

REVIUL LITERATURII



© Crivceanscaia Larisa, Liuba Rusu, Motelică Doina

Crivceanscaia Larisa, Liuba Rusu, Motelică Doina
**EFFECTUL PROTECTIV AL LICHIDULUI AMNIOTIC CONTRA ENTEROCOLITEI ULCERONECROTICE
LA NOU-NĂSCUȚII PREMATURE – REVISTA LITERATURII DE SPECIALITATE**

*IMSP Institutul Mamei și Copilului
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”*

SUMMARY

**THE PROTECTIVE EFFECT OF AMNIOTIC FLUID AGAINST ULCERO-NECROTIC ENTEROCOLITIS
IN PREMATURE NEWBORNS - THE LITERATURE OF SPECIALTY LITERATURE**

Necrotizing enterocolitis (NE) is the most widespread disease that affects the life of premature babies. NE is present in 1-5% of all neonatal ICU admissions and in 5-10% of infants with very low birth weight. The protective role of breast milk (BM) has been well established. It has also been shown that amniotic fluid (AF) and breast milk have many similarities in the presence of growth and other factors that modulate immunity.

This finding led to the initial assumption that AF may have similar protection effects against the development of NE as well as BM. Multiple studies have elucidated the presence of growth factors in AF and the protective effect of AF against NE. There were also described possible mechanisms by which LAF protects against NE. Currently, research in this area is extremely active and robust. This review summarizes various studies on the protective effects of AF against

the development of NE. It also provides insight into future directions, the vast potential of AF as an available biological environment, and the ethical barriers that need to be overcome before using AF.

REZUMAT

Enterocolita ulcero-necrotică (EUN) este cea mai răspândită maladie care afectează viața copiilor prematuri. EUN este prezentă în 1-5% din toate internările RTI neonatale și la 5-10% dintre copiii cu greutate foarte mică la naștere. Rolul protector al laptelui matern (LM) a fost bine stabilit. S-a demonstrat, de asemenea, că lichidul amniotic (LA) și laptele matern au multe asemănări în ceea ce privește prezența creșterii și alți factori care modulează imunitatea.

Această constatare a condus la ipoteza inițială că LA poate avea efecte de protecție similare împotriva dezvoltării EUN la fel ca și LM. Studii multiple au elucidat prezența factorilor de creștere în LA și efectul protector al LA față de EUN. Au fost descrise, de asemenea, mecanisme posibile prin care LA protejează împotriva EUN. În prezent, cercetarea în acest domeniu este extrem de activă și robustă. Această revizuire rezumă diferite studii privind efectele protectoare ale LA împotriva dezvoltării EUN. De asemenea, oferă o perspectivă asupra viitoarelor direcții, potențialul vast al LA ca mediu biologic disponibil și barierele etice care trebuie depășite înainte de a folosi LA.

Introducere: Enterocolita ulcero-necrotică este o boală inflamatorie gastrointestinală care afectează predominant nou-născuții prematuri. Criteriile de clasificare Bell [1] sunt utilizate cel mai frecvent pentru a defini severitatea EUN. Enterocolita ulcero-necrotică (NEC) este cea mai frecventă amenințare la adresa vieții nou-născuților prematuri (SP) [2]. EUN apare în 1-5% din totalul internărilor în RTI neonatală și 5-10% din cei cu greutatea la naștere foarte mică (<1500 g), ceea ce determină o morbiditate și mortalitate sporite. Patel și colab. [4] au arătat că EUN este cauza principală a mortalității la nou-născuții cu greutate foarte mică la naștere. Studiul a constatat că la nou-născuții extrem de prematuri, mortalitatea globală legată de infecția pulmonară, imaturitate, infecția cu afectarea SNC (2000-2011) a scăzut. Cu toate acestea, mortalitatea secundară EUN a crescut în aceeași perioadă de timp. Perforația intestinală, sindromul intestinului scurt și colestaza reprezintă cauzele principale ale morbidității și mortalității asociate EUN [5,6]. Rezultatele negative pe termen lung includ formarea stricturii, dezvoltarea recurențelor EUN și dezvoltarea sindromului intestinului scurt [7]. În 2011, costul global de îngrijire asociată EUN clinică a fost de 74.004\$, iar cea asociată EUN chirurgicală a fost de 198.040 dolari pe copil [8]. După mai mult de o jumătate de secol de cercetare în domeniul EUN în modele pe bază de animale și cercetare in vitro, nu a putut fi găsit un "glonte magic" pentru a împiedica dezvoltarea EUN. Cu toate acestea, în ultimul deceniu cele mai eficiente instrumente pentru reducerea poverii EUN au fost inițiativele de prevenire ale EUN, cum ar fi alimentația cu LM, direcțiile de transfuzie a sângelui, administrarea antibioticelor în prematuritate [3, 9, 10]. În perioada intrauterină, viața intestinală fetală devine expusă unor concentrații ridicate de mulți factori trofici datorită înghițirii LA. Dar nașterea prematură întrerupe înghițirea LA, ceea ce privează intestinul de acești factori trofici. În această revizuire, vom examina rolul diversilor factori trofici și citokine în dezvoltarea intestinului și rolul de diminuare /

prevenire a EUN prin furnizarea de factori trofici prin suplimentarea cu LA.

Patogeneza: Patogenia EUN este complexă și multifactorială. Prematuritatea, colonizarea bacteriană a intestinului și alimentația cu formule sunt cei trei factori principali responsabili în patogeneza EUN. Prematuritatea determină un peristaltism afectat, deficiențe în componente ale stratului de mucus și perturbarea integrității tractului intestinal epitelial [11].

Rolul TLR4 în patogeneza EUN - receptorul Toll-like 4 (TLR4) reprezintă un receptor imunitar înnăscut care recunoaște lipopolizaharida (LPZ) bacteriilor gram negative. Toll-like receptorul 4 (TLR4) este exprimat la nivele mai înalte la prematuri decât în intestinul nou-născuților la termen, rozătoarelor și altor specii [12]. TLR4 este exprimat la niveluri înalte în perioada de dezvoltare a intestinului fetal. După nașterea prematură, nivelele intestinale TLR4 rămân ridicate, iar colonizarea bacteriană în perioada postnatală conduce la o activare exagerată de semnalizare TLR4. Această activare exagerată a TLR4 duce la dezvoltarea EUN copiilor prematuri prin apoptoza enterocitelor, afectarea vindecării mucoasei și favorizarea eliberării citokinelor pro - inflamatorii [13]. Crește colonizarea bacteriilor, are loc modificarea perfuziei microcirculatorii și se manifestă imaturitatea sistemului imunitar comparativ cu copiii la termen [12,13]. Toți acești factori favorizează dezvoltarea EUN la copiii prematuri.

Colonizarea bacteriană patologică a intestinului nou-născuților prematuri conduce la alterarea florei intestinale normale. Colonizarea intestinului din perioada neonatală timpurie are loc în două etape [14]. Prima etapă, care este similară la toți nou-născuții, depinde în mod predominant de modul de naștere, iar a doua etapă de colonizare la sugari pe termen lung este determinată de tipul de hrănire. Nou-născuții alăptați la sân au, în principal, bifidobacterii / Bacteroides și sugarii hrăniți cu formulă au streptococi / stafilococi / lactobacili [15]. În cazul prematurilor, al doilea val de colonizare este influențată mai puțin de tipul de hrănire și este caracterizat de un nivel ridicat de Clostridi-

aceae și Enterobacteriaceae și numere relativ scăzute ale bifidobacteriilor și Bacteroides. Mai mulți cercetători au arătat o legătură între microbiota intestinală anormală la prematurii și dezvoltarea EUN. Prematurii sunt de asemenea expuși terapiei cu antibiotice, ceea ce poate duce la o creștere semnificativă a florei GIT anormale [3]. Citokinele pro-inflamatorii, cum ar fi LPZ, provoacă leziuni epiteliale care conduc la afectarea barierei epiteliale și dezvoltarea EUN prin secreția de oxid nitric. Ford și colab. au comparat mRNA iNOS în țesutul intestinal de la sugarii cu și fără EUN. Nivelurile de mRNA iNOS au fost semnificativ mai mari în probele intestinale de la sugarii care au avut EUN comparativ cu martorii. Mai mult, analiza imunobiochimică și hibridizarea in situ au confirmat predominanța activității iNOS în enterocitele din probele intestinale recoltate de la sugarii cu EUN [17,18].

Înțelegerea patogenezei exacte a EUN este esențială pentru implementarea strategiilor de prevenire. S-a demonstrat că laptele matern uman și lichidul amniotic (LA) conține numeroși factori biologici care pot proteja împotriva dezvoltării EUN la copiii prematurii.

Înghițirea fetală a lichidului amniotic (LA): Faptul că EUN nu este semnalată în utero a sugerat posibilitatea prezenței factorilor de protecție în LA împotriva dezvoltării EUN. LA este prima expunere la mediu, contribuind la dezvoltarea GIT și cavitatea amniotică este identificată la începutul embriogenezei [19]. Inițial, este compus preponderent din apă și din substanța dizolvată din plasmă maternă care se livrează activ fătului prin intermediul placentei și difuzează de la nivelul țesuturilor fetale non - keratinizate în spațiul amniotic. În timpul celei de-a doua jumătăți a sarcinii, fătul contribuie în mod activ la volumul și compoziția LA, în principal prin înghițire și urinare [20]. Începând cu 8-11 săptămâni de gestație, fătul înghite cantități crescute de LA, care pot ajunge la 500 ml / zi în trimestrul III [20]. La un făt, întreruperea ingerării LA prin ligaturarea esofagiană duce la anomaliile ale vilozităților și anomaliile ale enterocitelor. Nou-născuții cu congestie intestinală congenitală prezentau de asemenea vilozități plate și slab organizate distal de locul de obstrucție [23]. În modelul de ovine, efectele întreruperii înghițirii LA asupra mucoasei intestinale au fost treptat inversate după îndepărtarea țesuturilor esofagiene și restituiră ingestiei de LA, dar nu și perfuzarea de soluție Ringer lactat. Aceste constatări au arătat că efectele trofice ale LA au fost mai degrabă secundare moleculelor bioactive prezente în LA, decât datorită fluxului de fluide prin intestin [23]. Există mulți factori trofici în LA, cum ar fi factorii de creștere similari insulinei I și II (IGF I și II), factorul de creștere epidermală (EGF), factorul de creștere al hepatocitelor (HGF) și altele care modifică absorbția și dezvoltarea nutrienților intestinali [24].

Efectul citokinelor asupra dezvoltării TGI:

Dezvoltarea, maturarea și menținerea funcțiilor

complexe ale IGI necesită interacțiunea cu mai multe expuneri la mediu. Maheshwari [25] descrie citokinele din LA și rolul lor în dezvoltarea TGI. În plus, față de citokine, și factorii de creștere livrați mucoasei intestinale prin LA, de asemenea TGI constitutiv exprimă multe citokine și factori de creștere la niveluri ridicate. Celulele epiteliale intestinale exprimă receptori pentru majoritatea acestor citokine și dovezi pe modelele animale sugerează că mulți dintre acești agenți pot spori proliferarea enterocitelor, migrarea și diferențierea lor, prevenirea apoptozei și promovarea vindecării, toate protejând împotriva EUN [19, 26].

Rolul peptidelor antimicrobiene în lichidul amniotic:

Proteinele și peptidele antimicrobiene (PPA) servesc ca un spectru larg de molecule antiinfecțioase. LA este o sursă bună de defensine neutrofile de tip PPA, cu bactericide, proteine de creștere a permeabilității, calprotectină și defensinul-2 uman (HBD-2) printre altele [45,46]. Aceste PPA consemnează activitatea antimicrobiană a LA și concentrațiile lor cresc în condițiile în care există o invazie microbiană a cavității amniotice. Se consideră că PPA modifică în mod semnificativ microbiota și mediul înconjurător influențează expresia receptorilor de recunoaștere a modelului de la suprafața epitelului intestinal. Nivelurile scăzute ale defensinelor la prematurii sunt asociate cu o incidență crescută a EUN [13]. Concentrațiile mai mari de HBD-2 par să aibă un efect de protecție odată ce EUN este stabilită și conduce la o evoluție mai moderată a bolii. În cazul EUN severe, expresia scăzută a HBD-2 poate sugera un răspuns inadecvat la bacteriile intestinale care pot predispuce la dezvoltarea EUN [48]. PPA pare să joace un rol important de protecție în patogeniza EUN și prezența lor în LA crește potențialul utilizării LA pentru protejarea prematurilor contra EUN.

Rolul factorilor trofici găsiți în LA cu potențial în prevenirea dezvoltării EUN:

LA conține mulți factori trofici (FT) care sunt responsabili pentru creșterea și dezvoltarea TGI. Cu toate acestea, o mulțime de factori sunt, de asemenea, implicați în protecția TGI fetală împotriva leziunilor mucoasei. Unii factori relevanți includ:

1) Factorul de creștere epidermală (EGF): În 1962, a fost descoperit un factor de creștere în salivă care ar putea induce erupția prematură a dinților și deschiderea pleoapelor - de aceea s-a numit factorul de creștere epidermal (EGF) [49]. EGF este parte din grupul de peptide care au structura și afinitatea comună cu receptorul EGF. Este o peptidă mică care funcționează ca peptidă de supraveghere luminală ce poate fi atașată la receptorul EGF de pe membrana bazolaterală atunci când bariera luminală este deteriorată [50]. Deoarece TGI este o barieră importantă contra substanțelor nocive din exterior, există o vindecare rapidă a căptușelii epiteliale afectate prin migrație epitelială

și proliferare, numită restituire [51]. EGF stimulează restituirea mucoasei epiteliale a TGI, mitoză celulară și diferențierea, scade secreția de acid, crește bicarbonatul, secrețiile de mucus și fluxul sanguin al TGI și ajută la digestie prin creșterea secrețiilor de amilază și prin creșterea motilității gastrice. EGF este o moleculă citoprotectoare care poate stabiliza epiteliul TGI de la agenți cum ar fi etanolul sau medicamente antiinflamatoare nesteroidiene [52]. EGF are două funcții fiziologice principale: (1) este implicat în protecția mucoasei și vindecarea căptușelii epiteliale deteriorate și (2) are un rol în digestie, absorbție și transportul nutrienților. Suplimentarea cu FEG protejează șobolanii împotriva leziunilor de tip EUN. În modelele preclinice, FEG promovează maturarea din bariera intestinală, reduce apoptoza enterocitelor și scade reglarea răspunsului inflamator asociat cu leziuni asemănătoare cu EUN [53,54,55].

2) Factorul de creștere al hepatocitului (HGF): Este prezent în LA și laptele uman și este exprimat în țesutul intestinal embrionar și fetal [56]. Receptorul HGF, C-met- o proto-oncogenă care este prezentă pe celulele epiteliale intestinale de criptă, deși este de asemenea exprimată în straturile musculare ale intestinului [26,41]. HGF stimulează proliferarea celulară intestinală in vitro și s-a demonstrat că induce creșterea intestinală la șobolani atunci când este administrată în doze farmacologice [56]. Într-un model animal de EUN, s-a constatat că suplimentarea orală cu LA are rol de protecție experimentală contra EUN la un model de șobolan (model de hipoxie și hipotermie) care a fost mediată, cel puțin parțial, de HGF.

3) Factorul de Creștere- α transformator (TGF- α): Este detectabil în TGI uman la 15 săptămâni de gestație [56]. Are o structură similară cu EGF și se leagă de același receptor. S-a demonstrat că TGF- α recombinant produce un răspuns trofic sinergic al celulelor intestinale cultivate atunci când sunt combinate cu EGF, IGF-1, FGF și HGF [57]. Rolul său principal este considerat a fi repararea mucoasei [56].

4) Factorului de creștere- β transformator (TGF- β): aparține unei familii de peptide de semnalizare care influențează distribuția celulelor stem intestinale. Se consideră că induce diferențierea terminală a celulelor epiteliale intestinale și pentru a accelera rata de vindecare a plăgilor intestinale prin stimularea migrației celulare [19]. A fost sugerat și rolul de prevenire a enterocolitei necrotice [58]. S-a arătat că TGF- β 2, suprimă răspunsul macrofagelor în intestinul în curs de dezvoltare și protejează împotriva inflamației mucoasei. TGF- β ingerat pe cale orală promovează funcția barierei intestinale, toleranța imună și repararea mucoasei în TGI neonatal [60,61].

5) Factorii de creștere similari insulinei (IGF-1 și IGF-2): S-a arătat rolul lor în creșterea somatică și a grosimii peretelui intestinal în monstre duodenale umane [40].

6) Factorul de creștere al fibroblastilor (FGF): Studiile au demonstrat că inhibarea FGF în activitatea LA provoacă o reducere de 58% a celulelor epiteliale intestinale [43, 57].

7) Eritropoietina (EPO): S-a demonstrat că administrarea de EPO recombinată crește înălțimea vilozităților, zona vilozităților, adâncimea criptei și sporește proliferarea celulei epiteliale la puii de șobolan [26,51]. In vitro, a fost demonstrat că EPO recombinată protejează celulele împotriva leziunilor mucoase, iar incidența EUN este raportată a fi mai mică la nou-născuții care au primit EPO recombinată [62].

8) Factor de stimulare a coloniilor de granulocite (G-CSF): Există dovezi că G-CSF poate avea un rol în întreținerea celulară epitelială [28]. Secțiunile intestinelor fetale la 8-10, 16-18 și 22-24 de săptămâni de vârstă postconceptuală au demonstrat prezența receptorilor G-CSF (G-CSF-R). La vârsta de 8-10 săptămâni postconceptuală, G-CSF-R a fost prezentă în nucleele din interiorul epiteliului mucoasei și a fost ocazional proeminentă la baza criptelor.

9) Familia interleukinelor (IL): Conform unor studii, IL-2 sporește vindecarea celulelor epiteliale intestinale și există dovezi că IL-2 joacă un rol crucial în vindecarea mucoaselor. Se consideră că IL-4 îmbunătățește integritatea celulei epiteliale intestinale [30]. IL-6 poate juca un rol în protejarea celulelor intestinale împotriva apoptozei secundare hipoxiei sau altor injurii severe [31]. IL-7 este implicată în primul rând în formarea țesutului limfoid intestinal [32]. S-a demonstrat că IL-1 induce proliferarea celulelor epiteliale intestinale și creșterea consumului de nutrienți. IL-1 are de asemenea, un rol demonstrat de a induce expresia factorului de accelerare a degradării, care este responsabil de degradarea complementului activat (rol de protecție împotriva activării complementului) [37].

Rolul laptelui matern în prevenirea dezvoltării EUN:

Factorii de creștere, cum ar fi EGF, TGF- α și IGF-1 și mulți alții (care sunt aceiași FT din LA), provoacă efecte trofice asupra IGI neonatal și promovează proliferarea și diferențierea celulelor epiteliale [63]. Acești factori favorizează o fluctuație rapidă a enterocitelor de la cripta la vârful vilozității. Mai multe peptide ale laptelui uman cu efect antimicrobian (lactoferina) sunt capabile să influențeze dezvoltarea intestinală [64,65]. Lactoferina se găsește în colostru și în laptele matern matur și promovează diferențierea intestinală [66]. Într-un studiu amplu prospectiv, laptele matern a manifestat un rol protector împotriva EUN. EGF, care este prezent în laptele matern, limitează, de asemenea, leziunea ileală a acizilor biliari și a fost dovedit rolul ei protector împotriva NEC [69]. Oligozaharidele din laptele uman (HMO) sunt prezente în cantități mari în laptele matern și greu digerabile / absorbite de copil, dar traversează bariera și prezintă activități majore [7].

Prebioticele inhibă infecția prin acidificarea lumenului intestinal. Noile dovezi demonstrează că HMO inhibă direct inflamația prin modularea căilor de semnalizare. Good și colab. au sugerat că prezența HMO în laptele matern protejează împotriva EUN prin creșterea fluxului sanguin al mucoaselor [71]. Ei au demonstrat că această protecție a fost asigurată prin întreținerea perfuziei prin reglarea NO. Se consideră că diferiți factori din laptele matern au un rol de protecție împotriva EUN [73].

S-a demonstrat că mulți dintre factorii bioactivi conținuți în laptele uman sunt de asemenea, prezenți în LA [74]. Acest lucru a dus la ipoteza că dacă laptele matern are rol de protecție împotriva dezvoltării EUN, LA ar putea fi administrat postnatal. Ar avea același grad de protecție împotriva EUN din cauza multor proprietăți similare ale acestor două medii biologice. Acest lucru a condus la studii ulterioare care vizează demonstrarea unor asemănări în mecanismele de protecție oferite de LA și de laptele matern împotriva EUN.

Mecanismul de protecție al LA și al laptelui matern împotriva dezvoltării EUN:

După ce multe studii au demonstrat efectele protectoare ale LA și ale laptelui matern

împotriva EUN, a fost important să se elucideze mecanismele implicate. Jantscher-Krenn și colab. [86] au arătat că oligozaharidele din laptele uman, în special complexe de glicani sunt prezente în laptele uman și sunt responsabili pentru efectele benefice în EUN la șobolani neonatali. Dacă această cercetare poate fi transpusă la EUN la nou-născuții umani, poate preveni sau reduce povara EUN la nou-născuți. Good și colab. au demonstrat efectele activării TLR4 mediate de LPZ asupra leziunii și reparării mucoaselor. Ei au emis ipoteza că LA poate inhiba semnalizarea TLR4 în cadrul intestinului fetal și atenuează EUN experimental [87]. În baza acestui studiu a fost demonstrat efectul protector al laptelui matern împotriva dezvoltării EUN[88]. S-au efectuat două studii importante pentru evidențierea efectelor protectoare ale LA și a laptelui matern împotriva dezvoltării EUN.

Studiul 1: Mecanismul LA față de dezvoltarea EUN (studiu în baza șoarecilor) [87]:

Epiteliul intestinal in utero: Good și colab. au demonstrat că livrarea de LPZ în intestinul fetal a dus la o creștere semnificativă a expresiei semnalizării TLR4 și a citokinelor proinflamatorii. Cu toate acestea, administrarea concomitentă de LA și LPZ în TGI reduce semnificativ dimensiunea semnalizării TLR4 în interiorul mucoasei intestinale. Aceste rezultate au demonstrat că LA ar putea inhiba semnalizarea TLR4 în intestinul fetal.

Enterocite cultivate: În a doua parte a studiului s-a emis ipoteza că EGF (un FT major regăsit în LA) a fost responsabil pentru inhibarea expresiei TLR4. Savanții au demonstrat că FEG a provocat o reducere

semnificativă a activării TLR4 mediată de LPZ, efecte care au fost absente când receptorul EGF (EGFR) a fost eliminat.

Epiteliul intestinal epitelial: Ei au demonstrat ulterior că LA a inhibat TLR4 semnalizarea prin EGFR în interiorul intestinului în curs de dezvoltare. Acest lucru a fost făcut prin administrarea LA + LPZ direct în TGI al feșilor de șoareci. Adăugarea unui inhibitor al EGFR a atenuat efectul protector al LA asupra semnalizării TLR4.

Afecțiuni postnatale: În cele din urmă au demonstrat că LA atenuează semnalizarea TLR4 în intestinul postnatal. Administrarea intravenoasă a LA atenuează în mod semnificativ severitatea EUN (reducerea expresiei iNOS în mucoasa intestinală, restaurarea și proliferarea enterocitelor, conservarea arhitecturii mucoaselor și o reducere semnificativă în scorurile histologice) la șoarecii la care EUN a fost indusă de hipoxie și alimentația cu formulă.

Studiul a identificat activarea EGFR ca fiind o cale posibilă care duce la inhibarea TLR4 în cadrul TGI fetal și neonatal. Savanții au demonstrat, de asemenea, că FEG, care este prezent în abundență în LA, a mediat această cale. Constatările lor au subliniat rolul LA în protecția împotriva EUN.

Studiul 2: Mecanismul de protecție al laptelui matern împotriva dezvoltării EUN (studiu pe șoareci) (88):

Enterocitele cultivate: Prima parte a studiului a demonstrat că tratamentul enterocitelor cu lapte matern a redus în mod semnificativ extinderea TLR4 indusă de LPZ mediată de activarea citokinelor proinflamatorii (similar cu administrarea LA).

In vivo: acest efect protector nu a fost observat la șoareci, sugerând că activarea EGFR poate fi responsabilă pentru un astfel de efect de protecție. S-a constatat, de asemenea, că laptele matern inhibă activarea TLR4 in vivo prin activarea EGFR.

Dezvoltarea intestinului: s-a demonstrat că tratamentul șoarecilor cu laptele matern scade semnificativ apoptoza enterocitelor și a proliferării care se observă în modelele experimentale ale EUN. În intestinul în curs de dezvoltare, administrarea de lapte + inhibitor al LPZ + EGFR sau adăugarea de lapte de mamă cu EGF au inversat aceste efecte de protecție (similare cu LA).

În rezumat, cele două studii au demonstrat că atât laptele matern, cât și AF au atenuat EUN prin inhibarea semnalizării TLR4 prin activarea EGFR. Faptul că EGF este prezent în cantități mari în laptele matern și în LA a generat o mare posibilitate de utilizare a LA ca mediu și fluid pentru a împiedica dezvoltarea EUN la prematuri.

Efectul de protecție al LA în prevenirea EUN:

Siggers și colab. au folosit LA porcine de la 30 de porci prematuri. Pentru prima parte a studiului, LA a fost suplimentat în timpul administrării parentera-

le și ulterior nutriției LA a fost suplimentat numai în timpul alimentației enterale. O varietate de metode au fost apoi folosite pentru a evalua TGI pentru semne de EUN. Porcii hrăniți cu LA în timpul alimentației parenterale și enterale au avut scoruri EUN macroscopice mai mici în comparație cu cei care nu au fost hrăniți, totuși, nu a existat nicio diferență în scorurile EUN atunci când porcii au fost hrăniți cu LA numai în timpul alimentării enterale. Creșterea absorbției de galactoză a fost observată la administrarea LA în comparație cu porcii hrăniți cu formula. Mediatori, cum ar fi IL-1 și TNF- α au fost identificați la porcii hrăniți cu LA în timpul tratamentului atât parenteral, cât și în faza nutrițională enterală, fiind evaluați prin analiza microradiografiei TGI.

Producția TNF- α a arătat o scădere dependentă de doză la concentrații sporite de LA, evidențiind proprietățile specifice antiinflamatorii ale LA. De asemenea s-a demonstrat că administrarea postnatală de LA porcilor ca nutriție enterală minimală la prematuri a dus la o creștere în greutate corporală, modificări ale colonizării bacteriene, a redus severitatea EUN și a indus diferența de expresie a ARNm care codifică genele implicate în răspunsurile inflamatorii intestinale. Efectele benefice ale LA au fost observate numai atunci când LA a fost furnizat atât ca o nutriție enterală minimală în timpul alimentației parenterale și următoarea perioadă de alimentație enterală, în timp ce numai LA în timpul perioadei enterale nu au avut efecte similare.

Un subiect important pe care îl are studiul este faptul că activitatea de promovare a creșterii LA la nivelul celulelor intestinale fetale este mai mică în comparație cu laptele matern [57] și concentrațiile factorilor imunomodulatori, cum ar fi TGF- α , sunt doar 10-15% din cele regăsite în colostru [89].

A fost investigat, de asemenea, rolul administrării LA la nivel enteral asupra incidenței și severității EUN experimentale [56]. A fost arătată o incidență semnificativ scăzută și severitate scăzută a EUN la puii de șobolan care au primit 30% LA în comparație cu grupul martor (șobolani care au fost hrăniți cu formulă pură). S-a demonstrat, de asemenea, că suplimentarea cu LA sporește expresia tisulară redusă a citokinelor inflamatorii la puii de șobolan.

În acest studiu, s-a stabilit că LA a crescut semnificativ proliferarea celulelor, migrarea și supraviețuirea *in vitro*. Acest efect a fost blocat atunci când a fost adăugat un inhibitor al receptorului HGF. Savanții au identificat HGF ca fiind o componenta bioactivă cheie LA. Aceste descoperiri au subliniat faptul că LA înghițit are efect de maturare în intestinul în curs de dezvoltare.

EUN este o boală a prematurului și se poate datora faptului că nașterea prematură duce la întreruperea înghițirii de LA și, prin urmare, rata de disponibilitate mică a factorilor trofici ai LA face prematurii mai

vulnerabili la EUN. Acest fapt sugerează posibilitatea că suplimentarea enterală cu LA la prematuri poate fi o modalitate potențială de a furniza factorii trofici pe care copilul l-ar fi primit ca făt *in utero*.

Rolul celulelor stem amniotice:

Celulele stem au devenit o opțiune clinică terapeutică pentru alte boli inflamatorii intestinale care prezintă unele caracteristici ale EUN, cum ar fi boala inflamatorie intestinală [92]. Celulele stem pentru astfel de tulburări sunt derivate din măduva osoasă. Aplicarea LA derivată din celule stem este o metodă nouă și este specifică pentru prevenirea și tratamentul EUN. În prezent, acest potențial al celulelor stem LA este un domeniu cu o cercetare extrem de activă.

Epiteliul intestinal are o rată de diviziune extrem de rapidă, întregul epiteliu fiind reînnoit la fiecare 4-5 zile [93]. Celulele stem intestinale din criptă se divid foarte repede, ceea ce generează celule care se diferențiază în enterocite, celule entero-endocrine și alte epiteliocite specializate, care apoi migrează spre vârful vilozității.

La vârful vilozității, apoptoza este responsabilă de circulația normală a celulelor epiteliale [95]. Aceasta este urmată de clearance-ul autofagic al resturilor apoptotice. În condiții normale, rata de proliferare în cripte este egală cu rata de pierdere de celule la vârful prin apoptoză și autofagie. EUN se caracterizează prin apoptoză crescută, observată atât în studiile experimentale [96] cât și în EUN umană [97]. Dovezi recente sugerează, de asemenea, că autofagia este crescută în EUN experimentală și umană [98].

Descoperirea celulelor stem în LA a condus la cercetări în privința efectului lor asupra EUN. Prezența unei subpopulații a celulelor LA cu caracteristici mezenchimale, care au putut să prolifereze *in vitro* mai rapid decât celulele fetale și cele adulte comparabile au fost descrise în 2001 [100]. Ulterior, s-a demonstrat că LA poate fi o sursă abundentă de celule fetale care prezintă un potențial de diferențiere similar cu cel al celulelor stem derivate din măduva osoasă [101]. Un studiu publicat în 2009 a emis ipoteza că celulele progenitoare intestinale din LA (celulele stem LA) pot oferi o strategie nouă pentru reintegrarea intestinală [103]. Pentru a aborda această ipoteză, autorii au încercat să caracterizeze markerii de celule stem intestinale în LA. S-a obținut LA de la șoareci, el fiind aspirat fără contact cu placenta. Ulterior, ARN a fost extras și rtPCR a fost efectuat pentru Lgr 5 și Musashi-1, markerii selectați ai celei stem intestinale pentru studiu. Celulele AF au fost de asemenea cultivate și extracția de proteine a fost necesară pentru imunobloturi pentru Lgr5 și Musashi-1. Studiul a demonstrat că celulele LA la șoareci au exprimat Lgr 5 încă de la 13,5 săptămâni de gestație, în timp ce Musashi-1 a fost exprimată în primele 12,5 săptămâni de gestație. Ambii markeri au fost exprimați în LA uman începând cu cea de-a 14-a săptămână de gestație. Acest studiu a

demonstrat definitiv că celulele LA exprimă markerii de celule stem intestinale și posibilitatea de a obține celulele progenitoare din LA au reprezentat o etapă critică în ceea ce privește utilizarea lor potențială în vindecarea tulburărilor intestinale secundare la EUN.

Bariere în utilizarea celulelor stem ale LA și viitoarele direcții:

Celulele stem LA sunt o sursă potențială de celule pentru aplicații terapeutice. Cu toate acestea, un important obstacol în calea fabricării celulelor stem de calitate clinică este nevoia de bune practici de fabricare pentru crioconservarea, depozitarea și distribuția acestor celule.

Majoritatea metodelor actuale de crioconservare utilizează crioprotectorul potențial toxic dimetil-sulfoxid în prezența proteinelor din serul animal care împiedică utilizarea directă a aceste celule în aplicațiile terapeutice umane. Un studiu realizat de Seo și colab. a demonstrat că celulele stem LA pot fi conservate cu un sfert din concentrația standard de dimetil-sulfoxidul după adăugarea dizaharidelor, antioxidanților și inhibitorilor de caspază [107].

Preparate de lichid amniotic:

Calhoun și colab. au inițiat studii privind administrarea enterală a preparatelor de lichid amniotic (PLA) [108]. Acest PLA este un factor steril, non - caloric, izotonic, care conține o soluție experimentală [108]. Cei doi factori de creștere ai acestei soluții - factorul de stimulare a coloniilor de granulocite (rG-CSF) și eritropoietina recombinată (rEPO) - se găsesc abundent în laptele uman și LA, joacă un rol-cheie în intestinul în curs de dezvoltare și sunt relativ rezistenți la digestie [109]. Receptorii pentru G-CSF și EPO sunt abundenți pe suprafața luminală a vililor intestinali fetalii [109]. Pentru a furniza aceeași concentrație de G-CSF și EPO ca cea care este înghițită de făt în timpul trimestrului al doilea al sarcinii, rG-CSF și rEPO sunt concentrate de zece ori în PLA [109]. Pentru a evalua toleranța PLA administrată enteral la nou-născuții prematuri, 30 de pacienți au fost împărțiți în 3 grupe [110]. Fiecare grup a primit 5, 10 sau 20 ml / kg / zi de PLA timp de 3 zile zile. Nu a existat nici o dovadă de intoleranță măsurată prin creșterea reziduurilor gastrice, creșterea circumferenței abdominale, diaree, modificări ale tensiunii arteriale, erupție cutanată tranzitorie, EUN sau perforație intestinală. Acest studiu a arătat că administrarea enterală a unei soluții cu LA a fost bine tolerată în doze de până la 20 ml / kg / zi [110]. Un studiu realizat de Christensen și colab. a examinat gradul de intoleranță ale hranei printre sugarii cu greutate foarte mică la naștere după administrarea bolurilor gastrice orale ale unei soluții similare LA. Această soluție a fost administrată împreună cu lapte și a fost întreruptă administrarea atunci când alimentările cu lapte au constituit 80 ml / kg / zi.

Deși potențialul pentru administrarea postnatală a LA este interesant, rămân multe probleme etice în

ceea ce privește colectarea și utilizarea LA, inclusiv:

a) Cum ar trebui să fie colectat LA? Prin amniocenteză sau imediat înainte de naștere?

b) Care este vârsta gestațională optimă pentru colectarea LA?

c) Deoarece nașterea vaginală poate contamina LA, acesta ar trebui să fie colectat numai în timpul cezarienelor dacă nu a fost colectat prin amniocenteză?

d) LA utilizat trebuie să fie recoltat exclusiv de la mama nou-născutului sau poate exista un "donator de LA"?

e) În cazul mamei care nasc prematur, LA poate fi utilizat, chiar dacă riscul de contaminare secundar cu corioamnionita este relativ mare?

f) Sunt oare necesare studii suplimentare pe animale, în afara studiilor efectuate pe șobolani și șoareci, pentru a evalua impactul continuu și siguranța administrării LA?

g) Care este metoda adecvată de sterilizare eficientă a LA?

h) Este posibil ca celulele stem LA să fie administrate în condiții de siguranță fără a cauza alte efecte dăunătoare?

Asemenea probleme etice și de stocare demonstrează că suntem încă în faza incipientă de utilizare a LA ca o posibilă opțiune terapeutică. Cu toate acestea, rolul LA în tratamentul EUN este o zonă extrem de interesantă de cercetare.

Există dovezi de cercetare care demonstrează rolul benefic al suplimentelor de LA. Cu toate acestea, prima regulă în medicină este "nu dăuna" și, prin urmare, se impun în continuare studii și experiențe controlate, randomizate, privind respectarea regulilor de prelevare, stocare și utilizare a LA. Rezultatele lor sunt esențiale înainte ca LA să poată fi utilizat de rutină și în condiții de siguranță.

Bibliografie:

1. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, et al. Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Annals of Surgery* 1978; 187(1):1-7.
2. Warner BB, Tarr PI. Necrotizing enterocolitis and preterm infant gut bacteria. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2016;21(6):394-9.
3. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing Enterocolitis in Newborns. *Drugs* 2008;68(9):1227-38.
4. Patel RM, Kandefor S, Walsh MC et al. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):331-40
5. Lin PW, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis. *The Lancet* 2006;368(9543):1271-83.
6. Panigrahi P. Necrotizing Enterocolitis. *Pediatric Drugs* 2006;8(3):151-65.
7. Pickard SS, Feinstein JA, Popat RA, Huang L, Dutta S. Short- and Long-Term Outcomes of Necrotizing Enterocolitis in Infants With Congenital Heart Disease. *Pediatrics* 2009;123(5).

8. Ganapathy V, Hay JW, Kim JH. Costs of necrotizing enterocolitis and cost effectiveness of exclusively human milk-based products in feeding extremely premature infants. *Breastfeed Med.* 2012 Feb;7(1):29-37
9. Kantorowska A, Wei JC, Cohen RS, Lawrence RA, Gould JB, Lee HC. Impact of donor milk availability on breast milk use and necrotizing enterocolitis rates. *Pediatrics.* 2016;137(3):1-8.
10. Lemyre B, Xiu W, Bouali NR, et al. A Decrease in the Number of Cases of Necrotizing Enterocolitis Associated with the Enhancement of Infection Prevention and Control Measures during a Staphylococcus aureus Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2012;33(01):29-33.
11. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The Role Of The Intestinal Barrier In The Pathogenesis Of Necrotizing Enterocolitis. *Shock* 2007;27(2):124-33.
12. Sodhi CP, Shi XH, Richardson WM et al. Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired β -catenin signaling in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology* 2010;138:185-196
13. Lu P, Sodhi CP. & Hackam DJ. Toll-like receptor regulation of intestinal development and inflammation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pathophysiology* 2014;21:81-93
14. Vongbhavit K, Underwood MA. Prevention of necrotizing enterocolitis through manipulation of the intestinal microbiota of the premature infant. *Clin. Ther.* 2016;38:716-732
15. Arboleya S, Ang L, Margolles A, et al. Deep 16S rRNA metagenomics and quantitative PCR analyses of the premature infant fecal microbiota. *Anaerobe* 2012;18(3):378-80.
16. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery* 2005;14(3):145-51.
17. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14(1):49-57
18. Ford HR, Watkins S, Reblock K et al: The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997;32:275-282.
19. Underwood MA, Sherman MP. Nutritional Characteristics of Amniotic Fluid. *NeoReviews* 2006;7(6).
20. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol.* 1997;40(2):280-289
21. Trahair JF, Harding RR. «Ultrastructural anomalies in the fetal small intestine indicate that fetal swallowing is important for normal development: an experimental study.» *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420(4); 305-312.
22. Trahair JF, Harding R. «The role of ingestion in the development of the small intestine in fetal sheep.» *Q J Exp Physiol* 71(1): 99-104.
23. Condino AA, Barleycorn AA, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. Abnormal Intestinal Histology in Neonates with Congenital Anomalies of the Gastrointestinal Tract. *Neonatology* 2004;85(3):145-50.
24. Drozdowski L, Thomson AB. Intestinal hormones and growth factors: Effects on the small intestine. *World J Gastroenterol* 2009;15(4):385-406.
25. Maheshwari A. Role of cytokines in human intestinal villous development. *Clin Perinatol.* 2004;31(1):143-155
26. Mohankumar K, Namachivayam K, Ho TT, Torres BA, Ohls RK, Maheshwari A. Cytokines and growth factors in the developing intestine and during necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2017;41(1):52-60
27. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001;49:182-189.
28. Calhoun DA, Lunoe M, Du Y, Christensen RD. Granulocyte colony- stimulating factor is present in human milk and its receptor is present in human fetal intestine. *Pediatrics.* 2000;105(1):e7
29. Barmeyer C, Horak I, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. The interleukin-2-deficient mouse model. *Pathobiology* 2003;70:139-142
30. Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A et al. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2766-76
31. Rollwagen F, Yu Z-Y, Li Y-Y, Pacheco N. IL-6 Rescues Enterocytes from Hemorrhage Induced Apoptosis in Vivo and in Vitro by abcl-2 Mediated Mechanism. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1998;89(3):205-13.
32. Welniak LA, Khaled AR, Anver MR et al. Gastrointestinal cells of IL-7 receptor null mice exhibit increased sensitivity to irradiation. *J Immunol* 2001;166:2924-28.
33. Peterson RL, Bozza MM, Dorner AJ. Interleukin-11 induces intestinal epithelial cell growth arrest through effects on retinoblastoma protein phosphorylation. *Am J Pathol* 1996;149:895-902.
34. Takahata Y, Takada H, Nomura A et al. Interleukin-18 in human milk. *Pediatr Res* 2001;50:268-72.
35. Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin Invest Med* 2001;24:250-7.
36. Lonergan M, Aponso D, Marvin KW et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3835-44.
37. Cummins AG, Thompson FM. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut* 2002;51:748-754
38. Tremblay E, Monfils S, Menard D. Epidermal growth factor influences cell proliferation, glycopro-

- teins, and lipase activity in human fetal stomach. *Gastroenterology* 1997;112:1188–96.
39. Dvorak B, Williams CS, McWilliam DL et al. Milk-borne epidermal growth factor modulates intestinal transforming growth factor- α levels in neonatal rats. *Pediatr Res* 2000;47:194–200.
40. Bloomfield FH, Bauer MK, van Zijl PL, Gluckman PD, Harding JE. Amniotic IGF-I supplements improve gut growth but reduce circulating IGF-I in growthrestricted fetal sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(2):E259–69.
41. Burrin DG, Stoll B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clin Perinatol* 2002;29:65–96.
42. Vuorela P, Andersson S, Carpen O, Ylikorkala O, Halmesmaki E. Unbound vascular endothelial growth factor and its receptors in breast, human milk, and newborn intestine. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1196–201.
43. Chailier P, Basque JR, Corriveau L, Menard D. Functional characterization of the keratinocyte growth factor system in human fetal gastrointestinal tract. *Pediatr Res* 2000;48:504–10.
44. Maheshwari A, Lu W, Lacson A et al. Effects of interleukin-8 on the developing human intestine. *Cytokine* 2002;20:256–67.
45. Battersby AJ, Khara J, Wright VJ, Levy O, Kampmann B. Antimicrobial Proteins and Peptides in Early Life: Ontogeny and Translational Opportunities. *Frontiers in Immunology*. 2016;7
46. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2003;13(1):2–21.
47. Salzman NH, Polin RA, Harris MC et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 1998;44:20–6
48. Jenke ACW, Zilbauer M, Postberg J, Wirth S. Human β -defensin 2 expression in ELBW infants with severe necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2012;72:513–20
49. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555–62
50. Playford RJ, Wright NA. Why is epidermal growth factor present in the gut lumen? *Gut* 1996;38:303–305
51. Lacy ER. Epithelial Restitution in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Clinical Gastroenterology* 1988;10.
52. Playford RJ, Marchbank T, Calnan DP, Calam J, Royston P, Batten JJ et al. Epidermal growth factor is digested to smaller, less active forms in acidic gastric juice. *Gastroenterology* 1995;108:92–101
53. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H et al. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(1):G156–64.
54. Clark JA, Doelle SM, Halpern MD et al. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(5):G938–49
55. Clark JA, Lane RH, MacLennan NK et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(4):G755–62
56. Jain SK, Baggerman EW, Mohankumar K et al. Amniotic fluid-borne hepatocyte growth factor protects rat pups against experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306(5):G361–69
57. Hirai C, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:524–528
58. Claud EC, Savidage T, Walker WA. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* 2003;53:419–425
59. Maheshwari A, Kelly DR, Nicola T et al. TGF- β 2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology* 2011;140:242–253
59. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal rescue of transforming growth factor beta 1 null mice. *Science*. 1994;264(5167):1936–38
60. Leberman DA, Edmiston JS. The role of TGF- β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect*. 1999;1(15):1297–1304.
61. Semba RD, Juul SE. Erythropoietin in human milk: physiology and role in infant health. *J Hum Lact*. 2002;18(3):252–61
62. Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: implications for nutrition support. *Nutr Clin Pract*. 2007;22:159–73.
63. Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res*. 2007;61:2–8
64. Goldman AS, Garza C, Nichols BL, Goldblum RM. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J Pediatr*. 1982; 100:563–67.
65. Buccigrossi V, De Marco G, Bruzzese E et al. Lactoferrin induces concentration dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatr Res*. 2007; 61:410–14.
66. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet*. 1990;336(8730):1519–23.
67. Halpern MD, Dvorak B. Does abnormal bile acid metabolism contribute to NEC? *Semin Perinatol*. 2008;32(2):114–21
68. Halpern MD, Holubec H, Saunders TA et al. Bile

acids induce ileal damage during experimental necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology*. 2006;130(2):359–70

69. Newburg DS, He Y. Neonatal Gut Microbiota and Human Milk Glycans Cooperate to Attenuate Infection and Inflammation. *Clin Obstet Gynecol*. 2015;58(4):814–26

70. Good M, Sodhi CP, Yamaguchi Y, et al. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose attenuates the severity of experimental necrotizing enterocolitis by enhancing mesenteric perfusion in the neonatal intestine. *British Journal of Nutrition* 2016;116(07):1175–87.

71. Meinen-Derr J, Poindexter B, Wrage L, Morrow AL, Stoll B, Donovan EF. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol*. 2009 Jan;29(1):57–62

72. Good M, Sodhi CP, Hackam DJ. Evidence based feeding strategies before and after the development of necrotizing enterocolitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(7):875–84.

73. Siggers J, Ostergaard MV, Siggers RH et al. Postnatal amniotic fluid intake reduces gut inflammatory responses and necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(10):G864–75

74. Stadnyk AW. Cytokine production by Epithelial Cells. *FASEB J*. 1994;8:1041–47

75. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and Regulated Expression of C-X-C, C-C and C-Chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology*. 1997;113:1214–23

76. Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*. 1998;187:2097–2101

77. Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):6043–8.

78. Jilling T, Simon D, Lu J et al. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J. Immunol*. 2006;177:3273–82.

79. Sharma R, Tepas JJ, III ML et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg*. 2007;42:454–61.

80. Chan KL, Ho JC, Chan KW, Tam PK. A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg*. 2002;37:1435–40.

81. Akira, SK, Takeda T, Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol*. 2001;2:675–80.

82. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal

response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86:973–83

83. Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004;113(2):153–62.

84. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC et al. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol*. 2007;179(7):4808–20.

85. Jantscher-Krenn, Zherebtsov M, Nissan C et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto_N-tetraose prevents necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *Gut* 2012;61:1417–25.

86. Good M, Siggers RH, Sodhi CP et al. Amniotic fluid inhibits Toll-like receptor 4 signaling in the fetal and neonatal intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2012;109(28):11330–5

87. Good M, Sodhi CP, Egan CE et al. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol*. 2015 Sep;8(5):1166–79

88. Sangild PT, Mei J, Fowden AL, Xu RJ. The prenatal porcine intestine has low transforming growth factor-ligand and receptor density and shows reduced trophic response to enteral diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R1053–62

89. Christensen RD, Havranek T, Gerstmann DR, Calhoun DA. Enteral administration of a simulated amniotic fluid to very low birth weight neonates. *J Perinatology* 2005;25:380–5.

90. Barney CK, Lambert DK, Alder SC, Scofield SH, Schmutz N, Christensen RD. Treating feeding intolerance with an enteral solution patterned after human amniotic fluid: a randomized, controlled, masked trial. *J Perinatology* 2007;27:28–31.

91. Cassinotti A, Annaloro C, Ardizzone S et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut* 2008;57:211–7

92. Eaton S, Zani A, Pierro A, De Coppi P. Stem cells as a potential therapy for necrotizing enterocolitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(12):1683–9

93. Clevers H, Batlle E. SnapShot: the intestinal crypt. *Cell* 2013;152:1198

94. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal-tract - the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107:3569–77

95. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2004;55:622–9

96. Eaton S, Sebire NJ, Thyoka M, Pierro A. Histological and immunohistochemical features associated with outcome in neonatal necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2014;24(1):51–6

97. Maynard AA, Dvorak K, Khailova L et al. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G614-22
98. Feng J, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes enterocyte migration and proliferation in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007;42:214-20
99. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennigns RW, Ziegler MM, Fauza Do. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 2001;36:1662-5
100. Prusa AR, Marton E, Rosner M et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2003;18:1489-93
101. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. *Stem Cells* 2001;19(4):271-8
102. Emami CN, Upperman J, Ford HR, et al. Amniotic fluid cells express intestinal stem cell markers of Lgr 5 and Musashi-1. *Journal of the American College of Surgeons* 2009;209(3).
103. Zani A, Cananzi M, Fascetti-Leon F et al. Amniotic fluid stem cells improve survival and enhance repair of damaged intestine in necrotising enterocolitis via a COX-2 dependent mechanism. *Gut*. 2014;63(2):300-9
104. Tessner TG, Muhale F, Riehl TE et al. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest* 2004;114:1676-85.
105. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999;5:698-701.
106. Seo JM, Sohn MY, Suh JS, Atala A, Yoo JJ, Shon YH. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 2011;62(3):167-73
107. Calhoun DA, Christensen RD. Hematopoietic growth factors in neonatal medicine: The use of enterally administered hematopoietic growth factors in the neonatal intensive care unit. *Clinics in Perinatology*. 2004;31(1):169-82.
108. Smith CG. In the Critically Ill, Nothing-by-Mouth Infant, Would Enteral Administration of Simulated Amniotic Fluid Improve Feeding Tolerance Compared with the Current Practice of No Therapy? An Evidence-Based Review. *Neonatal Network: The Journal of Neonatal Nursing* 2011;30(2):105-15
109. Sullivan SE, Calhoun DA, Maheshwari A, et al. Tolerance of Simulated Amniotic Fluid in Premature Neonates. *Annals of Pharmacotherapy* 2002;36(10):1518-24
110. Corpeleijn WE, van Vliet I, de Gast-Bakker DA et al. Effect of enteral IGF-1 supplementation on feeding tolerance, growth, and gut permeability in enterally fed premature neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008; 46(2):184-90.