

Nove mogućnosti dijagnostike i liječenja nekrotizirajućeg enterokolitisa

Knežević, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:686100>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mislav Knežević

Nove mogućnosti dijagnostike i liječenja nekrotizirajućeg
enterokolitisa

DIPLOMSKI RAD



ZAGREB 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Zavodu za neonatologiju i neonatalnu intenzivnu medicinu pod vodstvom prof.dr.sc. Borisa Filipović-Grčića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

NEC – nekrotizirajući enterokolitis

VNPT – vrlo niska porođajna težina

ENPT – ekstremno niska porođajna težina

IL – interleukin

PVMK – protein koji veže masne kiseline

IGF 1 – inzulinu sličan čimbenik rasta

OLM – oligosaharidi ljudskog mlijeka

EGF – epidermalni faktor rasta

TGF- β – transformirajući faktor rasta β

AP – alkalna fosfataza

OTF – obitelj trefoil faktora

MKRL – masne kiseline razgranatih lanaca

EPO – eritropoetin

HK – hiperbarični kisik

Sadržaj

Sažetak.....	5
Abstract	Error! Bookmark not defined.
Uvod u nekrotizirajući enterokolitis	1
Nove metode detekcije NEC-a	5
Interleukini (IL).....	5
Proteini koji vežu masne kiseline (PVMK)	6
Žučne soli.....	7
Kalprotektin	7
Klaudini	8
Nadziranje varijabilnosti srčane aktivnosti	8
Nove metode liječenja NEC-a.....	9
Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF 1)	9
Oligosaharidi ljudskog mlijeka (OLM)	9
Obitelj epidermalnog faktora rasta (EGF obitelj).....	10
Transformirajući faktor rasta β (TGF- β).....	12
Alkalna fosfataza (AP)	13
Vitamin A.....	13
Obitelj trefoil faktora (OTF).....	14
Masne kiseline razgranatih lanaca (MKRL).....	15
Eritropoetin (EPO)	15
Kisik i ozon	16
Pravilna enteralna prehrana	17
Zaključak	19
Zahvale.....	22
Literatura	23
Životopis	32

Sažetak

Nove mogućnosti dijagnostike i liječenja nekrotizirajućeg enterokolitisa

Mislav Knežević

Nekrotizirajući enterokolitis (NEC) je devastirajuća bolest koju je ujedno teško liječiti u učinkovito predvidjeti njen razvoj. Ovaj rad daje kratki uvod u etiologiju NEC-a i njegovu epidemiologiju. Na to se nastavlja karakterizacija patologije i patogeneze, zajedno sa simptomatologijom, kliničkim, radiološkim i biokemijskim metodama otkrivanja.

Na uvod se nadovezuje pregled novih metoda otkrivanja. Većina njih se fokusira na pronalaženje specifičnih biljega u krvi, ali razvijaju se i novi, manje invazivni postupci. Oni su navedeni sljedećim redoslijedom: interleukini, proteini koji vežu masne kiseline, žučne kiseline, kalprotektin, klaudin i neinvazivne metode temeljene na praćenju elektrofizioloških promjena u tijelu.

Još značajniji broj istraživanja usmjeren je na pronalaženje novih načina liječenja i prevencije NEC-a. Nove moguće metode i tehnike liječenja koje su opisane uključuju: inzulinu sličan čimbenik rasta, oligosaharide ljudskog mlijeka, obitelj epidermalnog faktora rasta, transformirajući faktor rasta β , enzim alkalnu fosfatazu, vitamin A, obitelj trefoil faktora, masne kiseline razgranatih lanaca, eritropoetin, kisik i ozon. Poseban naglasak je stavljen na ulogu majčinog mlijeka kao izvora velikog broja čimbenika korisnih u prevenciji i liječenju NEC-a. Cilj ovoga članka je dati sažeti opis NEC-a i detaljnu analizu recentnih istraživanja novih metoda detekcije i liječenja te bolesti.

Ključne riječi: nekrotizirajući enterokolitis, detekcija, liječenje

Summary

Novel advances in diagnosis and treatment of necrotizing enterocolitis

Mislav Knežević

Necrotizing enterocolitis (NEC) is a devastating disease that is difficult to treat, and it is especially difficult to effectively predict its development. This paper gives a brief introduction to the etiology of NEC and its epidemiology, followed by a characterization of the pathology and pathogenesis, as well as symptomatology, clinical, radiological, and biochemical methods of detection.

The introduction is followed by the review of detection methods. Most of them are focused on finding specific blood markers, but there are also a lot of novel and less invasive procedure being developed. They are listed as follows: interleukins, fatty acid binding proteins, bile acids, calprotectin, claudin, and noninvasive methods based upon tracking electrophysiological changes in the body.

Many more studies were aimed at finding new ways of treatment and prevention.

New possible treatment methods and techniques are briefly described: insulin-like growth factor, human milk oligosaccharides, epidermal growth factor family, transforming growth factor β , an enzyme – alkaline phosphatase, vitamin A, trefoil factor family, branch chain fatty acids, erythropoietin, oxygen, and ozone. Particular emphasis is given to the role of maternal milk as a source of many of biochemical factors in prevention and even treatment of NEC. The goal of this article is to give a brief review of what NEC is and to present a thorough analysis of recent developments in screening for and treatment of the disease.

Key words: necrotizing enterocolitis, detection, treatment

Uvod

Nekrotizirajući enterokolitis je akutna upalna bolest crijeva koja pogađa novorođenčad i uzrokuje nekrozu crijevnog zida koja može dovesti do perforacije, sepse i sustavnog zatajenja organa. Jedan je od vodećih uzroka smrti i pobolijevanja nedonoščadi.

Etiologija još nije u potpunosti razjašnjena i velik se broj čimbenika povezuje uz razvoj NEC-a. Na prvom mjestu nalaze se nedonošenost i niska porođajna težina, koja je često vezana uz skraćen period gestacije. Značajni čimbenici su i porođajne komplikacije i nepravilna enteralna prehrana. Među ostalim mogućim uzrocima nalazimo respiratorne bolesti, srčane malformacije, promjene u crijevnom mikrobiomu, porod carskim rezom, materalni dijabetes, prekomjerno korištenje antibiotika, korioamnionitis, preeklampsiju, prenatalno izlaganje indometacinu i uporaba istog za zatvaranje *ductus arteriosusa* (Botalli) i brojne druge.

NEC u 90% slučajeva pogađa prerano rođenu djecu. Rizik raste sa kraćim trajanjem trudnoće i nižom porođajnom težinom, tako da 12% novorođenčadi vrlo niske porođajne težine (VNPT) oboli, a 30% zahvaćenih podlegne bolesti. On je i jedan od glavnih čimbenika rasta cijene zdravstvenih usluga tako da se do 19% novca namijenjenog novorođenčadi utroši za liječenje NEC-a.

Nekrotizirajući enterokolitis primarno zahvaća debelo crijevo, iako može zahvatiti i tanko crijevo ili oba. Uglavnom uzrokuje mjestimične lezije i ne zahvaća crijevo u kontinuitetu. Može rezultirati lezijama različite debljine, protežući se od sloja epitela do potpune perforacije crijeva. NEC je popraćen intestinalnim edemom, krvarenjem unutar crijevnog zida i crijevnom pneumatozom, tj. nakupljanjem mjehurića plina u

stijenci crijeva. Brojni pacijenti sa lezijama cijele debljine crijeva razviju adhezije koje mogu poremetiti normalnu funkciju crijeva i dovesti do daljnjih komplikacija.

Patogeneza je komplicirana brojnim čimbenicima koji su istovremeno prisutni i međusobno pogoršavaju jedni druge. Ishemija je čimbenik za koju se vjeruje da je rezultat nedovoljno razvijene intestinalne opskrbe krvlju ili disfunkcijom autonomnog živčanog sustava, popraćena kolonizacijom patogenih bakterija. Povećana osjetljivost na oštećenje izazvano bakterijama mogla bi biti posljedica nedovoljne razvijenosti selektivne crijevne barijere. U kombinaciji, ovi čimbenici uzrokuju lezije koje povećavaju propusnost crijeva i stvaraju okoliš poticajan za razvoj bakterija što u konačnici dovodi do pogoršanja upale.

Bolest se prezentira raznolikim simptomima koji se protežu od netolerancije hrane, stagnacije u dobivanju mase ili čak gubitkom težine, povraćanjem, vrućicom, distendiranim abdomenom i krvavim stolicama. Kasnije, kada nastupi dehidracija, dijete postaje hipotonično, hipotenzivno, tahikardno, acidotično i kao rezultat toga dispnoično i u konačnici gubi svijest.

NEC se dijagnosticira kombinacijom kliničkih metoda, tj. obraćanjem posebne pozornosti na prerano rođenu djecu i tragajući za mogućom pojavom simptoma, te uporabom radioloških metoda i krvnih pretraga. Značajni radiološki znaci NEC-a su distendirana crijeva i znakovi ileusa. Uz to, važan znak je i intestinalna pneumatoza, tj. nalaz mjehurića plina u crijevnom zidu. Kasnija perforacija može dovesti do nakupljanja zraka ispod ošita koji se najbolje vidi u uspravnom stavu, odnosno u najvišem području trbušne šupljine. Još jedan važan korak u postavljanju dijagnoze je analiza kompletne krvne slike te biokemijskih i mikrobioloških pretraga. Smanjenje broja eritrocita upućuje na moguće krvarenje. Povećanje broja neutrofila u svezi sa povišenom vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP) ukazuje na prisutnost upale i

infekcije. Bitno je za napomenuti da i značajno smanjenje broja neutrofila korelira sa lošijim zdravstvenim ishodom. Broj trombocita zajedno sa koagulacijskim parametrima pokazatelj je sklonosti krvarenju. Acido-bazni status i koncentracije elektrolita ukazuju na stanje hidracije. Mikrobiološka analiza stolice i krvi su potrebne zbog povezanosti NEC-a sa razvojem sepse.

Težina nekrotizirajućeg enterokolitisa klasificira se po Bellovim kriterijima.

Modificirani Bellovi kriteriji	Klinički znakovi	Radiološki znakovi	Gastrointestinalni znakovi
1	Apneja, bradikardija i promjene temperature	Bez patološkog nalaza ili blagi znaci ileusa	Blago distendiran abdomen, okultna krv u stolici, zaostajanje želučanog sadržaja
2a	Apneja, bradikardija i promjene temperature	Distendirana crijeva i fokalna pneumatoza	Blaga distenzija, hematohezija, odsutna peristaltika
2b	Metabolička acidoza i trombocitopenija	Rasprostranjena pneumatoza, zrak u portalnoj veni, ascites	Abdominalna bolnost i edem

3a	Kombinirana acidoza, koagulopatija, hipotenzija i oligurija	Izrazita distenzija crijeva, ascites, baz pneumoperitoneja	Edem trbušnog zida, eritem i tvrdoća
3b	Šok, pogoršanje vitalnih znakova i laboratorijskih nalaza	Pneumoperitonej	Perforacija crijeva

1

Intenzitet liječenja proporcionalan je težini bolesti i uključuje nekirurške metode i kirurške u najtežim slučajevima. Tradicionalno je konzervativni tretman ograničen na potporno liječenje koje uključuje prestanak enteralnog hranjenja i dekompresiju crijeva koja se postiže postavljenjem gastričnog katetera. Zadovoljavajući unos hranjivih tvari osigurava se parenteralnim hranjenjem koje se provodi putem perifernog ili centralnog venskog katetera. Dehidracija i poremećaji acido-baznog i elektrolitskog statusa korigiraju se primjenom odgovarajućih otopina. Različiti krvni derivati mogu biti potrebni kako bi se korigirao gubitak krvi ili specifičnih faktora koagulacije, ali oni isto tako mogu povećati rizik od nepovoljnih zdravstvenih ishoda. Antibiotici se primjenjuju za prevenciju infekcija i liječenje u slučaju njihove pojave, ali oni ujedno oštećuju i prirodnu, protektivnu crijevnu floru što onda čini crijeva ranjivijima. Konačno, u najtežim slučajevima, kirurški zahvat može biti neizbježan kako bi se odstranilo devitalizirano tkivo. Nepobitno je da dojenčad teško ponosi operativne zahvate koji uz to nose i rizik dugoročnih probavnih komplikacija. Ovaj rad prikazuje nove metode koje bi povećale otpornost intestinalnog zida i, uz to, osnažile

njegovu mogućnost oporavka kako bi izbjegli primjenu agresivnijih metoda liječenja. Te nove metode mogle bi imati pozitivan učinak na opće zdravlje novorođenčeta.

Nove metode detekcije NEC-a

Interleukini (IL)

Interleukini su obitelj koja se sastoji od više od trideset bjelančevina koji igraju važnu ulogu u imunoregulaciji i drugim tjelesnim procesima. Uglavnom ih proizvode T pomagački limfociti, ali isto tako i monociti, makrofazi, dendritičke stanice, B limfociti i endotelne stanice. Najvažniji među njima su IL 1, IL 6, IL 8, IL 10. IL 1 ima dvije podvarijante: alfa i beta. One obje potpomažu upalu putem stimulacije T i B limfocita i NK stanica,² djelujući preko dva receptora, CD121a/IL1R1 i CD121b/IL1R2 koji postoje i u solubilnom i u transmembranskom obliku.³ IL 6, ujedno poznat pod imenom stimulirajući faktor B stanica 2 i interleukin beta 2, igra važnu ulogu u završnoj diferencijaciji B limfocita u plazma stanice i u proizvodnji imunoglobulina.⁴ On postiže svoj učinak kroz stimulaciju CD126+CD130 receptorskog kompleksa.² IL 8 primarno je uključen u akutnu fazu upale i ima ulogu promotora upalnog stanja. Funkcionira kao kemokin koji privlači neutrofile i značajno sudjeluje u njihovoj aktivaciji.⁵ To postiže preko CXCR1 i CXCR2 receptora.² IL 10 ima ključnu protuupalnu ulogu i inhibira proizvodnju brojnih drugih citokina. Reducira aktivaciju T pomagačkih stanica i postiže svoj učinak preko CD 210 receptora.²

Pokazano je da je IL 1 prisutan u prekomjernim količinama na mjestima crijevne upale u novorođenčadi sa NEC-om,⁶ ali istraživanja su pokazala da on možda nije primjeren biljeg jer mu serumske razine nisu bile povišene. Štoviše, antagonist receptora IL 1 mogao bi biti bolji izbor jer njegove koncentracije u serumu i slini snažno koreliraju s razvojem NEC-a.⁷

Dokazano je da su IL 6 i IL 8 odlični pokazatelji intestinalne ozljede⁸ i da su razine IL 8 u serumu posebno korisne za otkrivanje nekrotizirajućeg enterokolitisa.⁹ Isto tako, može se koristiti i kao rani pokazatelj nepovoljnog ishoda zato što koncentracije u serumu snažno koreliraju sa šezdesetodnevnom mortalitetom.¹⁰ Nadalje, u istraživanjima dokazano je da bi se povišene koncentracije IL 6 i IL 8 mogle koristiti za razlikovanje između NEC-a i netolerancije hrane i za procjenu težine oštećenja crijevnog zida.¹¹ To bi omogućilo značajno brži i prikladniji terapijski odgovor zato što ta dva stanja u početku mogu imati vrlo sličnu simptomatologiju.

Proteini koji vežu masne kiseline (PVMK)

Proteini koji vežu masne kiseline su obitelj od deset proteina koji su uključeni u transmembranski i unutarstanični prijenos masnih kiselina, eikozanoida, žučnih kiselina i peroksisomalnih proliferatora. Ekspimirani su u cijelom tijelu, posebice u tkivima koja su intenzivno uključena u metabolizam masti. PVMK 1-9 nazvani su prema tkivima u kojima su primarno identificirani i u kojima su prisutni u najvećim količinama, ali se ne nalaze isključivo u tim tkivima.¹² Iz perspektive pedijatrijske skrbi najinteresantniji su jetreni PVMK 1¹³ i intestinalni PVMK 2¹⁴. Utvrđeno je da su povišene koncentracije jetrenog i intestinalnog PVMK u plazmi, a pogotovu u urinu, dobri indikatori intestinalnog oštećenja i ishemije neovisno o podležućem uzroku.^{15,16} Pokazano je da bi se povišene koncentracije intestinalnog PVMK u urinu i serumu, ponekad u kombinaciji sa drugim faktorima, mogle koristiti za identifikaciju novorođenčadi s povišenim rizikom od razvoja NEC-a.¹⁷ Isto tako, mogle bi se koristiti za rano otkrivanje^{18,19} i određivanje težine bolesti te razlučivanje između kirurških i nekirurških oblika NEC-a.^{20,21,22} S druge strane, povišene koncentracije intestinalnog PVMK u serumu povezane su sa akutnom ozljedom bubrega,²³ a

povišene koncentracije u urinu mogu se naći kod kroničnog oštećenja glomerula.²⁴

Budući da nedonoščad nerijetko ima određen stupanj bubrežne disfunkcije to sugerira da se PVMK zbog niske selektivnosti ne mogu sami koristiti za dijagnosticiranje NEC-a.

Žučne soli

Žučne soli su produkt metabolizma kolesterola u jetri. Konjugiraju se sa taurinom i glicinom kako bi postale topljive u vodi i u kombinaciji sa ionima natrija i kalija daju žučne soli.²⁵ One primarno funkcioniraju kao sredstvo smanjenja površinske napetosti i omogućuju apsorpciju masti i vitamina topljivih u mastima, ali ujedno mogu i igrati ulogu signalnih molekula i proupalnih tvari.²⁶ Nedavna istraživanja ukazuju na to da bi se povišene koncentracije žučnih soli u uzorcima stolice mogle koristiti kao prediktor razvoja NEC-a.²⁷ Ovo bi moglo biti objašnjeno činjenicom da one povećavaju intestinalnu propusnost utječući na *zonule occludens*.²⁸

Kalprotektin

Kalprotektin je heterooligomer sastavljen od dva proteina: S100A8 i S100A9, koji ulaze u međusobnu interakciju u prisutnosti kalcija.²⁹ Predominantno je prisutan u citosolu neutrofila, ali se može naći i u monocitima i makrofazima.³⁰ Zbog tog svojstva on je izvrstan pokazatelj upale. Humane studije su pokazale da se bi se koncentracija kalprotektina u urinu mogla koristiti kao indikator rizika za razvoj NEC-a.^{19,20} Isto tako, dokazano je da transfuzije eritrocita povisuju razinu kalprotektina u stolici.³¹ To je značajno zbog činjenice da su transfuzije dokazan čimbenik rizika.

Klaudini

Klaudini su obitelj transmembranskih proteina koji igraju vitalnu ulogu u funkcioniranju *zonula occludens* između epitelnih i endotelnih stanica. Oni ujedno sudjeluju u regulaciji permeabilnosti, međustaničnoj kontaktnoj signalizaciji i proteinsko-proteinskim interakcijama.³² Istraživanja na novorođenčadi pokazala su da bi povišene koncentracije klaudina 2 u uzorcima urina mogle biti korištene kao sredstvo detekcije razvoja NEC-a.^{20,33} Razlog tomu je činjenica da je kladin pokazatelj integriteta crijevne barijere, tj. oštećenjem crijeva dolazi do otpuštanja klaudina u krvotok i on biva filtriran u mokraću. Treba uzeti u obzir da su povišene koncentracije klaudina 2 nađene u *histološkim* uzorcima tkiva bubrega u animalnom modelu nekrotizirajućeg enterokolitisa.³⁴ To dovodi u pitanje razinu specifičnosti koju možemo postići kroz uzorke urina jer bi klaudini mogli potjecati iz bubrežnog, a ne intestinalnog tkiva.

Nadziranje varijabilnosti srčane aktivnosti

S obzirom na visoku incidenciju NEC-a među nedonoščadi i visoku cijenu testova i potrebne opreme za nadzor te rizik vezan uz invazivne postupke, nova, neinvazivna i jednostavna metoda za predviđanje rizika od NEC-a značajno bi unaprijedila neonatalnu skrb. S obzirom na činjenicu da su i srčani ritam i intestinalna funkcija pod regulacijom vagusa, pretpostavljeno je da bi se nadziranje varijabilnosti srčane aktivnosti moglo koristiti za rano otkrivanje NEC-a. Najnovije studije na animalnim fetusima ukazuju na to da specifične promjene srčanog ritma direktno koreliraju sa intenzitetom intestinalne upale, razinom interleukina, aktivnošću makrofaga i propusnošću crijevnog zida.^{35,36}

Nove metode liječenja NEC-a

Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF 1)

Inzulinu sličan čimbenik rasta je peptidni hormon koji se sastoji od četiri domene: A, B, C i D. Primarno mjesto proizvodnje mu je u jetri, ali IGF 1 se može naći u čitavom tijelu uključujući osteoblaste, stanice skeletnih mišića, renalne stanice, itd. Glavni poticaj za njegovu proizvodnju dolazi od hormona rasta, iako inzulin, status uhranjenosti i drugi čimbenici mogu utjecati na njegovu proizvodnju.³⁷ On je jedan od najpotentnijih anaboličkih hormona u ljudskom tijelu te se može naći i u ljudskom mlijeku. Zamijećena je pozitivna korelacija između viših koncentracija u mlijeku i povećane brzine rasta novorođenčadi.³⁸ S druge strane, niske razine IGF-a u serumu nedonoščadi povezane su sa razvojem brojnih bolesti uključujući NEC, bronhopulmonalnu displaziju, intrentrikularno krvarenje, i usporenjem razvoja mozga i mrežnice.³⁹ U animalnim studijama je dokazano da intraperitonealne injekcije IGF-a mogu umanjiti intestinalnu apoptozu i nekrozu kao posljedice hipoksije⁴⁰ i da enteralni unos može reducirati upalu, incidenciju NEC-a i njegov intenzitet.⁴¹

Oligosaharidi ljudskog mlijeka (OLM)

Oligosaharidi ljudskog mlijeka su skupina od otprilike dvjesto oligosaharida koji su sastavljeni od oko dvadeset i pet različitih monosaharida. Njihov broj u mlijeku varira od majke do majke u rasponu od dvadeset i tri do stotinu i trideset. Većina njih koriste se kao prebiotici za prehranu intestinalne flore budući da nisu probavljivi.⁴² Dokazano je da kombinacija kratkolančanih galaktooligosaharida i dugolančanih fruktooligosaharida može značajno sniziti incidenciju NEC-a.⁴³ U pokušaju da se

izdvoje specifični oligosaharidi odgovorni za taj učinak poduzete su dodatna istraživanja. Ona ukazuju na to da određeni oligosaharidi, tj. 3-sialillaktoza i 3-sialil-3-fruktozillaktoza mogu reducirati adheziju leukocita na endotelne stanice što bi moglo uzrokovati protuupalne učinke.⁴⁴ Nadalje, pokazano je da disialillakto-N-tetraoza (DSNT) može reducirati incidenciju NEC-a i kod štakora i kod ljudi.⁴⁵ DSNT u mlijeku mogao bi se koristiti i kao neinvazivni biljeg za rizik od razvoja NEC-a.⁴⁶ Isto tako, na animalnim modelima je dokazano da 2-fruktozillaktoza ima protektivan učinak na crijevno zdravlje, ali on nije toliko izražen kao kod DSNT-a. Sami galaktooligosaharidi ne pružaju nikakav pozitivan učinak.⁴⁷

Određena istraživanja dovode prethodno navedene zaključne u pitanje. Jedna studija je pokazala da kombinacija galaktooligosaharida uz dugolančane fruktooligosaharide i kisele oligosaharide ne smanjuje intestinalnu permeabilnost.⁴⁸ Nadalje, recentne animalne studije ukazuju na to da iako OLM umanjuju intenzitet upale, oni ne mijenjaju incidenciju NEC-a i njihova primjena mogla bi povećati vjerojatnost pojave dehidracije i proljeva.⁴⁹

Obitelj epidermalnog faktora rasta (EGF obitelj)

Obitelj epidermalnog faktora rasta je skupina peptida koja se sastoji od epidermalnog faktora rasta (EGF), EGF-u sličnog čimbenika rasta koji veže heparin (HB-EGF), transformirajućeg čimbenika rasta α (TGF- α), amfiregulina, betacelulina, epregulina, i četiri neuregulina. Svi oni dijele sličnu ulogu i strukturu i funkcioniraju kao ligandi za obitelj receptora epidermalnih čimbenika rasta (EGFR). Obitelj EGFR sastoji se od četiri člana: ErbB1 (HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4).⁵⁰ Iz perspektive pedijatrije najbolje proučeni članovi EGF obitelji su HB-EGF i EGF. Oba

se mogu naći u humanom mlijeku, s time da je EGF prisutan u dva do tri puta višoj koncentraciji.⁵¹ Ujedno je utvrđeno i da se koncentracija EGF-a ne mijenja s obzirom na duljinu trudnoće.⁵² S druge strane, dokazano je da se razine u *slini* novorođenčeta mijenjaju ovisno o duljini gestacije. Niže razine koreliraju sa prematuritetom i ujedno su snažno povezane sa rizikom razvoja NEC-a.⁵³ Nadalje, animalne studije ukazuju da enteralna primjena EGF-a ujedno reducira i rizik od pojave NEC-a i njegov intenzitet.⁵⁴ Ti učinci mogli bi se djelomično objasniti činjenicom da je na animalnim modelima dokazano da EGF smanjuje razine proupalnih citokina, primarno IL 18 i povisuje razine protuupalnih poput IL 10.⁵⁵ Daljnje životinjske studije su dokazale njegov antiapoptotički učinak koji se postiže kroz smanjenje aktivnosti kaspaze 3 i Bax proteina i pojačanje ekspresije antiapoptotičkog Bcl-2.⁵⁶ uz to, na štakorskom modelu je dokazano da EGF štiti nepropusnost intestinalne barijere kroz smanjenje crijevne međustanične propusnosti, normalizaciju ekspresije dva glavna proteina u *zonuli occludens*, tj. okcludina i kladina 3 i povećanjem gustoće vrčastih stanica i proizvodnje mucina u ileumu.⁵⁷

HB-EGF je nekolicinom istraživanja dokazan kao bitan čimbenik u borbi protiv nekrotizirajućeg enterokolitisa. Jedna od njih sa HB-EGF ((-/-)) „knock-out“ miševima demonstrirala je visoku podložnost razvoju NEC-a koja se može umanjiti naknadnom enteralnom primjenom HB-EGF-a.⁵⁸ Još jedno istraživanje koristilo je suprotan pristup u kojem su transgenični miševi sa pretjeranom ekspresijom gena za HB-EGF izloženi uvjetima eksperimentalno izazvanog NEC-a. Kod njih je incidencija bolesti i intestinalna propusnost bila drastično snižena.⁵⁹ HB-EGF ostvaruje svoj učinak kroz nekoliko mehanizama. Jedan od njih je značajno povišenje crijevnog mikrovaskularnog protoka krvi.⁶⁰ Drugi uključuje citoprotektivne učinke na crijevne stanice izložene hipoksiji i pojačanje mogućnosti oporavka i stanične proliferacije.⁶¹

Isto tako, za HB-EGF je dokazano da smanjuje ekspresiju adhezijskih molekula kao što su endotelni i trombocitni selektini te međustanične adhezijske molekule 1 (ICAM 1) i adhezijske molekule vaskularnih stanica 1 (VCAM 1). Nadalje, na animalnim modelima smanjuje infiltraciju polimorfonuklearnim stanicama.⁶² HB-EGF smanjuje i proizvodnju kisikovih radikala u intestinalnim stanicama izloženim stresu⁶³ i ujedno smanjuje apoptozu kao posljedicu upale i *in vitro* modelima.⁶⁴

Transformirajući faktor rasta β (TGF- β)

Transformirajući faktor rasta β podijeljen je u tri podskupine signalnih peptida: TGF- β *sensu stricto*, koštane morfogene proteine i aktivine.⁶⁵ Sam TGF- β ima četiri strukturno vrlo slične podvarijante koje igraju ulogu u brojnim staničnim interakcijama.^{66,67} Čini se da je TGF- β 2 najvažniji član te skupine kada se radilo o potencijalnim pozitivnim učincima na crijevno zdravlje. U istraživanjima na životinjama je dokazano da snižena ekspresija TGF- β 2 pozitivno korelira sa razvojem NEC-a.⁶⁸ Nadalje, dokazano je da on ima protuupalna svojstva i mogućnost reduciranja stresnog odgovora u intestinalnim stanicama što je posljedica moduliranja ekspresije oko dvadeset različitih bjelančevina.⁶⁹ U *in vitro* uvjetima i na mišjem modelu je pokazano da TGF- β 2 reducira aktivnost intestinalnih makrofaga i promovira njihovu neupalnu diferencijaciju tijekom razdoblja gestacije. Ovo je jedan od brojnih razloga, povezanih sa skraćenim trajanjem trudnoće, zbog kojih nedonoščad ima povećan rizik od razvoja NEC-a.⁷⁰ Isto tako, TGF- β je prisutan u ljudskom mlijeku i dokazano je da mu je bioaktivnost snižena u majki koje su imale kraću trudnoću. Bitno je za napomenuti da se latentni TGF- β može enzimatski aktivirati uporabom *neuraminidaze*.⁷¹ Dodatna istraživanja su poduzeta sa svrhom utvrđivanja učinka dodavanja rekombiniranog TGF- β 2 ljudskom mlijeku nisu polučila

željeni uspjeh radi vezanja TGF- β 2 na hondroitin sulfat. Enzimatski tretman mlijeka s *hondroitinazom* povećava aktivnost endogenog i egzogenog TGF- β 2.⁷²

Alkalna fosfataza (AP)

Alkalna fosfataza homodimerni je enzim prisutan u brojnim organizmima. Njegova uloga je katalizacija reakcije defosforilacije u lužnatim uvjetima. Ljudi imaju četiri podvarijante tog enzima: intestinalna (IAP), placentalna, tkivno nespecifična (tip jetra-kost-bubreg) i AP zametnih stanica. Imenovane su prema tkivu u kojem se najprisutnije, ali se mogu naći i u drugim organima.⁷³ Najbolje istražena je intestinalna varijanta. Enteralna suplementacija IAP-om se pokazala kao učinkovit način snižavanja ekspresije proupalnih citokina u crijevima i nitrozativnog stresa na životinjskim modelima.⁷⁴ Isto tako, na animalnim modelima, dokazano je da enteralna suplementacija može smanjiti sustavne razine IL-1 β , IL-6 i TNF- α te da se učinak pojačava povišenjem doze.⁷⁵ Dodatne studije na životinjama su ukazale da je aktivnost IAP snižena u probavnom sustavu koji je zahvaćen NEC-om i da se dodatkom IAP prehrani može smanjiti intenzitet intestinalne ozljede i popraviti integritet crijeвне barijere.^{76,77}

Vitamin A

Vitamin A je generički naziv koji obuhvaća veliku skupinu spojeva. Retinol i esteri retinila nazivaju se vitaminom A u užem smislu, a β -karoten i ostali karotenoidi zovu se previtaminom A. Oni mogu biti konvertirani u retinol u tijelu koji se može konvertirati u retinal i, u konačnici, u retinoičnu kiselinu. Vitamin A je topljiv u mastima i skladišti se u jetri. On igra ulogu u brojnim tjelesnim procesima te je uključen u

regulaciju genske ekspresije.⁷⁸ Dokazano je da novorođenčad VNPT predominantno ima snižene koncentracije vitamina A u plazmi.⁷⁹ Isto tako, na animalnim modelima je dokazano da intraperitonealna primjena visokih doza vitamina A može poboljšati intestinalno cijeljenje nakon ozljede, smanjiti *vlažnu* težinu kolona (predstavlja prisutnost edema crijevne stijenke) te ubrzati dobivanje na težini.⁸⁰ Određene studija ispitivale su specifične molekularne mehanizme kojima vitamin A postiže svoje učinke. *In vitro* je dokazano da trans-retinoična kiselina može povećati ekspresiju TGF- β 2, čija je uloga već objašnjena ranije u tekstu.⁸¹ Uz to, na štakorima je dokazano da bi još jedan od mehanizama mogao uključivati smanjenje ekspresije TNF- α i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su superoksid dizmutaza i glutation peroksidaza.⁸²

Obitelj trefoil faktora (OTF)

Obitelj trefoil faktora sastoji se od tri mala peptida koji se stvaraju u stanicama koje proizvode sluz u brojnim tkivima.⁸³ Najveća količina njih može se naći u probavnom traktu. OTF 1 (poznat i pod imenom SP2), OTF 2 (SP) i OTF 3 (TFI) su u obilju prisutni u želucu, kolonu i *ductusu pancreaticusu*, a OTF 1 i 3 mogu naći i u drugim dijelovima probavnog trakta.⁸⁴ Sva tri spoja prisutna su i u ljudskom mlijeku, s tim da su koncentracije OTF 3 najviše. Razine OTF-a u mlijeku značajno padaju u prvih nekoliko tjedana nakon poroda.⁸⁵ Dokazano je da enteralna primjena tih spojeva značajno ublažava intenzitet kolitisa i da OTF 3 ima najpotentniji učinak. S druge strane, na štakorskim modelima je dokazano da supkutana primjena pojačava upalu u crijevima.⁸⁶ Za OTF 3 dokazano je da bi mogao biti učinkovit u prevenciji NEC-a.⁸⁷ Za njega je dokazano da ima snažna protuupalna svojstva s mogućnošću redukcije ekspresije IL 8, TNF- α , prostaglandina E2, tromboksana B2, dušikovog oksida i

malondialdehida u intestinalnom tkivu. Još jedan od razloga koji objašnjava protektivna svojstva OTF-a je njihova mogućnost interakcije s mucinima kako bi stvorili gušću i viskoznu sluz. OTF 2 se dokazao kao najučinkovitiji u postizanju tog zadatka.⁸⁸

Masne kiseline razgranatih lanaca (MKRL)

Masne kiseline razgranatih lanaca su uglavnom zasićene, metilirane masne kiseline. Kategorizirane su kao mono-, di- ili multimetilirane MKRL s obzirom na broj metilnih skupina. U unutarnjim organima prisutne su u vrlo malim količinama, ali ih se može naći u koži i čine ključni udio od 10-29% *vernix caseosa*, tj. kremaste bijele tvari koja prekriva novorođenčad. Nadalje, može ih se naći i u ljudskom mlijeku.⁸⁹ Dokazano je *in vitro* da MKRL smanjuju intenzitet upale u intestinalnim stanicama,⁹⁰ a novije studije ukazuju na činjenicu da oralna suplementacija MKRL može povećati proizvodnju IL 10 u crijevnom tkivu. On ima pleotropne učinke koji uključuju smanjenje razina proupalnih citokina i kostimulacijskih molekula te ekspresije HLA 2 molekula. Isto tako, na animalnim modelima je dokazano da MKRL potiču razvoj fiziološke crijevne flore i mogu smanjiti incidenciju NEC-a za 50%.⁹¹

Eritropoetin (EPO)

Eritropoetin, poznat i pod nazivom hematopoetin, je glikopeptidni hormon kojeg primarno proizvode peritubularni fibroblasti u renalnom korteksu. On se može naći i u mozgu, slezeni, jetri, plućima i testisima, ali u minimalnim količinama. Prenatalno se uglavnom proizvodi u hepatocitima. Glavni poticaj za njegovu proizvodnju daju uvjeti hipoksije. Njegova glavna zadaća je antiapoptotički učinak na eritrocitnu lozu stanica,

tj. na eritroidne kolonijsko formirajuće stanice (CFU-Es) u koštanoj srži i drugim hematopoetskim organima.⁹² Iako je dokazano do povišene prenatalne razine EPO-a u krvi novorođenčadi koreliraju sa razvojem NEC-a,⁹³ najvjerojatnije zato što signaliziraju stanje teške anemije, recentne studije ukazuju na povoljne učinke eritropoetina na enterocite. EPO je sastavni dio ljudskog mlijeka i u *in vitro* uvjetima dokazano smanjuje nekrozu. Kao mogući mehanizam tog djelovanja navodi se povišenje razina glutationa.⁹⁴ Isto tako, on smanjuje autofagiju i apoptozu intestinalnih stanica u *in vitro* i u *in vivo* uvjetima, tj. na modelu štakora, a to postiže kroz nekoliko različitih signalnih puteva.⁹⁵

Kisik i ozon

Hiperbarični kisik (HK) koristi se u terapiji raznih stanja koja se protežu od nekrotizirajućeg fasciitisa do dekompresijske bolesti. Dokazano je da promiče ekspresiju antioksidativnih enzima i poboljšava angiogenezu. Jedna studija je demonstrirala da se primjenom HK može smanjiti razina upalnih markera i ublažiti stupanj težine nekrotizirajućeg enterokolitisa.⁹⁶ Nadalje, ljudska pilot studija je dokazala da kratkotrajna primjena HK nema negativnih učinaka i da bi se mogla koristiti u terapiji NEC-a.⁹⁷ Ozon je triatomski alotrop kisika i nerijetko je povezan sa vrlo negativnim učincima na ljudsko zdravlje. Dokazano je da pri inhalaciji može iritirati sluznicu respiratornog trakta, pogoršati intenzitet astme i bronhitisa, povećati incidenciju akutnih koronarnih incidenata i čak dovesti do skraćenja životnog vijeka. Zbog svih navedenih razloga prirodno je da postoji sumnjičavost prema ozonu i nevoljkost za njegovu primjenu u medicini. Usprkos tome, nova istraživanja su pokazala da se rektalnom i intraperitonealnom primjenom ozona može smanjiti razine upalnih parametara u crijevima.⁹⁸ Isto tako, na štakorima je dokazano da

intraperitonealna primjena može smanjiti oksidativni stres i mortalitet te ublažiti gubitak na težini.⁹⁹ Uz to, na animalnim modelima je demonstrirano da ozon ima bolji ukupni učinak na NEC u usporedbi sa HK.¹⁰⁰

Pravilna enteralna prehrana

S obzirom na činjenicu da je značajan broj spojeva koji se spominju u ovome članku prisutan u majčinom mlijeku i s obzirom da će mlijeko ostati primarni izvor tih spojeva u doglednoj budućnosti, barem dok njihova učinkovitost nije potvrđena i dok ih ne budemo u stanju sintetizirati u značajnijim količinama, primjereno je razmotriti različite kombinacije metoda koje se koriste u enteralnom hranjenju novorođenčadi. One uključuju ljudsko mlijeko, *pojačano* ljudsko mlijeko, formulu i kombinacije prethodno navedenih. Isto tako, bitno je napomenuti da kada se radi o nedonoščadi, postoje velike varijacije u gestacijskoj dobi i porođajnoj težini te kao posljedica toga velika raznolikost u razvijenosti gastrointestinalnog trakta. To naravno dovodi do razlike u kapacitetima enteralnog unosa hranjivih tvari i rizika od nepodnošenja hrane i drugih komplikacija poput NEC-a. Vrlo je teško povući granice između pojedinih težinskih i dobnih kategorija nedonoščadi i onda im dodijeliti specifičan način hranjenja. To je razlog zašto se standardna praksa hranjenja novorođenčadi VNPT i ekstremno niske porođajne težine (ENPT) mijenja kroz godine i često je predmet intenzivnih rasprava. Postoji opće suglasje znanstvenih dokaza koje pokazuje da je prehrana majčinim mlijekom puno poželjnija u odnosu na hranjenje formulom. Osim toga, pokazano je da prehrana isključivo ljudskim mlijekom ostvaruje bolje učinke od ljudskog mlijeka pojačanog goveđim pojačivačem i od kombinacije pojačanog mlijeka uz formulu. Smanjenje incidencije NEC-a je značajno i dolazi s drugim pogodnostima kao što su: smanjenje netolerancije na enteralno hranjenje, kraći period do potpunog

enteralnog unosa hrane i kraći boravak u bolnici.¹⁰¹ U situacijama u kojima majčino mlijeko nije dostupno ostaje nam izbor između doniranog mlijeka ili formule.

Istraživanja su pokazala da prehrana bazirana na formuli kratkoročno dovodi do ubrzanog dobivanja na masi te povećanja duljine tijela i opsega glave. Dugoročno ta novorođenčad nije zadržala svoju prednost u rastu niti su imali bolje ishode neurološkog razvoja. S druge strane, djeca hranjena doniranim mlijekom imala su sniženu incidenciju NEC-a.¹⁰² S obzirom na činjenicu da većina djece, ako nemaju pristup majčinom mlijeku, isto ne će imati pristup ni doniranom mlijeku, liječnici moraju optimalno primjenjivati formulu. Studije su pokazale da, iako je bitno održavati unos kalorija od 110-130 kcal/kg/dan i proteina od 3-4 g/kg/dan za novorođenčad VNPT i 4-4.5 g/kg/dan za one ENPT,¹⁰³ trebalo bi razmotriti mogućnost smanjenja koncentracije formule kako bi se reducirao rizik od razvoja netolerancije enteralnog hranjenja.¹⁰⁴

Dva dodatna važna čimbenika enteralne prehrane koja treba razmotriti su: pravilan period nakon poroda u kojem treba početi uvoditi hranjenje *per os* i pravilan volumen hrane koji se može sigurno primijeniti. Opći je stav da parenteralna prehrana ne predstavlja optimalan način unosa kalorija zbog rizika od razvoja ozbiljnih metaboličkih poremećaja poput hiper i hipoglikemije, kolestaze te oštećenja jetre. Većina studija ukazuje na to da bi sa minimalnom enteralnom prehranom trebalo početi unutar prva četiri dana života za novorođenčad VNPT s namjerom da potaknemo funkciju sluznice, crijevni motilitet i kako bi prevenirali atrofiju crijevnih resica. Dalje od te točke postoji razilaženje u dokazima i stavovima prema povećanju volumena unosa hrane. Određena istraživanja ukazuju na to da u prvih deset dana volumen ne bi trebao biti veći od 24 mL/kg/ dan i da takav režim prehrane ima pozitivan učinak na smanjenje netolerancije na enteralno hranjenje i da smanjuje rizik

od razvoja NEC-a i njegovu težinu.¹⁰⁵ S druge strane, postoje istraživanja koja zagovaraju agresivniji pristup koji uključuje povećanje volumena hrane za 20-30 mL/kg/dan za novorođenčad VNPT i 15-25 mL/kg/dan za one ENPT. Takav postupak argumentiran je time da će smanjiti rizik od pothranjivanja, povećati rast, skratiti vrijeme prolaska do početka potpunog enteralnog hranjenja i da *ne će* povećati rizik od NEC-a.¹⁰³ U konačnici, postoje dokazi da bi za podskupinu djece ENPT ispod 750 g moglo biti korisno, sa stajališta prevencije NEC-a, da se primjenjuje strategija potpunog isključenja enteralnog hranjenja tijekom prva dva tjedna nakon čega bi slijedilo postupno uvođenje kroz nekoliko tjedana.¹⁰⁶

Zaključak

NEC je i dalje jedan od glavnih problema novorođenačke zdravstvene skrbi pri čemu u zadnjih desetak godina nije bilo bitnih promjena u zdravstvenim ishodima pacijenata. On ima relativno visok mortalitet i izaziva dugoročne zdravstvene komplikacije, a taj problem ne će nestati u doglednom vremenu zbog činjenice da se kapacitet moderne medicine da poveća preživljavanje i one najmanje nedonošćadi sve više povećava. Zato se ovaj rad usmjerava na nove metode otkrivanja i liječenja NEC-a koje bi mogle pružiti potrebiti skok naprijed. Postoji mogućnost da ćemo moći procijeniti opasnost puno ranije i sa znatno većom preciznošću. Postoje brojna istraživanja koja upućuju na to da bi se različite molekule mogle koristiti kao biljezi NEC-a, za razlikovanje njega od drugih bolesti te za procjenu težine upale. Ti spojevi su na spektru od poznatih posrednika upale poput interleukina i kalprotektina, do molekula koje bi mogle biti dobar indikator oštećenja stanica i organa poput proteina koji vežu masne kiseline, žučnih kiselina i klaudina. Nedavno otkrivene opcije koje se

temelje na uporabi neinvazivnih metoda za otkrivanje intestinalnog oštećenja i upale, poput analize urina, uzoraka stolice i sline, otvaraju cijeli novi svijet mogućnosti. Isto tako, postoji opcija primjene analize varijabilnosti srčanog ritma za predviđanje pojave NEC-a, ali u trenutnom stadiju razvoja to je više teorija nego realnost.

S obzirom na tretman, isto tako postoje brojni razlozi za optimizam. Trenutno se istražuju brojni spojevi za koje postoji mogućnost da će se jednoga dana izolirano ili u kombinaciji s drugim molekulama, rabiti za prevenciju, liječenje i smanjenje težine NEC-a te za ublažavanje njegovih učinaka na cijelo tijelo. To mogu biti spojevi koji se nalaze u majčinom mlijeku poput oligosaharida ljudskog mlijeka. Drugi su dio majčinog mlijeka, ali se isto tako proizvode u tijelu novorođenčeta, poput inzulinu sličnog čimbenika rasta 1, obitelji epidermalnog čimbenika rasta, transformirajućeg čimbenika rasta β , eritropoetina, masnih kiselina razgranatih lanaca i obitelji trefoil faktora. Nadalje, tu su i alkalna fosfataza, vitamin A te kisik koji se koristi u liječenju respiracijskih bolesti novorođenčadi.

U konačnici, najpotentnije oruđe za prevenciju NEC-a je majčino mlijeko. Najteža je zagonetka njegove primjene u određivanju točnog volumena te vremenskog razdoblja u kojem se treba početi primjenjivati. Određena razina slaganja postoji, ali daljnje studije su potrebne za optimizaciju njegove kliničke primjene.

Ovaj rad se usredotočio na visoko relevantna istraživanja kako bi na njih skrenuo pozornost medicinske zajednice. Mora biti naglašeno da su sva ta klinička oruđa još u eksperimentalnom i razvojnom stadiju i da zahtijevaju puno dodatnog ispitivanja, ali i da nude veliki raspon mogućnosti koji bi trebalo istražiti.

Na kraju, treba istaknuti da su prevencija i rano otkrivanje najbolji načini liječenja. Dodatna istraživanja mogu se usmjeriti na široki spektar molekula, za koje postoji

mogućnost da bi nam jednoga dana mogle omogućiti bolji uvid u rane stadije NEC-a kako bi mogli brzo i primjereno reagirati.

Zahvale

Zahvaljujem roditeljima i ostatku obitelji koji su me podržali tijekom studija te prijateljima i kolegama koji su sve učinili zabavnim. U konačnici, zahvaljujem nastavnom osoblju na prenesenom znanju i iskustvu.

U Zagrebu, lipanj 2018.

Mislav Knežević

Literatura

- ¹ Ashanti L. Franklin, Mariam Said, Clint D. Cappiello, Heather Gordish-Dressman, Zohreh Tatari-Calderone, Stanislav Vukmanovic, Khodayar Rais-Bahrami, Naomi L. C. Luban, Joseph M. Devaney & Anthony D. Sandler. Are Immune Modulating Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Necrotizing Enterocolitis? *Scientific Reports* volume 5, Article number: 18369 (2015) doi:10.1038/srep18369
- ² Noosheen Alaverdi; David Sehy (2007-05-01). "Cytokines - Master Regulators of the Immune System". *eBioscience*. Archived from the original (PDF) on 2006-03-15. Retrieved 2008-02-28.
- ³ Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB (Aug 1996). "Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA". *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (34): 20965–72. doi:10.1074/jbc.271.34.20965. PMID 8702856
- ⁴ Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin". *Nature*. 324 (6092): 73–6. doi:10.1038/324073a0. PMID 3491322
- ⁵ Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K (Nov 1994). "Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation". *Journal of Leukocyte Biology*. 56 (5): 559–64. PMID 7964163
- ⁶ Viscardi RM, Lyon NH, Sun CC, Hebel JR, Hasday JD. Inflammatory cytokine mRNAs in surgical specimens of necrotizing enterocolitis and normal newborn intestine. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1997 Jul-Aug;17(4):547-59.
- ⁷ Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 1999 Apr;103(4 Pt 1):766-71.
- ⁸ Bergholz R, Zschiegner M, Eschenburg G, Wenke K, Tiemann B, Roth B, Appl B, Reinshagen K, Sommerfeldt D, Ridderbusch I. Mucosal loss with increased expression of IL-6, IL-8, and COX-2 in a formula-feeding only neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2013 Nov;48(11):2301-7. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.04.028.
- ⁹ Benkoe TM, Mechtler TP, Weninger M, Pones M, Rebhandl W, Kasper DC. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg*. 2014 Oct;49(10):1446-51. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.03.012.
- ¹⁰ Benkoe T, Reck C, Pones M, Weninger M, Gleiss A, Stift A, Rebhandl W. Interleukin-8 predicts 60-day mortality in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2014 Mar;49(3):385-9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.05.068.
- ¹¹ Abhay Lodha, Alexandra Howlett, Talat Ahmed, Aideen M. Moore. The Role of Interleukin-6 and Interleukin-8 Circulating Cytokines in Differentiating between Feeding Intolerance and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Amer J Perinatol* 2017; 34(13): 1286-1292. DOI: 10.1055/s-0037-1603329

-
- ¹² Rebecca L Smathers and Dennis R Petersen. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions *Human Genomics* 2011 5:170. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-3-170>
- ¹³ https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&match=FABP1
- ¹⁴ https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&match=FABP2
- ¹⁵ Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, Derikx JP, van Bijnen AA, Heineman E, Dejong CH, Buurman WA, Poeze M. Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surg.* 2011 Feb;253(2):303-8. doi: 10.1097/SLA.0b013e318207a767.
- ¹⁶ Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, Marks WH. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery.* 1997 Mar;121(3):335-42.
- ¹⁷ Mannoia K, Boskovic DS, Slater L, Plank MS, Angeles DM, Gollin G. Necrotizing enterocolitis is associated with neonatal intestinal injury. *J Pediatr Surg.* 2011 Jan;46(1):81-5. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.09.069.
- ¹⁸ Schurink M, Kooi EM, Hulzebos CV, Kox RG, Groen H, Heineman E, Bos AF, Hulscher JB. Intestinal fatty acid-binding protein as a diagnostic marker for complicated and uncomplicated necrotizing enterocolitis: a prospective cohort study. *PLoS One.* 2015 Mar 20;10(3):e0121336. doi: 10.1371/journal.pone.0121336. eCollection 2015.
- ¹⁹ Reisinger KW, Van der Zee DC, Brouwers HA, Kramer BW, van Heurn LW, Buurman WA, Derikx JP. Noninvasive measurement of fecal calprotectin and serum amyloid A combined with intestinal fatty acid-binding protein in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2012 Sep;47(9):1640-5. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.02.027.
- ²⁰ Thuijls G, Derikx JP, van Wijck K, Zimmermann LJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, Van der Zee DC, Brouwers HA, Verhoeven BH, van Heurn LW, Kramer BW, Buurman WA, Heineman E. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg.* 2010 Jun;251(6):1174-80. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181d778c4.
- ²¹ Ng EW, Poon TC, Lam HS, Cheung HM, Ma TP, Chan KY, Wong RP, Leung KT, Lam MM, Li K, Ng PC. Gut-associated biomarkers L-FABP, I-FABP, and TFF3 and LIT score for diagnosis of surgical necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Ann Surg.* 2013 Dec;258(6):1111-8. doi: 10.1097/SLA.0b013e318288ea96.
- ²² Aydemir C, Dilli D, Oguz SS, Ulu HO, Uras N, Erdeve O, Dilmen U. Serum intestinal fatty acid binding protein level for early diagnosis and prediction of severity of necrotizing enterocolitis. *Early Hum Dev.* 2011 Oct;87(10):659-61. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2011.05.004.
- ²³ Yumi Obata, Atsuko Kamijo-Ikemori, Daisuke Ichikawa, Takeshi Sugaya, Kenjiro Kimura, Yugo Shibagaki, Takeshi Tateda. Clinical usefulness of urinary liver-type fatty-acid-binding protein as a perioperative marker of acute kidney injury in patients

undergoing endovascular or open-abdominal aortic aneurysm repair. *J Anesth* (2016) 30: 89. <https://doi.org/10.1007/s00540-015-2095-8>.

²⁴ Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hikawa A, Hirano N, Hirata Y, Goto A, Omata M. Urinary fatty acid-binding protein as a new clinical marker of the progression of chronic renal disease. *J Lab Clin Med*. 2004 Jan;143(1):23-30.

²⁵ Alan F. Hofmann, Lee R. Hagey, and Matthew D. Krasowski. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res*. 2010 Feb; 51(2): 226–246. doi: 10.1194/jlr.R000042

²⁶ John Y. L. Chiang. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009 Oct; 50(10): 1955–1966. doi: 10.1194/jlr.R900010-JLR200

²⁷ Hulzebos CV, van Zoonen AG, Hulscher JB, Schat TE, Kooi EM, Koehorst M, Boverhof R, Krabbe PF, Groen AK, Verkade HJ. Fecal Bile Salts and the Development of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *PLoS One*. 2017 Jan 3;12(1):e0168633. doi: 10.1371/journal.pone.0168633.

²⁸ Raimondi F, Santoro P, Barone MV, Pappacoda S, Barretta ML, Nanayakkara M, Apicella C, Capasso L, Paludetto R. Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Apr;294(4):G906-13. doi: 10.1152/ajpgi.00043.2007.

²⁹ Korndörfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol*. 2007 Jul 27;370(5):887-98.

³⁰ Gupta, Ramesh (2014). *Biomarkers in toxicology*. San Diego, CA: Academic Press. pp. 272–273. ISBN 9780124046498. Retrieved 19 January 2015

³¹ Ho TT, Groer MW, Luciano AA, Schwartz A, Ji M, Miladinovic BS, Maheshwari A, Ashmeade TL. Red blood cell transfusions increase fecal calprotectin levels in premature infants. *J Perinatol*. 2015 Oct;35(10):837-41. doi: 10.1038/jp.2015.73.

³² Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, Beavis RC, Lane L, Duek P, McQuade L, Kelleher NL, Baker MS (Dec 2015). "A systems proteomics view of the endogenous human claudin protein family". *J Proteome Res*. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00769. PMID 26680015

³³ P Blackwood M D B, R Wood B S D, Y Yuan B S C, D Nicolas J, Griffiths M D A, Mestan M D K, J Hunter M D C Urinary Claudin-2 Measurements as a Predictor of Necrotizing Enterocolitis: A Pilot Study. *J Neonatal Surg*. 2015 Oct 1;4(4):43.

³⁴ Garg PM, Tatum R, Ravisankar S, Shekhawat PS, Chen YH. Necrotizing enterocolitis in a mouse model leads to widespread renal inflammation, acute kidney injury, and disruption of renal tight junction proteins. *Pediatr Res*. 2015 Nov;78(5):527-32. doi: 10.1038/pr.2015.146.

³⁵ Liu HL, Garzoni L, Herry C, Durosier LD, Cao M, Burns P, Fecteau G, Desrochers A, Patey N, Seely AJ, Faure C, Frasch MG. Can Monitoring Fetal Intestinal Inflammation Using Heart Rate Variability Analysis Signal Incipient Necrotizing Enterocolitis of the Neonate? *Pediatr Crit Care Med*. 2016 Apr;17(4):e165-76. doi: 10.1097/PCC.0000000000000643.

-
- ³⁶ Durosier LD, Herry CL, Cortes M, Cao M, Burns P, Desrochers A, Fecteau G, Seely AJ, Frasch MG. Does heart rate variability reflect the systemic inflammatory response in a fetal sheep model of lipopolysaccharide-induced sepsis? *Physiol Meas*. 2015 Oct;36(10):2089-102. doi: 10.1088/0967-3334/36/10/2089.
- ³⁷ Derek Le Roith. The Insulin-Like Growth Factor System. *Experimental Diabetes Research*. Volume 4 (2003), Issue 4, Pages 205-212.
<http://dx.doi.org/10.1155/EDR.2003.205>
- ³⁸ Kon IY, Shilina NM, Gmoshinskaya MV, Ivanushkina TA. The study of breast milk IGF-1, leptin, ghrelin and adiponectin levels as possible reasons of high weight gain in breast-fed infants. *Ann Nutr Metab*. 2014;65(4):317-23. doi: 10.1159/000367998.
- ³⁹ Hellström A, Ley D, Hansen-Pupp I, Hallberg B, Ramenghi LA, Löfqvist C, Smith LE, Hård AL. Role of Insulinlike Growth Factor 1 in Fetal Development and in the Early Postnatal Life of Premature Infants. *Am J Perinatol*. 2016 Sep;33(11):1067-71. doi: 10.1055/s-0036-1586109.
- ⁴⁰ Ozen S.a,Akisu M.a,Baka M.b,Yalaz M.a,Sozmen E.Y.c,Berdeli A.a,Kultursay N. Insulin-Like Growth Factor Attenuates Apoptosis and Mucosal Damage in Hypoxia/Reoxygenation-Induced Intestinal Injury. *Biol Neonate* 2005;87:91–96
<https://doi.org/10.1159/000081897>
- ⁴¹ Tian F, Liu GR, Li N, Yuan G. Insulin-like growth factor I reduces the occurrence of necrotizing enterocolitis by reducing inflammatory response and protecting intestinal mucosal barrier in neonatal rats model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Oct;21(20):4711-4719.
- ⁴² J. Bruce German, Samara L. Freeman, Carlito B. Lebrilla, and David A. Mills. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008; 62: 205–222. doi: 10.1159/000146322
- ⁴³ Armanian AM, Sadeghnia A, Hoseinzadeh M, Mirlohi M, Feizi A, Salehimehr N, Saeed N, Nazari J. The Effect of Neutral Oligosaccharides on Reducing the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Preterm infants: A Randomized Clinical Trial. *Int J Prev Med*. 2014 Nov;5(11):1387-95.
- ⁴⁴ Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost*. 2004 Dec;92(6):1402-10.
- ⁴⁵ Yu H, Yan X, Autran CA, Li Y, Etzold S, Latasiewicz J, Robertson BM, Li J, Bode L, Chen X. Enzymatic and Chemoenzymatic Syntheses of Disialyl Glycans and Their Necrotizing Enterocolitis Preventing Effects. *J. Org. Chem.*, 2017, 82 (24), pp 13152–13160. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02167
- ⁴⁶ Autran CA, Kellman BP, Kim JH, Asztalos E, Blood AB, Spence EC, Patel AL, Hou J, Lewis NE, Bode L. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut*. 2017 Apr 5. pii: gutjnl-2016-312819. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312819.
- ⁴⁷ Autran CA, Schoterman MH, Jantscher-Krenn E, Kamerling JP, Bode L. Sialylated galacto-oligosaccharides and 2'-fucosyllactose reduce necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Br J Nutr*. 2016 Jul;116(2):294-9. doi: 10.1017/S0007114516002038.

-
- ⁴⁸ Westerbeek EA, van den Berg A, Lafeber HN, Fetter WP, van Elburg RM. The effect of enteral supplementation of a prebiotic mixture of non-human milk galacto-, fructo- and acidic oligosaccharides on intestinal permeability in preterm infants. *Br J Nutr*. 2011 Jan;105(2):268-74. doi: 10.1017/S0007114510003405.
- ⁴⁹ Rasmussen SO, Martin L, Østergaard MV, Rudloff S, Roggenbuck M, Nguyen DN, Sangild PT, Bering SB. Human milk oligosaccharide effects on intestinal function and inflammation after preterm birth in pigs. *J Nutr Biochem*. 2017 Feb;40:141-154. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.011.
- ⁵⁰ Alys C.Dreux,David J.Lamb,Helmout Modjtahedi,Gordon A.A.Ferns. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: Their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* Volume 186, Issue 1, May 2006, Pages 38-53
- ⁵¹ Bohuslav Dvorak. Milk Epidermal Growth Factor and Gut Protection. *J Pediatr*. 2010 Feb; 156(2 Suppl): S31–S35. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.11.018
- ⁵² Moran JR, Courtney ME, Orth DN, Vaughan R, Coy S, Mount CD, Sherrell BJ, Greene HL. 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*. 1983 Sep;103(3):402-5.
- ⁵³ Warner BB, Ryan AL, Seeger K, Leonard AC, Erwin CR, Warner BW. Ontogeny of salivary epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 2007 Apr;150(4):358-63.
- ⁵⁴ Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, Stepankova R, Payne CM, McCuskey RS. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Jan;282(1):G156-64.
- ⁵⁵ Halpern MD, Dominguez JA, Dvorakova K, Holubec H, Williams CS, Meza YG, Ruth MC, Dvorak B. Ileal cytokine dysregulation in experimental necrotizing enterocolitis is reduced by epidermal growth factor. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003 Jan;36(1):126-33.
- ⁵⁶ Clark JA, Lane RH, Maclennan NK, Holubec H, Dvorakova K, Halpern MD, Williams CS, Payne CM, Dvorak B. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Apr;288(4):G755-62.
- ⁵⁷ Clark JA, Doelle SM, Halpern MD, Saunders TA, Holubec H, Dvorak K, Boitano SA, Dvorak B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Nov;291(5):G938-49.
- ⁵⁸ Radulescu A, Yu X, Orvets ND, Chen Y, Zhang HY, Besner GE. Deletion of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene increases susceptibility to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2010 Apr;45(4):729-34. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.06.035.
- ⁵⁹ Radulescu A, Zhang HY, Yu X, Olson JK, Darbyshire AK, Chen Y, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor overexpression in

-
- transgenic mice increases resistance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2010 Oct;45(10):1933-9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.05.002.
- ⁶⁰ Yu X, Radulescu A, Zorko N, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor increases intestinal microvascular blood flow in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):221-30. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.060.
- ⁶¹ Pillai SB, Turman MA, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor is cytoprotective for intestinal epithelial cells exposed to hypoxia. *J Pediatr Surg*. 1998 Jul;33(7):973-8; discussion 978-9.
- ⁶² Xia G, Martin AE, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2003 Mar;38(3):434-9.
- ⁶³ Kuhn MA, Xia G, Mehta VB, Glenn S, Michalsky MP, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) decreases oxygen free radical production in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Aug;4(4):639-46.
- ⁶⁴ Michalsky MP, Kuhn A, Mehta V, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases apoptosis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Pediatr Surg*. 2001 Aug;36(8):1130-5.
- ⁶⁵ Amaury Herpinab, Christophe Lelonga, Pascal Favrel. Transforming growth factor- β -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental & Comparative Immunology* Volume 28, Issue 5, 3 May 2004, Pages 461-485
- ⁶⁶ TRANSFORMING GROWTH FACTOR, BETA-3; TGFB3
<https://omim.org/entry/190230>
- ⁶⁷ Siamak Tabibzadeh, Ravi Kothapalli , Ibrahim Buyuksal. DISTINCT TUMOR SPECIFIC EXPRESSION OF TGFB4 (ebaf)*, A NOVEL HUMAN GENE OF THE TGF-b SUPERFAMILY. *Frontiers in bioscience* 2, a18-25, July 15, 1997.
- ⁶⁸ Namachivayam K, Blanco CL, MohanKumar K, Jagadeeswaran R, Vasquez M, McGill-Vargas L, Garzon SA, Jain SK, Gill RK, Freitag NE, Weitkamp JH, Seidner SR, Maheshwari A. Smad7 inhibits autocrine expression of TGF- β 2 in intestinal epithelial cells in baboon necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Jan 15;304(2):G167-80. doi: 10.1152/ajpgi.00141.2012.
- ⁶⁹ Nguyen DN, Jiang P, Jacobsen S, Sangild PT, Bendixen E, Chatterton DE. Protective effects of transforming growth factor β 2 in intestinal epithelial cells by regulation of proteins associated with stress and endotoxin responses. *PLoS One*. 2015 Feb 10;10(2):e0117608. doi: 10.1371/journal.pone.0117608.
- ⁷⁰ Maheshwari A, Kelly DR, Nicola T, Ambalavanan N, Jain SK, Murphy-Ullrich J, Athar M, Shimamura M, Bhandari V, Aprahamian C, Dimmitt RA, Serra R, Ohls RK. TGF- β 2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):242-53. doi: 10.1053/j.gastro.2010.09.043.
- ⁷¹ Namachivayam K, Blanco CL, Frost BL, Reeves AA, Jagadeeswaran R, MohanKumar K, Safarulla A, Mandal P, Garzon SA, Raj JU, Maheshwari A. Preterm human milk contains a large pool of latent TGF- β , which can be activated by

-
- exogenous neuraminidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 Jun 15;304(12):G1055-65. doi: 10.1152/ajpgi.00039.2013.
- ⁷² Namachivayam K, Coffing HP, Sankaranarayanan NV, Jin Y, MohanKumar K, Frost BL, Blanco CL, Patel AL, Meier PP, Garzon SA, Desai UR, Maheshwari A. Transforming growth factor- β 2 is sequestered in preterm human milk by chondroitin sulfate proteoglycans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015 Aug 1;309(3):G171-80. doi: 10.1152/ajpgi.00126.2015.
- ⁷³ Millán. Alkaline Phosphatases. *J.L. Purinergic Signalling* (2006) 2: 335. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5435-6>
- ⁷⁴ Rentea RM, Liedel JL, Fredrich K, Pritchard K Jr, Oldham KT, Simpson PM, Gourlay DM. Enteral intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases iNOS expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2013 Jan;48(1):124-8. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.10.026.
- ⁷⁵ Rentea RM, Liedel JL, Fredrich K, Welak SR, Pritchard KA Jr, Oldham KT, Simpson PM, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases systemic inflammatory cytokine expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Surg Res.* 2012 Oct;177(2):228-34. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.039.
- ⁷⁶ Biesterveld BE, Koehler SM, Heinzerling NP, Rentea RM, Fredrich K, Welak SR, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase to treat necrotizing enterocolitis. *J Surg Res.* 2015 Jun 15;196(2):235-40. doi: 10.1016/j.jss.2015.02.030.
- ⁷⁷ Rentea RM, Liedel JL, Welak SR, Cassidy LD, Mayer AN, Pritchard KA Jr, Oldham KT, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2012 Jun;47(6):1135-42. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.018.
- ⁷⁸ "Vitamin A". Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis. January 2015. Retrieved 6 July 2017.
- ⁷⁹ Spears K, Cheney C, Zerzan J. Low plasma retinol concentrations increase the risk of developing bronchopulmonary dysplasia and long-term respiratory disability in very-low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6):1589-94.
- ⁸⁰ Nafday SM, Green RS, Chauvin SN, Holzman IR, Magid MS, Lin J. Vitamin A supplementation ameliorates butyric acid-induced intestinal mucosal injury in newborn rats. *J Perinat Med.* 2002;30(2):121-7.
- ⁸¹ Namachivayam K, MohanKumar K, Arbach D, Jagadeeswaran R, Jain SK, Natarajan V, Mehta D, Jankov RP, Maheshwari A. All-Trans Retinoic Acid Induces TGF- β 2 in Intestinal Epithelial Cells via RhoA- and p38 α MAPK-Mediated Activation of the Transcription Factor ATF2. *PLoS One.* 2015 Jul 30;10(7):e0134003. doi: 10.1371/journal.pone.0134003.
- ⁸² Ozdemir R, Yurttutan S, Sari FN, Oncel MY, Erdeve O, Unverdi HG, Uysal B, Dilmen U. All-trans-retinoic acid attenuates intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Neonatology.* 2013;104(1):22-7. doi: 10.1159/000350510.
- ⁸³ Kjellef S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Apr;66(8):1350-69. doi: 10.1007/s00018-008-8646-5.

-
- ⁸⁴ Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007 May;55(5):505-13. Epub 2007 Jan 22.
- ⁸⁵ Vestergaard EM, Nexø E, Wendt A, Guthmann F. Trefoil factors in human milk. *Early Hum Dev*. 2008 Oct;84(10):631-5. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2008.04.001.
- ⁸⁶ Poulsen SS, Kissow H, Hare K, Hartmann B, Thim L. Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul Pept*. 2005 Mar 30;126(3):163-71.
- ⁸⁷ Carrasco R, Pera M, May FE, Westley BR, Martinez A, Morales L. Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J Pediatr Surg*. 2004 Nov;39(11):1693-700.
- ⁸⁸ Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest*. 2002 Jul;32(7):519-27.
- ⁸⁹ Ran-Ressler RR, Devapatla S, Lawrence P, Brenna JT (2008). "Branched chain fatty acids are constituents of the normal healthy newborn gastrointestinal tract" (PDF). *Pediatric Research*. 64 (6): 605–609. doi:10.1203/PDR.0b013e318184d2e6. PMC 2662770 Freely accessible. PMID 1861496
- ⁹⁰ Yan Y, Wang Z, Wang D, Lawrence P, Wang X, Kothapalli KSD, Greenwald J, Liu R, Park HG, Brenna JT. BCFA-enriched vernix-monoacylglycerol reduces LPS induced inflammatory markers in human enterocytes in vitro. *Pediatr Res*. 2017 Nov 22. doi: 10.1038/pr.2017.297.
- ⁹¹ Ran-Ressler RR, Khailova L, Arganbright KM, Adkins-Rieck CK, Jouni ZE, Koren O, Ley RE, Brenna JT, Dvorak B. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLoS One*. 2011;6(12):e29032. doi: 10.1371/journal.pone.0029032.
- ⁹² Thomson, Angus W.; Lotze, Michael T. (2003-04-22). *The Cytokine Handbook* 149., Two-Volume Set. Gulf Professional Publishing. ISBN 9780080518794.
- ⁹³ Holm M, Skranes J, Dammann O, Fichorova RN, Allred EN, Leviton A. Systemic endogenous erythropoietin and associated disorders in extremely preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016 Sep;101(5):F458-63. doi: 10.1136/archdischild-2015-309127.
- ⁹⁴ Martin C, Patel M, Melendez-Ferro M, Sims B. Erythropoietin-induced cytoprotection in intestinal epithelial cells is linked to system Xc. *Exp Cell Res*. 2017 Mar 15;352(2):202-206. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.002.
- ⁹⁵ Yu Y, Shiou SR, Guo Y, Lu L, Westerhoff M, Sun J, Petrof EO, Claud EC. Erythropoietin protects epithelial cells from excessive autophagy and apoptosis in experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2013 Jul 25;8(7):e69620. doi: 10.1371/journal.pone.0069620.
- ⁹⁶ Guven A, Gundogdu G, Uysal B, Cermik H, Kul M, Demirbag S, Ozturk H, Oter S. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg*. 2009 Mar;44(3):534-40. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.06.008.

-
- ⁹⁷ Sánchez EC. Use of hyperbaric oxygenation in neonatal patients: a pilot study of 8 patients. *Crit Care Nurs Q*. 2013 Jul-Sep;36(3):280-9. doi: 10.1097/CNQ.0b013e318294e95b.
- ⁹⁸ Aslaner A, Çakır T, Tekeli SÖ, Avcı S, Doğan U, Tekeli F, Soyulu H, Akyüz C, Koç S, Üstünel İ, Yılmaz N. Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rat. *Acta Cir Bras*. 2016 Apr;31(4):256-63. doi: 10.1590/S0102-865020160040000006.
- ⁹⁹ Guven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Oztas E, Ozturk H, Korkmaz A. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg*. 2009 Sep;44(9):1730-5. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.01.007.
- ¹⁰⁰ Altinel O, Demirbas S, Cakir E, Yaman H, Ozerhan IH, Duran E, Cayci T, Akgul EO, Ersoz N, Uysal B, Kurt B, Yasar M, Oter S, Peker Y. Comparison of hyperbaric oxygen and medical ozone therapies in a rat model of experimental distal colitis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011 May;71(3):185-92. doi: 10.3109/00365513.2010.548875. Epub 2011 Jan 4.
- ¹⁰¹ M Assad, MJ Elliott, JH Abraham Decreased cost and improved feeding tolerance in VLBW infants fed an exclusive human milk diet. *Journal of Perinatology* (2016) 36, 216–220
- ¹⁰² Quigley M, McGuireW Formula versus donor breastmilk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 4. Art. No.: CD002971. DOI: 10.1002/14651858.CD002971.pub3.
- ¹⁰³ Senterre T Practice of enteral nutrition in very low birth weight and extremely low birth weight infants. *World Rev Nutr Diet*. 2014;110:201-14. doi: 10.1159/000358468.
- ¹⁰⁴ Basuki F, Hadiati DR, Turner T, McDonald S, Hakimi M. Dilute versus full strength formula in exclusively formulafed preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 11. Art. No.: CD007263. DOI: 10.1002/14651858.CD007263.pub2.
- ¹⁰⁵ Qiu-fang Li, Hua Wang, Dan Liu, Yi Tang, Xin-fen Xu Application of prolonging small feeding volumes early in life to prevent of necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants. *International Journal of Nursing Sciences* Volume 3, Issue 1, March 2016, Pages 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijnss.2016.02.015>
- ¹⁰⁶ Viswanathan S, McNelis K, Super D, Einstadter D, Groh-Wargo S, Collin M Standardized Slow Enteral Feeding Protocol and the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Extremely Low Birth Weight Infants. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015 Aug;39(6):644-54. doi: 10.1177/0148607114552848.

Životopis

Rođen sam 5.10.1993. u Osijeku. U Bizovcu sam pohađao Osnovnu školu Bratoljub Klaić. U Osijeku sam pohađao 1. gimnaziju. 2012. upisao sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Diplomirao sam u roku s odličnim uspjehom, a 2017. primio sam Dekanovu nagradu. Tokom studija bio sam demonstrator iz patofiziologije, kliničke propedeutike i pedijatrije. Od izvannastavnih aktivnosti uključen sam kao volonter u Krijesnicu - udruhu za pomoć djeci i obiteljima suočenim s malignim bolestima.