno v grafu č. 6. Sloupce v grafech zobrazují průměrné koncentrace s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

Kaspázami štěpená forma CK18 v séru



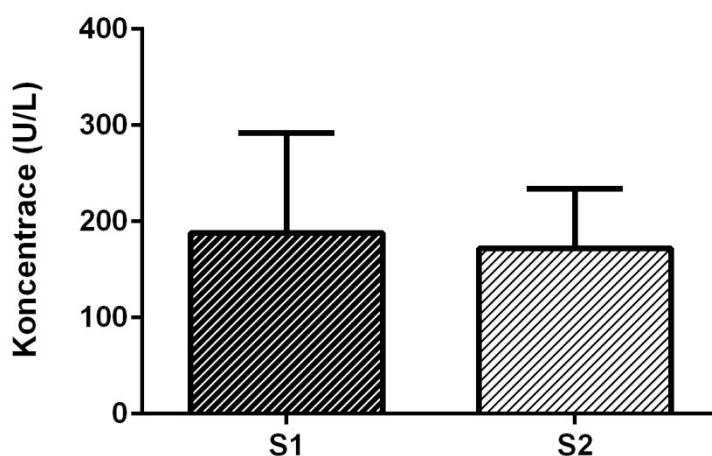
Graf č. 4: Porovnání koncentrací kaspázami štěpené formy CK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC a u kontrolních novorozenců. S1 odběr v čase diagnózy, S2 odběr v čase ukončení léčby ATB.

Kaspázami štěpená forma CK18 v čase diagnózy



Graf č. 5: Porovnání koncentrací kaspázami štěpené formy CK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC v čase diagnózy.

Kaspázami štěpená forma CK18 u novorozenců s NEC



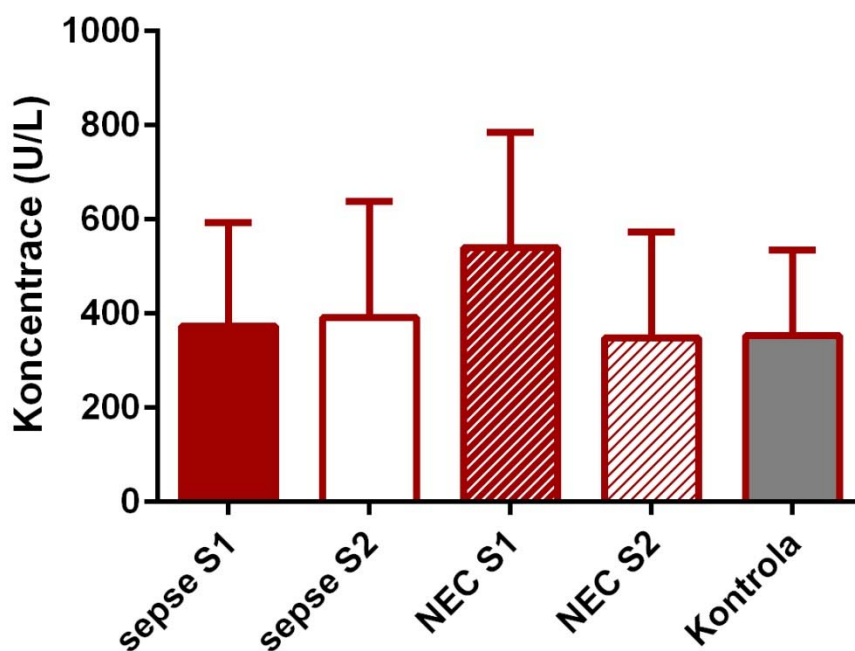
Graf č. 6: Porovnání koncentrací kaspázami štěpené formy CK18 u novorozenců s NEC v čase diagnózy (S1) a v čase ukončení léčby ATB (S2).

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi koncentrací ccCK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC a u kontrolních novorozenců (viz graf č. 4). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi koncentrací ccCK18 u novorozenců se sepsí a novorozenců s NEC v čase diagnózy (viz graf č. 5). Byl pozorován mírný pokles koncentrace ccCK18 v čase ukončení léčby NEC oproti hodnotám koncentrace v čase diagnózy NEC, tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti (viz graf č. 6).

Vyšetření sér novorozenců pro kaspázami štěpenou formu CK18 bylo doplněno analýzou celkového uvolněného CK18 (štěpená i neštěpená forma). Tímto vyšetřením byla zjišťována celková buněčná smrt.

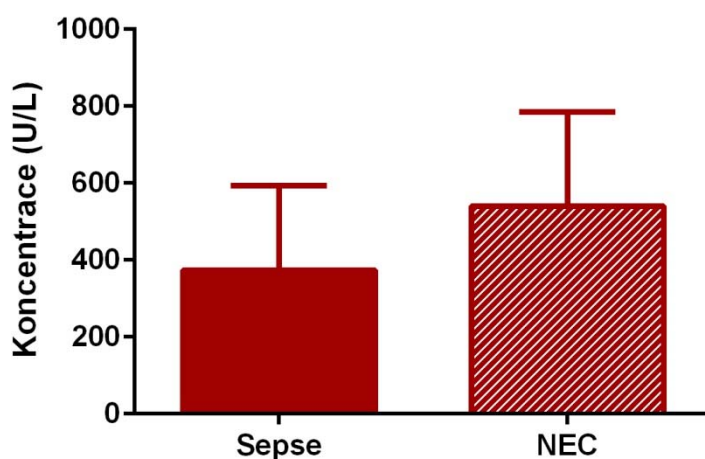
V grafu č. 7 je znázorněno porovnání koncentrací celkového CK18 v séru novorozenců se sepsí nebo NEC a kontrolních novorozenců. Porovnání koncentrací celkového CK18, v čase diagnózy sepse a NEC, je znázorněno v grafu č. 8. Porovnání koncentrací celkového CK18, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby NEC, je znázorněno v grafu č. 9. Sloupce v grafech zobrazují průměrné koncentrace s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

CK18 (štěpená i neštěpená forma) v séru



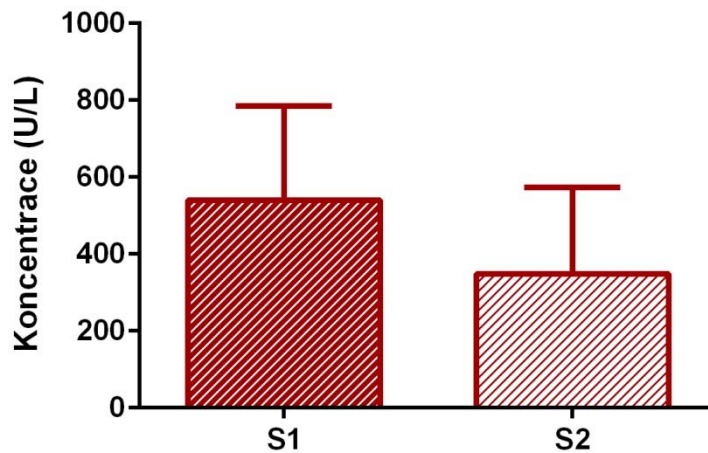
Graf č. 7: Porovnání koncentrací celkového CK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC a u kontrolních novorozenců. S1 odběr v čase diagnózy, S2 odběr v čase ukončení léčby ATB.

CK18 (štěpená i neštěpená forma) v čase diagnózy



Graf č. 8: Porovnání koncentrací celkového CK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC v čase diagnózy.

CK18 (štěpená i neštěpená forma) u novorozenců s NEC

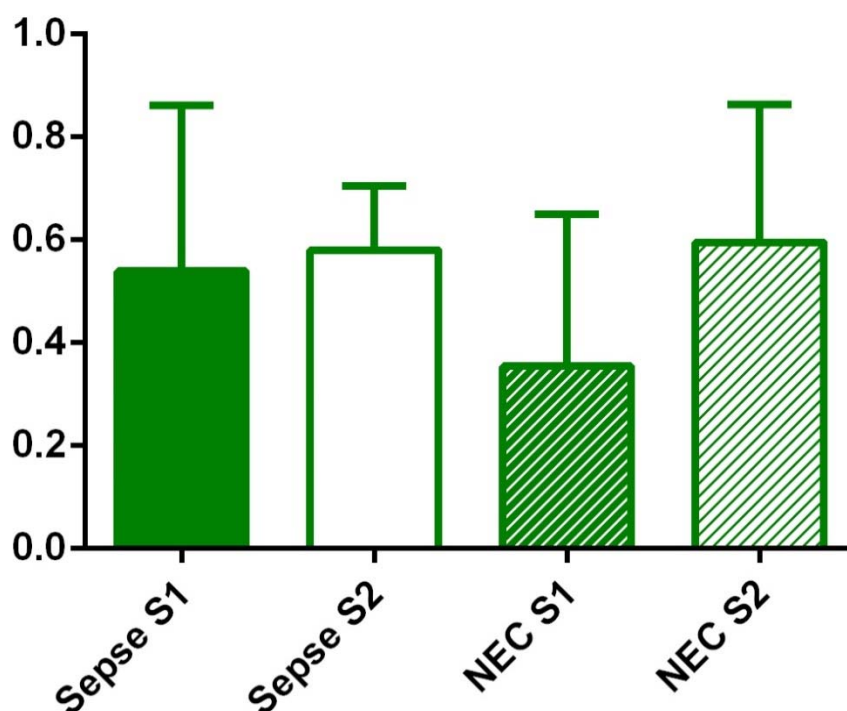


Graf č. 9: Porovnání koncentrací celkového CK18 u novorozenců s NEC v čase diagnózy (S1) a v čase ukončení léčby ATB (S2).

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi koncentrací celkového CK18 u novorozenců se sepsí nebo NEC a u kontrolních novorozenců (viz graf č. 7). V čase diagnózy byla pozorována vyšší koncentrace celkového CK18 u novorozenců s NEC oproti novorozencům se sepsí (viz graf č. 8). Tento rozdíl hodnot však nedosáhl statistické významnosti. Byl pozorován pokles koncentrace celkového CK18 v čase ukončení léčby NEC oproti hodnotám koncentrace v čase diagnózy NEC (viz graf č. 9). Tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti.

Ze zjištěných průměrných koncentrací kaspázami štěpené formy CK18 a celkového CK18 byl vypočítán poměr (ccCK18/celkový CK18). Tento poměr představuje informaci o převládajícím typu buněčné smrti (apoptóza – nekróza). Porovnání poměrů forem CK18 je znázorněno v grafu č. 10.

Poměr štěpeného a celkového CK18



Graf č. 10: Porovnání poměrů kaspázami štěpené formy CK18 k celkovému CK18 (štěpená i neštěpená forma). V grafu jsou znázorněny směrodatné odchylky.

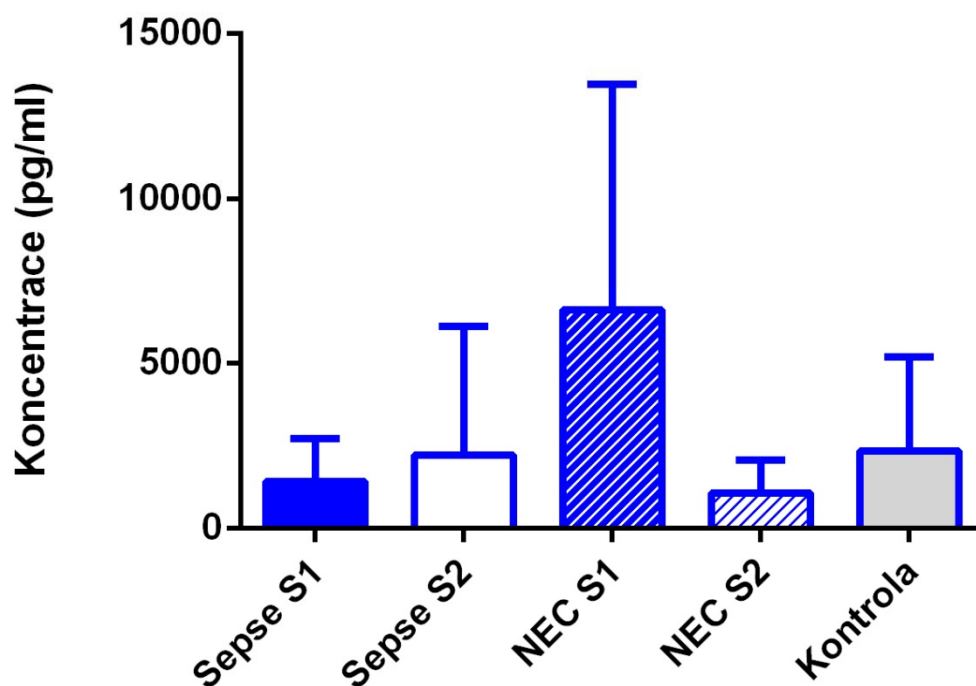
Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl hodnot mezi poměry forem CK18. Nicméně byla pozorována nižší hodnota poměru ccCK18 a celkového CK18 v čase diagnózy NEC.

5.1.3 Vyšetření i-FABP

Měřením i-FABP v séru byl zjišťován diagnostický potenciál tohoto proteinu jako možného ukazatele NEC.

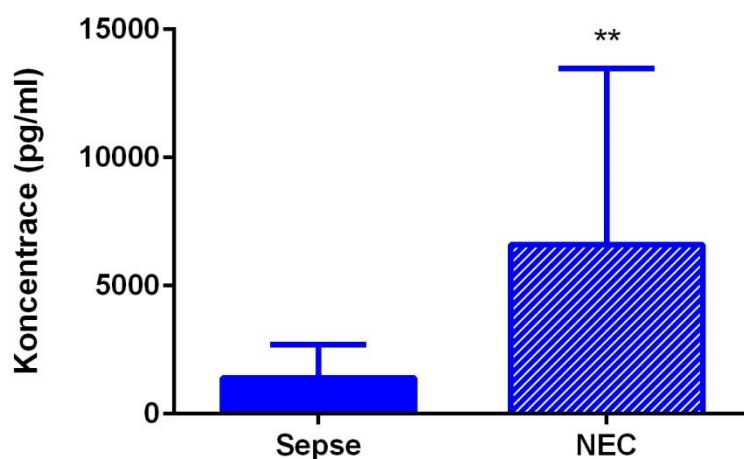
V grafu č. 11 je znázorněno porovnání koncentrací i-FABP v séru novorozenců se sepsí nebo NEC a kontrolních novorozenců. Porovnání koncentrací i-FABP, v čase diagnózy sepsy a NEC, je znázorněno v grafu č. 12. Porovnání koncentrací i-FABP, v čase diagnózy a v čase ukončení léčby NEC, je znázorněno v grafu č. 13. Sloupce v grafech zobrazují průměrné koncentrace s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

i-FABP v séru



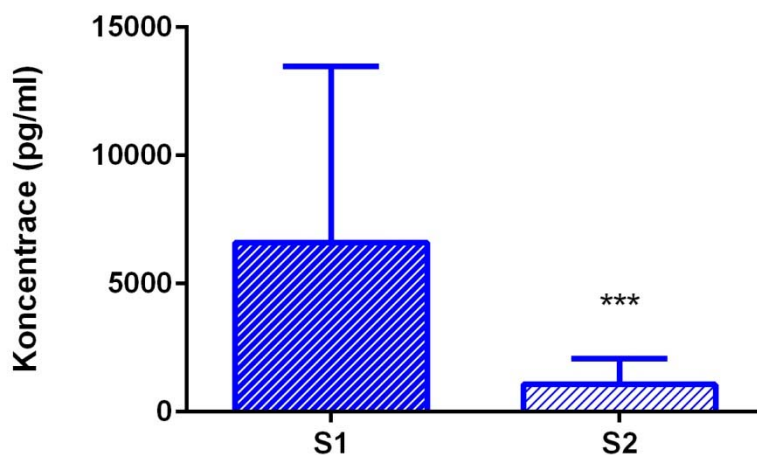
Graf č. 11: Porovnání koncentrací i-FABP u novorozenců se sepsí nebo NEC a kontrolních novorozenců. S1 odběr v čase diagnózy, S2 odběr v čase ukončení léčby ATB.

i-FABP v séru v čase diagnózy



Graf č. 12: Porovnání koncentrací i-FABP u novorozenců se sepsí nebo NEC v čase diagnózy. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (** $p < 0,01$).

i-FABP v séru u novorozenců s NEC



Graf č. 13: Porovnání koncentrací i-FABP u novorozenců s NEC v čase diagnózy (S1) a v čase ukončení léčby ATB (S2). Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (***) $p < 0,001$.

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi koncentrací i-FABP u novorozenců se sepsí nebo NEC a u kontrolních novorozenců (viz graf č. 11). V čase diagnózy byla pozorována signifikantně vyšší koncentrace i-FABP u novorozenců s NEC oproti novorozencům se sepsí (viz graf č. 12). Byl pozorován signifikantní pokles koncentrace i-FABP v čase ukončení léčby NEC oproti hodnotám koncentrace v čase diagnózy NEC (viz graf č. 13).

5.2 Vyšetření vzorků moči

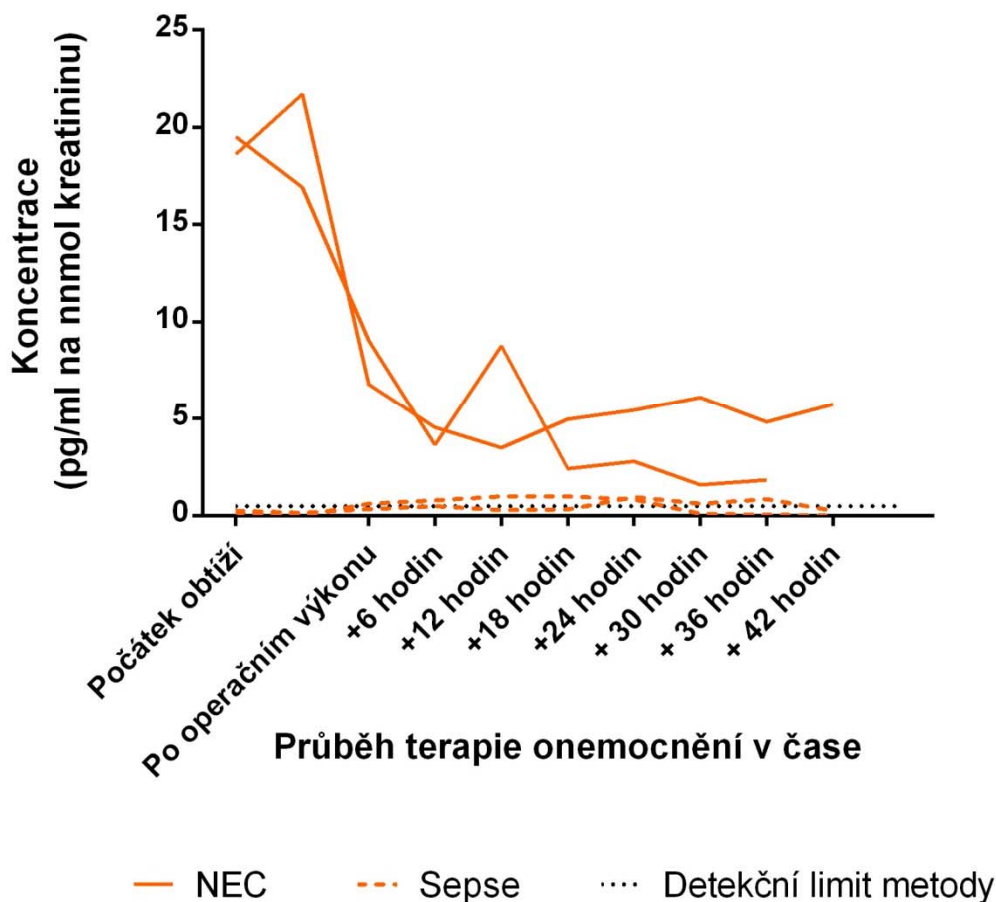
Byly vyšetřeny a porovnávány vzorky moči novorozenců se sepsí, NEC nebo VVV GIT. Jako kontrolní byly použity vzorky moči zdravých novorozenců. Koncentrace i-FABP v moči je normalizovaná ke kreatininu a uváděna v pg/ml na nmol kreatininu.

5.2.1 Vyšetření i-FABP v moči

Měřením i-FABP v moči byl zjišťován diagnostický a screeningový potenciál tohoto proteinu v neinvazivně odebraném biologickém materiálu.

Porovnání individuální dynamiky koncentrace i-FABP v moči dvou novorozenců s NEC a dvou novorozenců se sepsí je znázorněno v grafu č. 14.

Individuální dynamika koncentrace i-FABP v moči

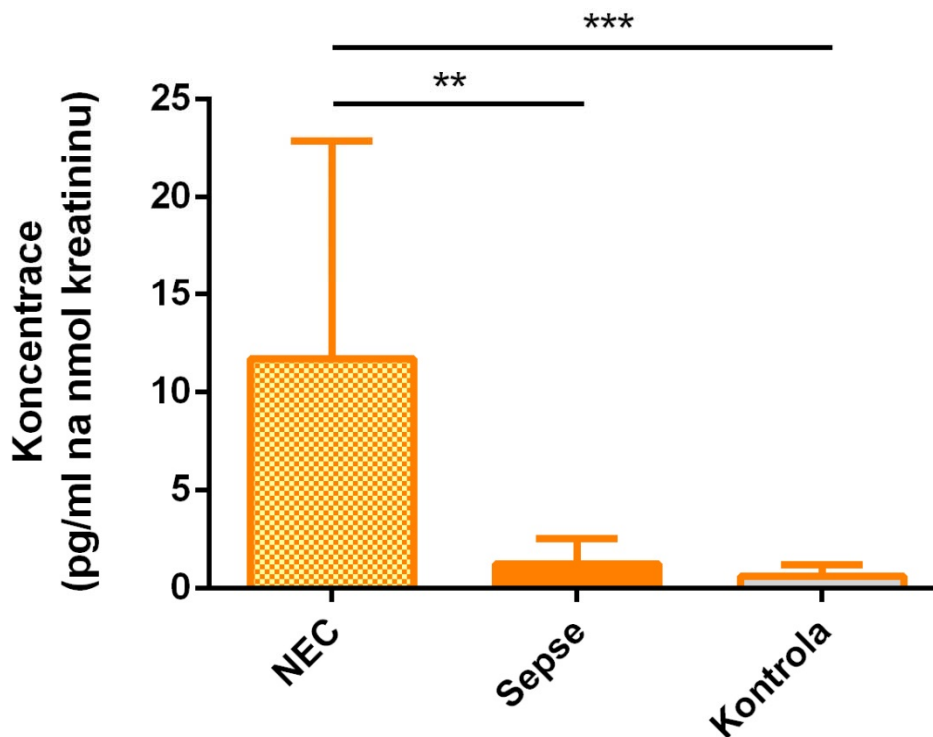


Graf č. 14: Porovnání individuální dynamiky koncentrace i-FABP novorozenců s NEC a novorozenců se sepsí.

Byl pozorován výrazný pokles koncentrace i-FABP u novorozenců s NEC. Koncentrace i-FABP novorozenců se sepsí se pohybovala podobně jako koncentrace i-FABP u kontrolních novorozenců kolem detekčního limitu metody.

Zjistili jsme, že k velkému poklesu koncentrace i-FABP v moči u novorozenců s NEC dochází již v průběhu terapie v prvních 12-ti hodinách od počátku klinických obtíží. Porovnání koncentrace i-FABP u novorozenců s NEC a u novorozenců se sepsí v tomto časovém úseku a kontrolních novorozenců je znázorněno v grafu č. 15. Sloupce v grafu zobrazují průměrné koncentrace i-FABP s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

i-FABP v moči v prvních 12-ti hodinách od počátku klinických obtíží

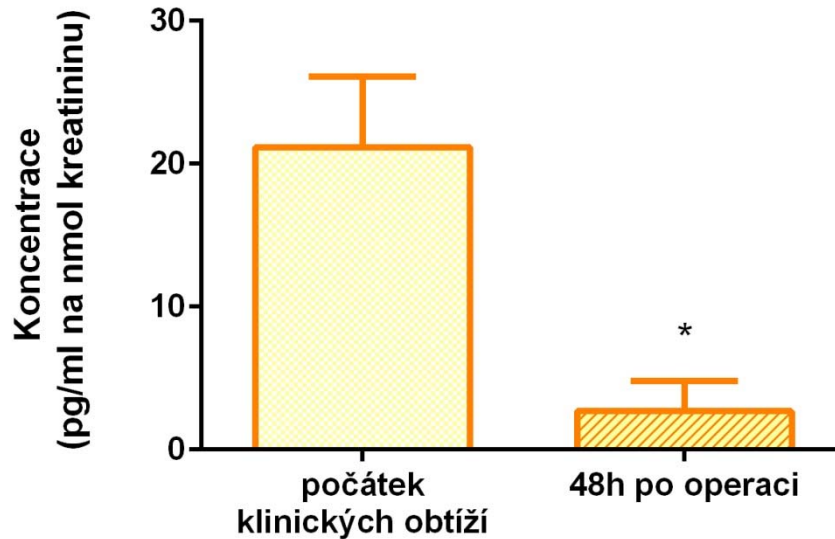


Graf č. 15: Porovnání koncentrací i-FABP u novorozenců s NEC, novorozenců se sepsí a kontrolních novorozenců. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace i-FABP u novorozenců s NEC v porovnání s koncentrací i-FABP u novorozenců se sepsí a v porovnání s koncentrací i-FABP u kontrolních novorozenců. Rozdíl hodnot koncentrace i-FABP u novorozenců se sepsí a u kontrolních novorozenců nedosáhl statistické významnosti.

Na základě pozorovaného poklesu i-FABP u jedinců s NEC v průběhu terapie, je porovnání koncentrací i-FABP při počátku klinických obtíží NEC a v době 48 hodin po operačním výkonu znázorněno v grafu č. 16. Sloupce v grafu zobrazují průměrné koncentrace i-FABP s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

i-FABP v moči u novorozenců s NEC

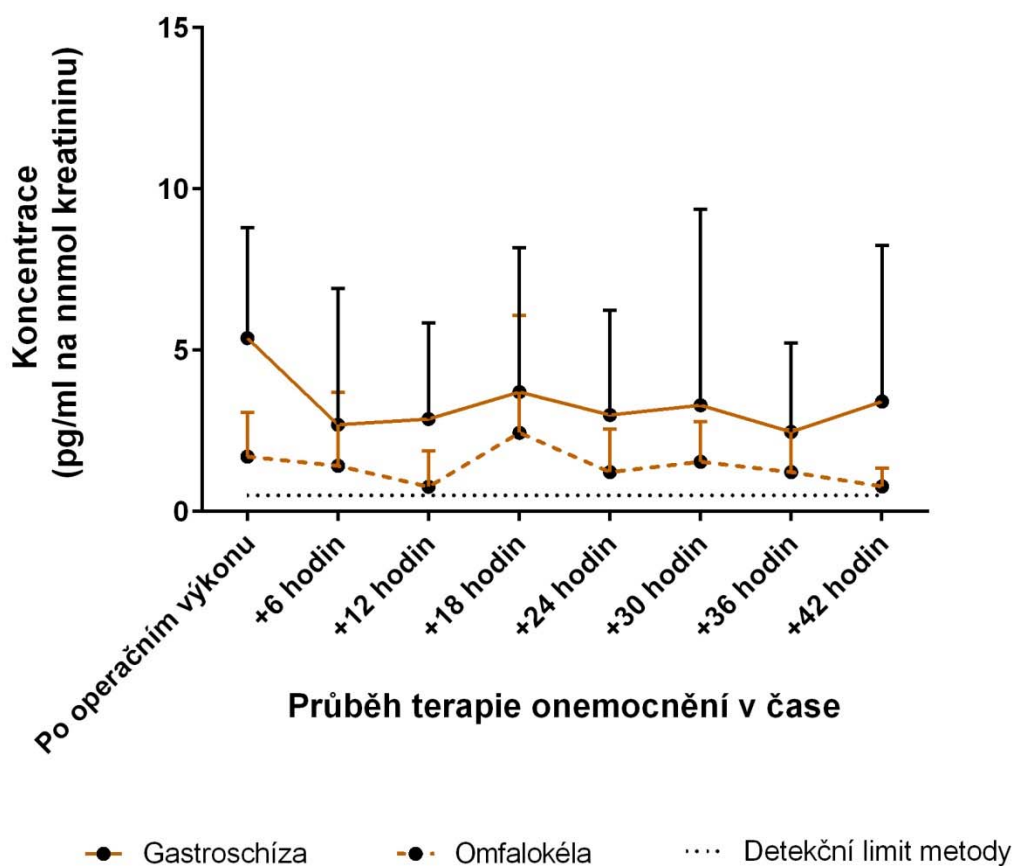


Graf č. 16: Porovnání koncentrací i-FABP v moči novorozenců s NEC při počátku klinických obtíží a v čase 48 hodin po operaci. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (* $p < 0,05$).

Byl prokázán signifikantní pokles koncentrace i-FABP v čase 48 hodin po operačním výkonu pro NEC v porovnání s hodnotami koncentrace při počátku klinických obtíží.

Vyšetřením i-FABP v moči novorozenců po operačním řešení VVV GIT, jsme zjišťovali možnost využití i-FABP, jako možného ukazatele sledování stavu střevního epitelu v pooperačním období, tj. v období, kdy může dojít ke komplikacím a dutina břišní je uzavřena a není možné jiného hodnocení. Porovnání dynamiky koncentrace i-FABP v moči novorozenců po operaci VVV GIT (gastroschíza nebo omfalokéla) je znázorněno v grafu č. 17. Body v grafu zobrazují průměrné koncentrace i-FABP s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

Dynamika koncentrace i-FABP v moči u novorozenců s VVV GIT

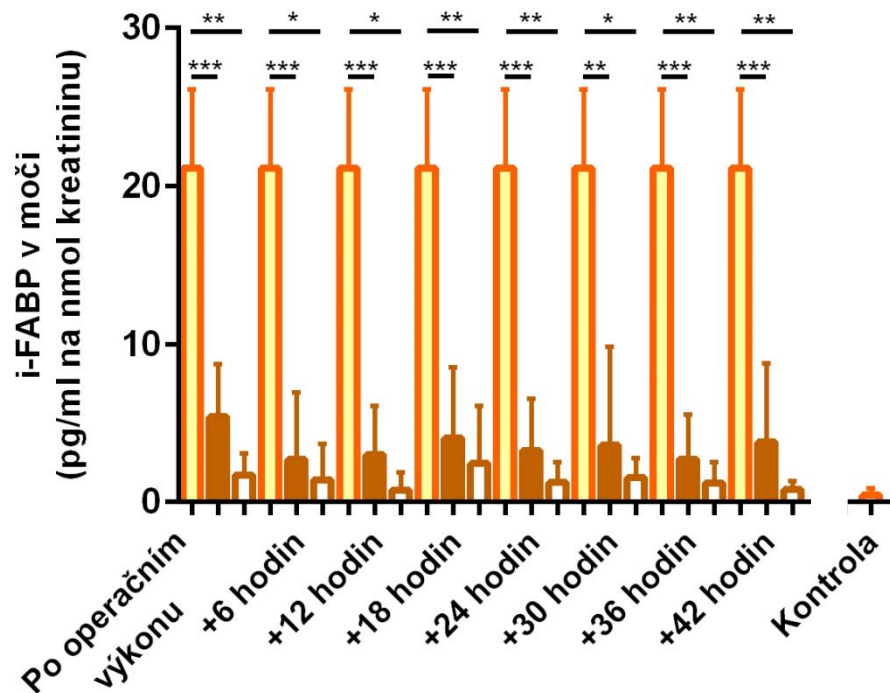


Graf č. 17: Porovnání dynamiky koncentrace i-FABP v moči u novorozenců po operaci gastroschízy nebo omfalokély.

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl hodnot koncentrací i-FABP u novorozenců po operaci gastroschízy nebo omfalokély. Hodnoty koncentrace i-FABP ve sledovaném pooperačním období, nedosáhly v žádném případě hodnot zjištěných v době počátku klinických obtíží NEC (viz graf č. 16). Koncentrace i-FABP kontrolních pacientů se pohybovala kolem detekčního limitu metody.

Porovnání hodnot koncentrací i-FABP v době počátku klinických obtíží NEC a hodnot i-FABP u novorozenců po operaci VVV GIT (gastroschíza nebo omfalokéla) je znázorněno v grafu č. 18. Sloupce v grafu zobrazují průměrné koncentrace i-FABP s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

Koncentrace i-FABP v moči



Průběh terapie VVV GIT v čase

█ NEC v počátku klinických obtíží
 █ Gastroschíza
 ▭ Omfalokéla

Graf č. 18: Porovnání koncentrací i-FABP u novorozenců v době počátku klinických obtíží NEC a u novorozenců po operaci gastroschízy nebo omfalokély. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami je znázorněn hvězdičkami podle hladiny statistické významnosti (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace i-FABP v době počátku klinických obtíží NEC v porovnání s koncentrací i-FABP v pooperačním období novorozenců po operaci gastroschízy nebo omfalokély.

6 Diskuze

Nekrotizující enterokolitida je jedním z nejzávažnějších akutních onemocnění GIT novorozenců. Pro toto onemocnění je typický neočekávaný nástup a velmi rychlý průběh s rizikem perforace střeva a úmrtím novorozence. Klinické příznaky jsou v rané fázi onemocnění značně nespecifické a snadno zaměnitelné s jinými poruchami GIT či sepsí. Diagnostický postup, který by byl schopen odhalit NEC včas, tedy ještě před nástupem destruktivní fáze onemocnění, je stále velmi problematický a nedokonalý. Pozdě provedená diagnóza těchto závažných chorob dále zvyšuje morbiditu a mortalitu novorozenců. Z dosavadních studií vyplývá, že za aktivaci střevní zánětlivé odpovědi vedoucí k rozvoji NEC je zodpovědný celý komplex změn ve složení střevní mikroflóry, ne jediná bakterie. Modely popisující NEC ukazují, že nezralý imunitní systém nedonošeného novorozence není schopen poskytnout dostatečnou ochranu nedokonale utvořené střevní bariéry, která je zatěžována abnormálně utvořenou střevní mikroflórou. Při selhání střevní bariéry a proniknutí bakterií z lumen střeva se však spouští silná zánětlivá odpověď, která je zodpovědná za další poškození organismu. Ačkoliv byly popsány cytokiny související s NEC, mnoho znalostí pochází ze zvířecích modelů a zánětlivá odpověď u novorozence s NEC tak nebyla doposud dostatečně popsána. Proto byly v této diplomové práci vyšetřeny séra novorozenců na cytokiny související se zánětlivou odpovědí.

V této diplomové práci je podán přehled hladin koncentrací 40 cytokinů. Při porovnání koncentrací cytokinů novorozenců se sepsí nebo s NEC v čase diagnózy a kontrolních novorozenců, nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi koncentracemi cytokinů, které jsou v literatuře popisovány v souvislosti s NEC (zejména TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) (CAPLAN *et al.* 1990; EDELSON *et al.* 1999; HARRIS *et al.* 2005; SHARMA *et al.* 2007).

V případě TNF- α byla v této diplomové práci pozorována nižší koncentrace u novorozenců s NEC v čase diagnózy v porovnání s kontrolními novorozenci. Caplan *et al.* i Sharma *et al.* naopak pozorovali signifikantně vyšší koncentraci TNF- α u novorozenců s NEC v porovnání s kontrolními novorozenci (CAPLAN *et al.* 1990; SHARMA *et al.* 2007).

V rámci této diplomové práce byla také zjištěna nižší koncentrace IL-1 β u novorozenců s NEC v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům. Sharma *et al.* pozorovali signifikantně vyšší koncentraci IL-1 β u novorozenců s NEC v porovnání s kontrolními novorozenci.

Podobně jako ve studiích Sharma *et al.* a Maheshwari *et al.* byla v rámci této diplomové práce pozorována vyšší koncentrace IL-6 u novorozenců s NEC v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům (SHARMA *et al.* 2007; MAHESHWARI *et al.* 2014), nicméně tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti.

Skupina Edelson *et al.* pozorovala signifikantně vyšší koncentrace IL-8 a IL-10 u závažnějších forem NEC v čase diagnózy (EDELSON *et al.* 1999), nicméně v této diplomové práci byla zjištěna zvýšená koncentrace pouze IL-10 v čase diagnózy NEC v porovnání s kontrolními novorozenci. Zvýšení koncentrace IL-8 u novorozenců s NEC popisuje také studie Maheshwari *et al.* (MAHESHWARI *et al.* 2014).

V této diplomové práci byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace cytokinů ICAM-1 a TIMP-1 u novorozenců v čase diagnózy NEC oproti kontrolním novorozencům. Signifikantně vyšší koncentrace ICAM-1 byla pozorována i u novorozenců se sepsí v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům. Figueras-Aloy *et al.* popisují ICAM-1 jako možný diagnostický ukazatel sepse u novorozenců a uvádějí jeho zvýšenou koncentraci v séru (FIGUERAS-ALOY *et al.* 2007). Nelze tedy uvažovat o ICAM-1 jako o možném specifickém ukazateli NEC.

Pender *et al.* pozorovali zvýšenou hladinu mRNA i proteinů TIMP-1 v buňkách ve vzorcích střeva novorozenců odebraných během operace pro NEC v porovnání se vzorky kontrol (novorozenců operovaných pro jiný důvod než NEC) (PENDER *et al.* 2003).

Dále byla v této diplomové práci prokázána signifikantně nižší koncentrace RANTES u novorozenců s NEC v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům. V této diplomové práci byla také zjištěna snížená koncentrace RANTES v séru novorozenců se sepsí v čase diagnózy oproti kontrolním novorozencům a Ng *et al.* uvádí, že snížená koncentrace RANTES je jedním z možných ukazatelů novorozenecké sepse (NG *et al.* 2006). Byla také zjištěna signifikantně vyšší koncentrace cytokinů RANTES a TIMP-2 v čase ukončení léčby NEC než v čase diagnózy. Nebyl však zjištěn statisticky významný rozdíl koncentrace TIMP-

2 u novorozenců s NEC v čase diagnózy v porovnání s kontrolními novorozenci. Také Pender *et al.* neprokázali změnu hladiny TIMP-2 na úrovni mRNA i proteinů ve vzorcích střev novorozenců, operovaných pro NEC, v porovnání se vzorky kontrol (novorozenců operovaných pro jiný důvod než NEC) (PENDER *et al.* 2003).

Ve sledovaném souboru novorozenců této diplomové práce nebyla prokázána signifikantně vyšší koncentrace cytokinů, které jsou v literatuře uvažované v souvislosti s NEC. Odlišnosti mezi výše uvedenými výsledky mohou být způsobeny použitím rozdílných metod pro stanovení koncentrace cytokinů. Získané výsledky jsou také závislé na důsledném dodržení preanalytické přípravy vzorků. Koncentrace cytokinů v krvi je zároveň ovlivněna jejich lokální tvorbou a působením, malou velikostí (rychlá filtrace do moči) i rychlou utilizací množstvím jiných buněk.

Mikroskopické vyšetření střeva postiženého NEC popisuje jako jeden z hlavních histopatologických znaků onemocnění koagulační nekrózu ve slizniční a podslizniční vrstvě, později transmurální nekrózu. Nicméně ve studii NEC na zvířecím modelu bylo popsáno, že silnému poškození střeva způsobenému nekrózou předcházela nadměrná apoptóza střevních epitelových buněk (JILLING *et al.* 2004). V další studii bylo popsáno, že podáním *Bifidobacterium bifidum* je možné snížit míru apoptózy epitelových buněk střeva a snížit tak riziko vzniku NEC (KHAILOVA *et al.* 2010).

Na základě těchto poznatků byla v této diplomové práci, v jedinečných vzorcích séra novorozenců, testována hypotéza, zda zvýšená apoptóza epitelových buněk střeva představuje iniciální fázi rozvoje NEC. Pro toto testování byl zvolen, v současné literatuře popisovaný, ukazatel apoptotické smrti epitelových buněk - kaspázami štěpený cytokeratin 18 (ccCK18) (LEERS *et al.* 1999; HÄGG *et al.* 2002). Tento typ vyšetření nebyl doposud v souvislosti s NEC v literatuře popsán a byl tak prvním krokem při posuzování ccCK18 jako možného ukazatele rané fáze NEC.

Nepodařilo se prokázat statisticky významný rozdíl mezi koncentrací ccCK18 u novorozenců v čase diagnózy NEC v porovnání s koncentrací ccCK18 u novorozenců v čase diagnózy sepse či u kontrolních novorozenců. V čase ukončení léčby NEC byl pozorován pouze mírný pokles koncentrace ccCK18 oproti hodnotám získaným v čase diagnózy.

Zheng *et al.* popsali možný diagnostický potenciál poměru ccCK18 a celkového uvolněného CK18 v hodnocení poškození jater v důsledku hepatitidy B (ZHENG *et al.* 2014). Pro zjištění celkové buněčné smrti (apoptóza i nekróza) bylo v této diplomové práci provedeno také vyšetření sér novorozenců na celkový uvolněný CK18. Byla zjištěna zvýšená koncentrace celkového CK18 v čase diagnózy NEC oproti koncentraci v čase diagnózy sepse a kontrolních novorozenců. Oproti hodnotám získaným v čase diagnózy NEC byl pozorován pokles koncentrace celkového CK18 v séru novorozenců v čase ukončení léčby. Tyto rozdíly hodnot však nedosáhly statistické významnosti.

Pro zjištění převládající formy buněčné smrti byl vypočítán poměr ccCK18 a celkového uvolněného CK18. Bylo zjištěno, že převládající formou buněčné smrti v čase diagnózy NEC byla nekróza. Rozdíl hodnot získaných poměrů však nedosahoval statistické významnosti. Vysvětlením tohoto výsledku může být fakt, že v čase diagnózy NEC již onemocnění progredovalo a počáteční nadměrná apoptóza, popsaná na zvířecích modelech NEC (JILLING *et al.* 2004; KHAILOVA *et al.* 2010), postoupila do pokročilejší fáze spojené s poškozením střeva nekrozou. Zároveň by to potvrzovalo typický charakter onemocnění – neočekávaný nástup a velmi rychlý průběh. Znamenalo by to také, že současné diagnostické možnosti odhalí onemocnění až v pokročilejším stavu. Toto tvrzení je však třeba ověřit na vyšším počtu novorozenců. V souvislosti s tím, je třeba také rozšířit i kontrolní skupinu tvořenou zdravými novorozenci obdobného gestačního stáří a porodní hmotnosti. Tento invazivně odebraný typ vzorku je velmi problematické získat, mimo jiné, také z důvodu častého odmítnutí rodičů podepsat informovaný souhlas k poskytnutí vzorku pro výzkumné účely – totéž platí i v případě novorozenců se sepsí nebo NEC.

Navázáním na současnou literaturu popisující využití forem CK18 a jejich poměru, jako možného diagnostického ukazatele u různých onemocnění, byl v této diplomové práci proveden první krok v testování využití CK18 jako možného diagnostického ukazatele pro časnou diagnózu NEC.

Zjištění, že převládajícím typem buněčné smrti v čase diagnózy NEC je nekróza, by mohla podporovat také v této diplomové práci prokázaná signifikantně vyšší koncentrace proteinu i-FABP v séru novorozenců v čase diagnózy NEC. Protein i-FABP je uvolňován z epitelových buněk střeva hynoucích nekrozou během poškození střevního epitelu a jeho

hladina v krvi se tak rychle zvyšuje. Již Gollin a Marks popsali zvýšenou koncentraci i-FABP v séru jako možný ukazatel poškození střevního epitelu při NEC na zvířecím modelu (GOLLIN a MARKS 1993). Aydemir *et al.* sledovali koncentraci i-FABP v séru novorozenců s NEC v čase diagnózy, dále po 24 a 72 hodinách léčby. Zjistili signifikantně vyšší koncentrace u novorozenců s NEC oproti kontrolním novorozencům. V průběhu léčby pozorovali postupný pokles počátečních vysokých koncentrací i-FABP, nejnižší koncentrace i-FABP pak byla zpravidla naměřena v posledním sledovaném čase. V jejich práci byla také popsána spojitost mezi výší koncentrace i-FABP a závažností NEC (AYDEMIR *et al.* 2011). Sledováním koncentrace i-FABP v séru novorozenců v čase diagnózy NEC a v čase ukončení léčby, byl v této diplomové práci prokázán statisticky významný pokles koncentrace i-FABP. Zjištěný pokles hodnot představuje informaci o významném snížení míry poškození střevního epitelu v čase ukončení léčby NEC a odpovídá pozorování popsanému skupinou Aydemir *et al.* (AYDEMIR *et al.* 2011).

Výsledky vyšetření i-FABP v séru novorozenců s NEC v této diplomové práci podporují závěry předchozích studií (GOLLIN a MARKS 1993; AYDEMIR *et al.* 2011), že sledování koncentrace i-FABP v séru je možný ukazatel NEC, ale také současně ukazatel míry poškození střevního epitelu. Nepodařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl mezi koncentrací i-FABP v čase diagnózy NEC a koncentrací u kontrolních novorozenců. V souvislosti s tím, je třeba rozšířit kontrolní skupinu tvořenou zdravými novorozenci obdobného gestačního stáří a porodní hmotnosti. Bohužel tento úkol je zatížen stejným problémem jako v případě výše popsaného CK18.

V této diplomové práci bylo dále zjišťováno využití sledování koncentrace i-FABP v moči, jako nejsnáze a neinvazivně získaného biologického materiálu novorozenců. Předchozí studie zjistily signifikantně vyšší koncentrace i-FABP v moči novorozenců, u kterých později došlo k rozvoji NEC (DERIKX *et al.* 2007; MANNOIA *et al.* 2011). Byla také popsána signifikantně vyšší koncentrace i-FABP v moči ve spojitosti se závažností onemocnění a mírou postižení střeva, ale také signifikantní pokles koncentrace i-FABP po úspěšné léčbě (EVENNETT *et al.* 2010).

Pro výše popsané vlastnosti poskytovalo vyšetření moči novorozenců dlouhodobé pozorování koncentrace i-FABP bez invazivního zásahu do organismu novorozence. V této

diplomové práci byl poskytnut náhled na individuální dynamiku koncentrace i-FABP u novorozence s NEC nebo sepsí od počátku klinických příznaků. Byla zjištěna signifikantně vyšší koncentrace i-FABP v prvních 12-ti hodinách od počátku klinických obtíží NEC v porovnání s koncentrací novorozenců se sepsí a kontrolních novorozenců. Oproti tomu bylo pozorováno, že hodnoty koncentrace i-FABP novorozenců se sepsí se pohybovaly velmi blízko hodnotám kontrolních novorozenců.

Tyto výsledky potvrzují pozorování předchozích studií (DERIKX *et al.* 2007; EVENNETT *et al.* 2010; MANNOIA *et al.* 2011), kde právě NEC byla příčinou vysokých hodnot koncentrací i-FABP. Podobně jako ve studii skupiny Mannoia *et al.* byl také zjištěn statisticky významný pokles koncentrace i-FABP v moči u novorozenců s NEC při úspěšné terapii (MANNOIA *et al.* 2011). Tento pokles koncentrace i-FABP v moči odpovídal v této diplomové práci pozorovanému poklesu koncentrace i-FABP zjištěnému ve vzorcích séra při ukončení léčby NEC.

Na základě pozorování, že vysoké hodnoty i-FABP v séru i moči jsou důsledkem rozvíjející se, či již rozvinuté NEC, a že koncentrace i-FABP klesá v průběhu léčby NEC, byla v této diplomové práci dále sledována dynamika i-FABP v moči po operačním výkonu pro VVV GIT. Protože NEC představuje závažnou komplikaci pooperačního období novorozenců operovaných pro VVV GIT, byla sledována koncentrace i-FABP novorozenců po operačním výkonu pro gastroschízu a omfalokélu, u kterých v průběhu pooperačního období nedošlo k rozvoji NEC. V celém sledovaném období byly pozorovány vyšší hodnoty koncentrace i-FABP u novorozenců po operaci pro gastroschízu. Tyto hodnoty se však signifikantně nelišily od hodnot koncentrace i-FABP naměřených u novorozenců po operaci pro omfalokélu. Vyšší hodnoty i-FABP v pooperačním období oproti kontrolním novorozencům podporovaly předchozí pozorování, že výše hladiny i-FABP je odrazem stavu střevního epitelu. Zjištěné hodnoty však nedosáhly výše koncentrace i-FABP jako v popisovaném případě počátku klinických obtíží NEC. Je tak zřejmé, že ačkoliv vyšší hladiny i-FABP v pooperačním období po chirurgickém řešení VVV GIT byly důsledkem provedeného chirurgického zákroku. Příčinou signifikantně vysokých koncentrací i-FABP byla právě NEC.

Výsledky popsané v této diplomové práci doplňují současnou literaturu (DERIKX *et al.* 2007; EVENNETT *et al.* 2010; MANNOIA *et al.* 2011), která poukazuje na i-FABP jako možný ukazatel

NEC, i jako nástroj časně diagnostiky tohoto onemocnění. Sledováním individuální dynamiky i-FABP v moči novorozenců s NEC i novorozenců po operaci VVV GIT bylo ukázáno, jak hladina koncentrace i-FABP odráží stav střevního epitelu. Sledování hladiny koncentrace i-FABP v moči, jako neinvazivně získaném biologickém materiálu u rizikové skupiny novorozenců, by tak mohlo sloužit jako diagnostický postup, který by byl schopen odhalit riziko rozvoje NEC či odlišit NEC od jiných komplikací GIT či sepse. Dále by sledování hladiny i-FABP v moči novorozenců po operaci VVV GIT mohlo sloužit jako ukazatel stavu střeva (střevního epitelu).

7 Souhrn

- Byl podán přehled hladin koncentrací 40 cytokinů souvisejících se zánětlivou odpovědí v séru novorozenců při onemocnění NEC.
- Nebyla potvrzena hypotéza, že nadměrná apoptóza epitelových buněk střeva je počáteční příčinou poškození střevního epitelu u novorozenců při onemocnění NEC.
- Bylo zjištěno, že převládající typ buněčné smrti v čase diagnózy NEC byla nekróza.
- Bylo zjištěno, že hladina i-FABP v séru i v moči byla signifikantně vyšší u novorozenců s NEC a odrážela míru poškození střevního epitelu. Byl zjištěn signifikantní pokles koncentrace i-FABP v čase ukončení léčby NEC. i-FABP se proto jeví jako možný ukazatel pro časnou diagnostiku NEC a její odlišení od jiných onemocnění.

8 Seznam použité literatury

- AAGAARD K., MA J., ANTONY K. M., GANU R., PETROSINO J., VERSALOVIC J., 2014 The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **6**: 1–11.
- AFRAZI A., BRANCA M. F., SODHI C. P., GOOD M., YAMAGUCHI Y., EGAN C. E., LU P., JIA H., SHAFFIEY S., LIN J., MA C., VINCENT G., PRINDLE T., WEYANDT S., NEAL M. D., OZOLEK J. A., WIERSCH J., TSCHURTSCHENTHALER M., SHIOTA C., GITTES G. K., BILLIAR T. R., MOLLEN K., KASER A., BLUMBERG R., HACKAM D. J., 2014 Toll-like receptor 4-mediated endoplasmic reticulum stress in intestinal crypts induces necrotizing enterocolitis. *J. Biol. Chem.* **289**: 9584–9599.
- ALNOSAIR A., NAGA M., ABDULLA M., AL-SALEM A., 2014 Congenital duodenal atresia with “apple-peel configuration” of the small intestines and absent superior mesenteric artery: a case report and review of literature. *J. Pediatr. Surg.* **2**: 215–218.
- ATUMA C., STRUGALA V., ALLEN A., HOLM L., 2001 The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**: 922–929.
- AUSCH C., BUXHOFER-AUSCH V., OLSZEWSKI U., HINTERBERGER W., OGRIS E., SCHIESEL R., HAMILTON G., 2009 Caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment (M30) as marker of postoperative residual tumor load in colon cancer patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* **35**: 1164–1168.
- AYABE T., SATCHELL D. P., WILSON C. L., PARKS W. C., SELSTED M. E., OUELLETTE J., 2000 Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* **1**: 113–118.
- AYDEMIR C., DILLI D., OGUZ S. S., ULU H. O., URAS N., ERDEVE O., DILMEN U., 2011 Serum intestinal fatty acid binding protein level for early diagnosis and prediction of severity of necrotizing enterocolitis. *Early Hum. Dev.* **87**: 659–661.
- BALLANCE W. A., DAHMS B. B., SHENKER N., KLIEGMAN R. M., 1990 Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J. Pediatr.* **117**: 6–13.
- BANTEL H., LÜGERING A., HEIDEMANN J., VOLKMAN X., POREMBA C., STRASSBURG C. P., MANNS M. P., SCHULZE-OSTHOFF K., 2004 Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* **40**: 1078–1087.
- BELL M., TERNBERG J., FEIGIN R., KEATING J., MARSHALL R., BARTON L., BROTHERTON T., 1978 Neonatal necrotizing enterocolitis: therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann. Surg.* **187**: 1–7.
- BENKOE T., BAUMANN S., WENINGER M., PONES M., RECK C., REBHANDL W., OEHLER R., 2013 Comprehensive evaluation of 11 cytokines in premature infants with surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One* **8**: 1–6.
- BERDON W., GROSSMAN H., BAKER D., MIZRAHI A., BARLOW O., BLANC W., 1964 Necrotizing enterocolitis in the premature infant. *Radiology* **83**: 879–887.
- BIZZARRO M. J., EHRENKRANZ R. A., GALLAGHER P. G., 2014 Concurrent bloodstream infections in infants with necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.* **164**: 61–66.

- BUISINE M. P., DEVISME L., SAVIDGE T. C., GESPACH C., GOSSELIN B., PORCHET N., AUBERT J. P., 1998 Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* **43**: 519–524.
- CAPLAN M. S., SUN X. M., HSEUH W., HAGEMAN J. R., 1990 Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.* **116**: 960–964.
- COUTINHO H. B., MOTA H. C. DA, COUTINHO V. B., RABALINHO T. I., FURTADO A. F., WALKER E., KING G., MAHIDA Y. R., SEWELL H. F., WAKELIN D., 1998 Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotizing enterocolitis. *J. Clin. Pathol.* **51**: 512–514.
- DERENONCOURT M. H., BALTAZAR G., LUBELL T., RUSCICA A., SAHYOUN C., VELCEK F., 2014 Colonic atresia and anorectal malformation in a Haitian patient: a case study of rare diseases. *Springerplus* **3**: 1–4.
- DERIKX J. P. M., EVENNETT N. J., DEGRAEUWE P. L. J., MULDER T. L., BIJNEN A. A. VAN, HEURN L. W. E. VAN, BUURMAN W. A., HEINEMAN E., 2007 Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis. *Gut* **56**: 1473–1475.
- DERIKX J. P. M., LUYER M. D. P., HEINEMAN E., BUURMAN W. A., 2010 Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J. Gastroenterol.* **16**: 5272–5279.
- ECKBURG P. B., BIK E. M., BERNSTEIN C. N., PURDOM E., DETHLEFSEN L., SARGENT M., GILL S. R., NELSON K. E., RELMAN D. A., 2005 Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635–1638.
- ECKMANN L., STENSON W. F., SAVIDGE T. C., LOWE D. C., BARRETT K. E., FIERER J., SMITH J. R., KAGNOFF M. F., 1997 Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin H synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *J. Clin. Invest.* **100**: 296–309.
- EDELSON M. B., BAGWELL C. E., ROZYCKI H. J., 1999 Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* **103**: 766–771.
- ELLA E. E., AHMAD A. A., UMOH V. J., OGALA W. N., BALOGUN T. B., 2011 Comparative studies of breast milk immunoglobulin (Ig) A levels of lactating mothers with sick and healthy babies in Kaduna State, Nigeria. *Indian J. Allergy, Asthma Immunol.* **25**: 9–13.
- ERDOĞAN D., AZILI M. N., CAVUŞOĞLU Y. H., TUNCER I. S., KARAMAN I., KARAMAN A., OZGÜNER I. F., 2012 11-year experience with gastroschisis: factors affecting mortality and morbidity. *Iran. J. Pediatr.* **22**: 339–343.
- ERLANDSEN S. L., PARSONS J. A., TAYLOR T. D., 1974 Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man. *J. Histochem. Cytochem.* **22**: 401–413.
- EVENNETT N. J., HALL N. J., PIERRO A., EATON S., 2010 Urinary intestinal fatty acid-binding protein concentration predicts extent of disease in necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.* **45**: 735–740.

- FAN W., HUO G., LI X., YANG L., DUAN C., 2014 Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 133–143.
- FARQUHAR M. G., PALADE G. E., 1963 Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17**: 375–412.
- FIGUERAS-ALOY J., GÓMEZ-LÓPEZ L., RODRÍGUEZ-MIGUÉLEZ J., SALVIA-ROIGES M. D., JORDÁN-GARCÍA I., FERRER-CODINA I., CARBONELL-ESTRANY X., JIMÉNEZ-GONZÁLEZ R., 2007 Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am. J. Perinatol.* **24**: 331–338.
- FOXX-ORENSTEIN A. E., CHEY W. D., 2012 Manipulation of the gut microbiota as a novel treatment strategy for gastrointestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **1**: 41–46.
- GOLLIN G., MARKS W. H., 1993 Elevation of circulating intestinal fatty acid binding protein in a luminal contents-initiated model of NEC. *J. Pediatr. Surg.* **28**: 367–371.
- GROER M., DUFFY A., MORSE S., KANE B., ZARITT J., ROBERTS S., ASHMEADE T., 2014 Cytokines, chemokines, and growth factors in banked human donor milk for preterm infants. *J. Hum. Lact.* **30**: 317–323.
- GUILLET R., STOLL B. J., COTTEN C. M., GANTZ M., McDONALD S., POOLE W. K., PHELPS D. L., 2006 Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* **117**: 137–142.
- HÄGG M., BIVÉN K., UENO T., RYDLANDER L., BJÖRKLUND P., WIMAN K. G., SHOSHAN M., LINDER S., 2002 A novel high-through-put assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest. New Drugs* **20**: 253–259.
- HANSEN K., 2000 The pathology of necrotizing enterocolitis. In: Gilchrist BF (Ed.), *Necrotizing enterocolitis*, EUREKAH, pp. 69–75.
- HANSEN C. H., NIELSEN D. S., KVERKA M., ZAKOSTELSKA Z., KLIMESOVA K., HUDCOVIC T., TLASKALOVA-HOGENOVA H., HANSEN A. K., 2012 Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One* **7**: 1–7.
- HARRIS M. C., D'ANGIO C. T., GALLAGHER P. R., KAUFMAN D., EVANS J., KILPATRICK L., 2005 Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J. Pediatr.* **147**: 462–468.
- HECHT G., KOUTSOURIS A., POTHOLAKIS C., LAMONT J. T., MADARA J. L., 1992 Clostridium difficile toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* **102**: 416–423.
- HECHT G., POTHOLAKIS C., LAMONT J. T., MADARA J. L., 1988 Clostridium difficile toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **82**: 1516–1524.
- HOLMAN R. C., STEHR-GREEN J. K., ZELASKY M. T., 1989 Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am. J. Public Health* **79**: 987–989.

- HOLMAN R. C., STOLL B. J., CLARKE M. J., GLASS R. I., 1997 The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am. J. Public Health* **87**: 2026–2031.
- CHAMBERS J. A., HOLLINGSWORTH M. A., TREZISE A. E. O., HARRIS A., 1994 Developmental expression of mucin genes MUC1 and MUC2. *J. Cell Sci.* **107**: 413–424.
- CHEN H., JIANG H., KAN A., HUANG L., ZHONG Z., ZHANG Z., LIU J., 2014 Intestinal obstruction due to dual gastrointestinal atresia in infants: diagnosis and management of 3 cases. *BMC Gastroenterol.* **14**: 1–5.
- JILLING T., LU J., JACKSON M., CAPLAN M. S., 2004 Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Res.* **55**: 622–629.
- KAFETZIS D. A., SKEVAKI C., COSTALOS C., 2003 Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 349–355.
- KANDA T., FUJII H., TANI T., MURAKAMI H., SUDA T., SAKAI Y., ONO T., HATAKEYAMA K., 1996 Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology* **110**: 339–343.
- KARAGIANNI P., BRIANA D. D., MITSIAKOS G., ELIAS A., THEODORIDIS T., CHATZIOANNIDIS E., KYRIAKIDOU M., NIKOLAIDIS N., 2010 Early versus delayed minimal enteral feeding and risk for necrotizing enterocolitis in preterm growth-restricted infants with abnormal antenatal Doppler results. *Am. J. Perinatol.* **27**: 367–373.
- KHAILOVA L., MOUNT PATRICK S. K., ARGANBRIGHT K. M., HALPERN M. D., KINOUCI T., DVORAK B., 2010 *Bifidobacterium bifidum* reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**: 1118–1127.
- KLIEGMAN R. M., FANAROFF A. A., 1984 Necrotizing enterocolitis. *N. Engl. J. Med.* **310**: 1093–1103.
- KLIMESOVA K., KVERKA M., ZAKOSTELSKA Z., HUDCOVIC T., HRNCIR T., STEPANKOVA R., ROSSMANN P., RIDL J., KOSTOVCIK M., MRAZEK J., KOPECNY J., KOBAYASHI K. S., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2013 Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**: 1266–1277.
- KMONICKOVA E., KVERKA M., TLASKALOVA-HOGENOVA H., KOSTECKA P., ZIDEK Z., 2012 Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol. Lett.* **33**: 166–172.
- KOENIG J. E., SPOR A., SCALFONE N., FRICKER A. D., STOMBAUGH J., KNIGHT R., ANGENENT L. T., LEY R. E., 2011 Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 4578–4585.
- KOKESOVA A., FROLOVA L., KVERKA M., SOKOL D., ROSSMANN P., BARTOVA J., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2006 Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Folia Microbiol. (Praha)*. **51**: 478–484.

- KOSLOSKE A. M., BURSTEIN J., BARTOW S. A., 1980 Intestinal obstruction due to colonic stricture following neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann. Surg.* **192**: 202–207.
- KOVESI T., RUBIN S., 2004 Long-term complications of congenital esophageal atresia and/or tracheoesophageal fistula. *Chest* **126**: 915–925.
- KOZAKOVA H., KOLINSKA J., LOJDA Z., REHAKOVA Z., SINKORA J., ZAKOSTELECKA M., SPLICHAL I., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2006 Effect of bacterial monoassociation on brush-border enzyme activities in ex-germ-free piglets: comparison of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbes Infect.* **8**: 2629–2639.
- KRAMER G., SCHWARZ S., HÄGG M., HAVELKA A. M., LINDER S., 2006 Docetaxel induces apoptosis in hormone refractory prostate carcinomas during multiple treatment cycles. *Br. J. Cancer* **94**: 1592–1598.
- KVERKA M., BURIANOVA J., LODINOVA-ZADNIKOVA R., KOCOURKOVA I., CINOVA J., TUCKOVA L., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2007 Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clin. Chem.* **53**: 955–962.
- KVERKA M., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2013 Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS* **121**: 403–421.
- KVERKA M., ZAKOSTELSKA Z., KLIMESOVA K., SOKOL D., HUDCOVIC T., HRNCIR T., ROSSMANN P., MRAZEK J., KOPECNY J., VERDU E., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2011 Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin. Exp. Immunol.* **163**: 250–259.
- LA COCHETIERE M.-F. DE, PILOQUET H., ROBERT C. DES, DARMAUN D., GALMICHE J.-P., ROZE J.-C., 2004 Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatr. Res.* **56**: 366–370.
- LEBENTHAL A., LEBENTHAL E., 1999 The ontogeny of the small intestinal epithelium. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **23**: 3–6.
- LEDBETTER D. J., 2006 Gastroschisis and omphalocele. *Surg. Clin. North Am.* **86**: 249–260.
- LEERS M. P., KÖLGEN W., BJÖRKLUND V., BERGMAN T., TRIBBICK G., PERSSON B., BJÖRKLUND P., RAMAEKERS F. C. S., BJÖRKLUND B., NAP M., JÖRNVALL H., SCHUTTE B., 1999 Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* **187**: 567–572.
- LIN P. W., NASR T. R., STOLL B. J., 2008 Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin. Perinatol.* **32**: 70–82.
- LIN P. W., STOLL B. J., 2006 Necrotising enterocolitis. *Lancet* **368**: 1271–1283.
- LODINOVA-ZADNIKOVA R., CUKROWSKA B., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2003 Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**: 209–211.

- MA T. Y., IWAMOTO G. K., HOA N. T., AKOTIA V., PEDRAM A., BOIVIN M. a, SAID H. M., 2004 TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**: 367–376.
- MACK D. R., MICHAIL S., WEI S., MCDUGALL L., HOLLINGSWORTH M. A., 1999 Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* **276**: 941–950.
- MADSEN K., CORNISH A., SOPER P., MCKAIGNEY C., JIJON H., YACHIMEC C., DOYLE J., JEWELL L., SIMONE C. DE, 2001 Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* **121**: 580–591.
- MAHESHWARI A., SCHELONKA R. L., DIMMITT R. a, CARLO W. a, MUNOZ-HERNANDEZ B., DAS A., McDONALD S. a, THORSEN P., SKOGSTRAND K., HOUGAARD D. M., HIGGINS R. D., 2014 Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely-low-birth-weight infants. *Pediatr. Res.* **76**: 100–108.
- MANDAT SCHULTZ A. LE, BONNARD A., BARREAU F., AIGRAIN Y., PIERRE-LOUIS C., BERREBI D., PEUCHMAUR M., 2007 Expression of TLR-2, TLR-4, NOD2 and pNF-kappaB in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *PLoS One* **2**: 1–9.
- MANNOIA K., BOSKOVIC D. S., SLATER L., PLANK M. S., ANGELES D. M., GOLLIN G., 2011 Necrotizing enterocolitis is associated with neonatal intestinal injury. *J. Pediatr. Surg.* **46**: 81–85.
- MARQUES T. M., WALL R., ROSS R. P., FITZGERALD G. F., RYAN C. A., STANTON C., 2010 Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 149–156.
- MATSUO K., OTA H., AKAMATSU T., SUGIYAMA A., KATSUYAMA T., 1997 Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* **40**: 782–789.
- MCCRACKEN G. H., EICHENWALD H. F., 1971 Leukocyte function and the development of opsonic and complement activity in the neonate. *Am. J. Dis. Child.* **121**: 120–126.
- MCELHINNEY D. B., HEDRICK H. L., BUSH D. M., PEREIRA G. R., STAFFORD P. W., GAYNOR J. W., SPRAY T. L., WERNOVSKY G., 2000 Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease: risk factors and outcomes. *Pediatrics* **106**: 1080–1087.
- MCELROY S., UNDERWOOD M., SHERMAN M., 2013 Paneth cells and necrotizing enterocolitis: a novel hypothesis for disease pathogenesis. *Neonatology* **103**: 10–20.
- MCSWEEGAN E., BURR D. H., WALKER R. I., 1987 Intestinal mucus gel and secretory antibody are barriers to *Campylobacter jejuni* adherence to INT 407 cells. *Infect. Immun.* **55**: 1431–1435.
- MORAN J. R., COURTNEY M. E., ORTH D. N., VAUGHAN R., COY S., MOUNT C. D., SHERRELL B. J., GREENE H. L., 1983 Epidermal growth factor in human milk: daily production and diurnal variation during early lactation in mothers delivering at term and at premature gestation. *J. Pediatr.* **103**: 402–405.

- MOYA F. R., EGUCHI H., ZHAO B., FURUKAWA M., SFEIR J., OSORIO M., OGAWA Y., JOHNSTON J. M., 1994 Platelet-activating factor acetylhydrolase in term and preterm human milk: a preliminary report. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **19**: 236–239.
- MUCHANTEF K., EPELMAN M., DARGE K., KIRPALANI H., LAJE P., ANUPINDI S. a, 2013 Sonographic and radiographic imaging features of the neonate with necrotizing enterocolitis: correlating findings with outcomes. *Pediatr. Radiol.* **43**: 1444–1452.
- NEVALAINEN T. J., HAAPANEN T. J., 1993 Distribution of pancreatic (group I) and synovial-type (group II) phospholipases A2 in human tissues. *Inflammation* **17**: 453–464.
- NG P. C., LI K., LEUNG T. F., WONG R. P. O., LI G., CHUI K. M., WONG E., CHENG F. W. T., FOK T. F., 2006 Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants. *Clin. Chem.* **52**: 1181–1189.
- NG P. C., LI K., WONG R. P. O., CHUI K., WONG E., LI G., FOK T. F., 2003 Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **88**: 209–213.
- OCKNER R. K., MANNING J. A., 1974 Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J. Clin. Invest.* **54**: 326–338.
- OCKNER R. K., MANNING J. A., POPPENHAUSEN R. B., HO W. K. L., 1972 A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* **177**: 56–58.
- OLOFSSON M. H., UENO T., PAN Y., XU R., CAI F., KUIP H. VAN DER, MUERDTER T. E., SONNENBERG M., AULITZKY W. E., SCHWARZ S., ANDERSSON E., SHOSHAN M. C., HAVELKA A. M., TOI M., LINDER S., 2007 Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**: 3198–3206.
- OSTLIE D. J., SPILDE T. L., ST PETER S. D., SEXTON N., MILLER K. A., SHARP R. J., GITTES G. K., SNYDER C. L., 2003 Necrotizing Enterocolitis in Full-term Infants. *J. Pediatr. Surg.* **38**: 1039–1042.
- PENDER S. L. F., BRAEGGER C., GUNTHER U., MONTELEONE G., MEULI M., SCHUPPAN D., MACDONALD T. T., 2003 Matrix metalloproteinases in necrotising enterocolitis. *Pediatr. Res.* **54**: 160–164.
- PENDERS J., THUIS C., VINK C., STELMA F. F., SNIJDERS B., KUMMELING I., BRANDT P. A. VAN DEN, STOBBERINGH E. E., 2006 Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**: 511–521.
- PEREL Y., CECCATO F., BUCCO P., CHATEIL J. F., MICHEAU M., BARBIER R., GUILLARD J. M., 1988 Necrotizing enteritis during the therapeutic induction phase in leukemia. Value of surgical treatment. *Pediatric* **43**: 743–747.
- POLAK-CHARCON S., SHOHAM J., BEN-SHAUL Y., 1980 Tight junctions in epithelial cells of human fetal hindgut, normal colon, and colon adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **65**: 53–62.
- PORTER E. M., LIU L., OREN A., ANTON P. a, GANZ T., 1997 Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect. Immun.* **65**: 2389–2395.

- POURCYROUS M., KORONES S. B., YANG W., BOULDEN T. F., BADA H. S., 2005 C-reactive protein in the diagnosis, management, and prognosis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* **116**: 1064–1069.
- QUAISER K., 1952 A specially severe form of enteritis in newborn, enterocolitis ulcerosa necroticans. II. Clinical studies. *Osterr. Z. Kinderheilkd. Kinderfuersorge*. **8**: 136–152.
- REES C. M., EATON S., PIERRO A., 2010 National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units. *J. Pediatr. Surg.* **45**: 1391–1397.
- ROUWET E. V., HEINEMAN E., BUURMAN W. A., RIET G. TER, RAMSAY G., BLANCO C. E., 2002 Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period. *Pediatr. Res.* **51**: 64–70.
- ROUX M. E., MCWILLIAMS M., PHILLIPS-QUAGLIATA J. M., WEISZ-CARRINGTON P., LAMM M. E., 1977 Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J. Exp. Med.* **146**: 1311–1322.
- SAITO S., YOSHIDA M., ICHIJO M., ISHIZAKA S., TSUJII T., 1993 Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin. Exp. Immunol.* **94**: 220–224.
- SALZMAN N. H., POLIN R. a, HARRIS M. C., RUCHELLI E., HEBRA A., ZIRIN-BUTLER S., JAWAD A., MARTIN PORTER E., BEVINS C. L., 1998 Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Res.* **44**: 20–26.
- SANKARAN K., PUCKETT B., LEE D. S. C., SESHIA M., BOULTON J., QIU Z., LEE S. K., 2004 Variations in incidence of necrotizing enterocolitis in Canadian neonatal intensive care units. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**: 366–372.
- SÁNTULLI T. V., SCHULLINGER J. N., HEIRD W. C., GONGAWARE R. D., WIGGER J., BARLOW B., BLANC W. a, BERDON W. E., 1975 Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics* **55**: 376–387.
- SATO T., ES J. VAN, SNIPPERT H., STANGE D., VRIES R., BORN M. VAN DEN, BARKER N., SHROYER N., WETERING M. VAN DE, CLEVERS H., 2011 Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**: 415–418.
- SHARMA R., TEPAS III J. J., HUDAK M. L., MOLLITT D. L., WLUDYKA P. S., TENG R. J., PREMACHANDRA B. R., 2007 Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.* **42**: 454–461.
- SHO S., NEAL M. D., SPERRY J., HACKAM D. J., 2014 A novel scoring system to predict the development of necrotizing enterocolitis totalis in premature infants. *J. Pediatr. Surg.* **49**: 1053–1056.
- SCHANLER R. J., SHULMAN R. J., LAU C., 1999 Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics* **103**: 1150–1157.

- SCHMID K. O., 1952 A specially severe form of enteritis in newborn, enterocolitis ulcerosa necroticans. I. Pathological anatomy. *Osterr. Z. Kinderheilkd. Kinderfuersorge*. **8**: 114–135.
- SIMONOVIC I., ROSENBERG J., KOUTSOURIS A., HECHT G., 2000 Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell. Microbiol.* **2**: 305–315.
- SNYDER W. H., CHAFFIN L., 1954 Embryology and pathology of the intestinal tract: presentation of 40 cases of malrotation. *Ann. Surg.* **140**: 368–379.
- SONODA N., FURUSE M., SASAKI H., YONEMURA S., KATAHIRA J., HORIGUCHI Y., TSUKITA S., 1999 Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **147**: 195–204.
- STEPANKOVA R., SINKORA J., HUDCOVIC T., KOZAKOVA H., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 1998 Differences in development of lymphocyte subpopulations from gut-associated lymphatic tissue (GALT) of germfree and conventional rats: effect of aging. *Folia Microbiol. (Praha)*. **43**: 531–534.
- STEWART C. J., MARRS E. C. L., MAGORRIAN S., NELSON A., LANYON C., PERRY J. D., EMBLETON N. D., CUMMINGS S. P., BERRINGTON J. E., 2012 The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatr.* **101**: 1121–1127.
- STEWART C. J., MARRS E. C. L., NELSON A., LANYON C., PERRY J. D., EMBLETON N. D., CUMMINGS S. P., BERRINGTON J. E., 2013 Development of the preterm gut microbiome in twins at risk of necrotising enterocolitis and sepsis. *PLoS One* **8**: 1–9.
- STOLL B. J., HANSEN N. I., ADAMS-CHAPMAN I., FANAROFF A. a, HINTZ S. R., VOHR B., HIGGINS R. D., 2004 Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* **292**: 2357–2365.
- TLASKALOVA-HOGENOVA H., STEPANKOVA R., TUCKOVA L., FARRE M. a, FUNDA D. P., VERDU E. F., SINKORA J., HUDCOVIC T., REHAKOVA Z., CUKROWSKA B., KOZAKOVA H., PROKESOVA L., 1998 Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora. *Folia Microbiol. (Praha)*. **43**: 545–550.
- TLASKALOVA-HOGENOVA H., STERZL J., STEPANKOVA R., DLABAC V., VETICKA V., ROSSMANN P., MANDEL L., REJNEK J., 1983 Development of immunological capacity under germfree and conventional conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **409**: 96–113.
- TRAVADI J., PATOLE S., CHARLES A., DVORAK B., DOHERTY D., SIMMER K., 2006 Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr. Res.* **60**: 185–189.
- VARETTI C., MEUCCI D., SEVERI F., MAGGIO G. DI, BOCCHI C., PETRAGLIA F., MESSINA M., 2013 Intrauterine volvulus with malrotation: prenatal diagnosis. *Minerva Pediatr.* **65**: 219–223.
- WALSH M. C., KLIEGMAN R. M., 1986 Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr. Clin. North Am.* **33**: 179–201.

- WANG Y., HOENIG J. D., MALIN K. J., QAMAR S., PETROF E. O., SUN J., ANTONOPOULOS D. a, CHANG E. B., CLAUD E. C., 2009 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* **3**: 944–954.
- WEAVER L. T., ARTHUR H. M. L., BUNN J. E. G., THOMAS J. E., 1998 Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. *Arch. Dis. Child.* **78**: 235–239.
- WILLIAMS A. M., PROBERT C. S. J., STEPANKOVA R., TLASKALOVA-HOGENOVA H., PHILLIPS A., BLAND P. W., 2006 Effects of microflora on the neonatal development of gut mucosal T cells and myeloid cells in the mouse. *Immunology* **119**: 470–478.
- WILSON R., PORTILLO M. DEL, SCHMIDR E., FELDMAN R. A., KANTO W. P., 1983 Risk factor for necrotizing enterocolitis in infants weighing more than 2,000 grams at birth: a case-control study. *Pediatrics* **71**: 19–22.
- WRIGHT W. C., ANK B. J., HERBERT J., STIEHM E. R., 1975 Decreased bactericidal activity of leukocytes of stressed newborn infants. *Pediatrics* **56**: 579–584.
- YEE W. H., SORAISHAM A. S., SHAH V. S., AZIZ K., YOON W., LEE S. K., 2012 Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics* **129**: 298–304.
- ZAKOSTELSKA Z., KVERKA M., KLIMESOVA K., ROSSMANN P., MRAZEK J., KOPECNY J., HORNOVA M., SRUTKOVA D., HUDCOVIC T., RIDL J., TLASKALOVA-HOGENOVA H., 2011 Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* **6**: 1–11.
- ZHANG C., SHERMAN M. P., PRINCE L. S., BADER D., WEITKAMP J.-H., SLAUGHTER J. C., MCELROY S. J., 2012 Paneth cell ablation in the presence of *Klebsiella pneumoniae* induces necrotizing enterocolitis (NEC)-like injury in the small intestine of immature mice. *Dis. Model. Mech.* **5**: 522–532.
- ZHENG S.-J., LIU S., LIU M., MCCRAE M. A., LI J.-F., HAN Y.-P., XU C.-H., REN F., CHEN Y., DUAN Z.-P., 2014 Prognostic value of M30/M65 for outcome of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *World J. Gastroenterol.* **20**: 2403–2411.
- ZOETENDAL E. G., AKKERMANS A. D. L., VLIET W. M. A., VISSER J. A. G. M. DE, VOS W. M. DE, 2001 The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **13**: 129–134.