UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

PRZEMKO KWINTA

OCENA UWALNIANIA CYTOKIN PRZECIW I PROZAPALNYCH U NOWORODKÓW Z BARDZO NISKĄ URODZENIOWĄ MASĄ CIAŁA

Praca na stopień doktora nauk medycznych powstała w Klinice Chorób Dzieci
Katedry Pediatrii WL CMUJ
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek J. Pietrzyk

Bibl. Medyczna CM UJ
1816019672

PROMOTOR:
PROF. DR HAB. MED. JACEK J. PIETRZYK

Kraków 2002

Panu Profesorowi J. Pietrzykowi
oraz całemu zespołowi Oddziału
Intensywnej Terapii i Patologii
Noworodka składam gorące
podziękowania za pomoc w realizacji
i opracowaniu pracy.

SPIS TREŚCI

strona

1. Wstęp 4
2. Cel pracy 16
3. Materiał 17
4. Metody
   - 4.1. Opis badania 19
   - 4.2. Metody laboratoryjne 22
   - 4.3. Metody statystyczne 24
5. Wyniki
   - 5.1. Porównanie badanych grup 26
   - 5.2. Ocena stężeń cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w zależności od wieku płodowego i urodzeniowej masy ciała 29
   - 5.3. Ocena stężeń cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w zależności od wieku kalendarzowego 35
   - 5.4. Ocena uwalniania cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w czasie posocznicy 36
   - 5.5. Ocena uwalniania cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w czasie martwiczego zapalenia jelit 44
   - 5.6. Korelacje pomiędzy uwalnianymi w czasie martwiczego zaplenia jelit lub posocznicy cytokinami 47
   - 5.7. Ocena dynamiki uwalniania cytokin u dzieci z posocznicą 54
   - 5.8. Ocena przydatności klinicznej wybranych badań laboratoryjnych 56
6. Dyskusja 62
7. Weryfikacja hipotez 78
8. Wnioski 78
9. Streszczenie 79
10. Piśmiennictwo 80

1. Wstęp

Postęp neonatologii oraz wprowadzenie nowych rozwiązań technologicznych w ostatnich latach sprawiły, że wzrosła liczba noworodków z bardzo niską masą ciała (VLBW - Very Low Birth Weight - noworodki z masą ciała poniżej 1500g), które przeżywają okres okołoporodowy. Jednym z głównych problemów stanowiących wyzwanie dla neonatologów staje się, zatem dalsza opieka nad tymi noworodkami, taka, aby „osiągnąć rozwój dziecka na tym samym poziomie jak by się rozwijało wewnątrzmacicznie, bez niepożądanego wpływu na niedojrzały organizm"(1). Osiągnięcie tego celu wymaga wielospecjalistycznej opieki zarówno na oddziale noworodkowym jak i po wypisie dziecka ze szpitala. Postępowanie obejmuje m.in. dokładne monitorowanie funkcji życiowych, wspomaganie układu oddechowego, właściwe żywieniowe pozajelitowe i dojelitowe, zapobieganie i leczenie zakażeń, a w następnym okresie opiekę okulistyczną, neurologiczną, rehabilitacyjną itp.

Mimo postępów w opiece nad noworodkami wciąż jedną z najistotniejszych przyczyn umieralności noworodków z niską urodzeniową masą ciała są zakażenia. Ocenia się, że choroby infekcyjne występują u około 10% noworodków. Należą do nich zarówno zakażenia wewnątrzmaciczne, okołoporodowe i późne zakażenia nabyte w ciągu pierwszego miesiąca życia. (34). Do najniebezpieczniejszych należą uogólnione zakażenia bakteryjne i grzybicze. Częstość posocznicy bakteryjnej wśród noworodków szacowana jest na 1-10 przypadków / 1000 żywych urodzeń (99). Grupą szczególnego ryzyka są noworodki leczone w oddziałach intensywnej terapii. Częstość posocznicy wśród tak wyselekcjonowanej populacji noworodków oceniana jest według różnych autorów od 20% do 25% (66;105). Częstość zakażeń zależy głównie od występujących czynników predysponujących. Należą do nich czynniki matczyne, noworodkowe i czynniki związane z samą ciążą i porodem (31). Najistotniejszym czynnikiem ryzyka zakażenia ze strony noworodka jest przede wszystkim dojrzałość noworodka (100). Dojrzałość noworodka ściśle związana jest z dojrzałością i czynnością układów obronnych. Według wielu autorów właśnie niedojrzałość układu immunologicznego jest główną przyczyną podatności noworodków z niską urodzeniową masą ciała na zakażenia (29-31;34). Do czynników ryzyka zakażenia bakteriami Gram ujemnymi zalicza się występujący u noworodków niedobór immunoglobulin klasy M (wynikający z braku transportu przez łożysko) – immunoglobulin będących opsoninami

ułatwiającymi fagocytozę (15). W pierwszych 2 tygodniach życia noworodka nie stwierdza się obecności we krwi immunoglobulin klasy A. Wykazano także, zmniejszoną czynność chemotaktyczną leukocytów oraz zmniejszoną aktywność fagocytarną i bakteriobójczą leukocytów (7). Mimo prawidłowej bezwzględnej liczby limfocytów T, B i NK u wcześniaków, czynność i kooperacja tych komórek jest również niedojrzała (7). Zakażeniom u wcześniaków sprzyja także niedojrzałość naturalnych barier: skóry, powierzchniowego układu obronnego układu oddechowego (zmniejszone wydzielanie sIgA, lizozymu) oraz układu pokarmowego. Ostatnio wykazano m.in. związek niedoboru białek surfaktantu SP-A i SP-D a zwiększoną zapadalnością na zakażenia układu oddechowego (4).

W zależności od czasu wystąpienia objawów zakażenia wyróżnić można: zakażenia o wczesnym początku (*early onset)* i zakażenia o późnym początku (*late onset)*. Objawy zakażenia o wczesnym początku występują w pierwszych kilku dniach życia. Zazwyczaj źródłem zakażenia jest matka. Do zakażenia może dojść jeszcze w czasie trwania ciąży (zakażenie płynu owodniowego, przedwczesne pęknięcie błon płodowych) lub w trakcie porodu (zakażenia bakteriami bytującymi w drogach rodnych matki). Do najczęstszych patogenów szerzących się tą drogą należą: *Escherichia coli, Streptococcus* grupy B, *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealythicum, Listeria monocytogenes, Candida albicans*. Należy zwrócić uwagę, że ścisła definicja czasowa zakażenia o wczesnym początku jest trudna i według wielu autorów powinna również uwzględniać etiologię zakażenia (29). Najczęściej przyjmuje się, że objawy zakażenia bakteryjnego o wczesnym początku powinny wystąpić do końca 3. doby życia dziecka (za wyjątkiem infekcji drobnoustrojami atypowymi: *C. trachomatis* i *U. urealythicum*, gdzie okres inkubacji może wynosić nawet do 3 tygodni), a objawy zakażenia grzybiczego o wczesnym początku powinny wystąpić do 10-14 doby życia.

Zakażenia o późnym początku najczęściej w przypadku noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała są zakażeniami wewnątrzszpitalnymi. Do czynników ryzyka zakażeń o późnym początku należy: wykonywanie zabiegów chirurgicznych, intubacja i wentylacja mechaniczna, cewnikowanie centralnych naczyń żylnych, odżywianie pozajelitowe, inwazyjne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi (59). Częstość występowania wewnątrzszpitalnych zakażeń u noworodków z małą urodzeniową masą ciała wynosi od 12% do 50% (32;85;105). Od 1980 roku za najistotniejszy czynnik etiologiczny zakażeń o późnym początku uważane są gronkowce koagulazoujemne (29). Śmiertelność w zakażeniach wywołanych tymi drobnoustrojami nie jest duża, ale

zachorowalność w niektórych oddziałach intensywnej terapii noworodka wynosi nawet 50% (36). Według badań Salomao i wsp. proporcja zakażeń wywołanych przez gronkowce w ostatnich latach zwiększa się i aktualnie szacuje się, że stanowią przyczynę około 60% zakażeń u noworodków (105). Mogą być czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia wsierdzia, martwiczego zapalenia jelit i innych ogniskowych zmian zapalnych, ale najczęściej wywołują posocznicę o umiarkowanej ciężkości przebiegu. Dla posocznicy gronkowcowej charakterystycznymi objawami są upośledzona tolerancja karmienia, bezdechy, ale zakażenie to może przebiegać również bezobjawowo i trudno jest wtedy wypowiedzieć się czy dodatnie posiewy są rzeczywiście wynikiem zakażenia (59). O wiele bardziej groźną dla noworodków z małą urodzeniową masą ciała jest posocznica wywołana przez bakterie Gram ujemne. Uważana jest za jedną z najbardziej niebezpiecznych jednostek chorobowych okresu noworodkowego a śmiertelność może sięgać 50% (100;116). Początek choroby zazwyczaj jest nagły, a progresja objawów bardzo szybka. Zakażenie bakteriami Gram ujemnymi jest najczęstszą przyczyną wstrząsu septycznego u noworodków (65;86).

W patofizjologii posocznicy Gram ujemnej decydującą rolę odgrywają endotoksyny (39). Endotoksyny będące liposacharydami (LPS) stanowią część ściany komórkowej wszystkich bakterii gram ujemnych. W badaniach na zwierzętach wykazano, że podanie czystego LPS wywołuje te same zmiany patofizjologiczne, jakie w przebiegu posocznicy Gram ujemnej (61). Obecność LPS stwierdzono nie tylko we krwi, ale również w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z objawami zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii Gram ujemnej. Najistotniejszym elementem składowym LPS jest lipid A charakteryzujący się bardzo dużą bioaktywnością, który obecnie uważa się za czynnik sprawczy reakcji endotoksycznej. Lipid A jest cząsteczką o konserwatywnej strukturze, występującą w ścianie wszystkich bakterii Gram ujemnych. Niewielkie ilości LPS są w ustroju bardzo szybko neutralizowane przy udziale układu siateczkowo-śródbłonkowego oraz enzymów osoczowych i produkowanych przez granulocyty obojętnochłonne (np. bactericidal permeability-increasing protein). Według obecnej wiedzy zasadniczym etapem odpowiedzi na LPS jest aktywacja makrofagów i monocytów. LPS wykazuje powinowactwo do 3 typów receptorów komórkowych: receptora CD14, receptora SR (*scavenger receptor*) oraz β2 (CD11/CD18) integryny. Połączenie LPS z receptorami CD14 lub CD11/CD18 aktywuje wewnątrzkomórkowy układ sygnalizacyjny. Wynikiem wzbudzenia

makrofaga jest wzrost jego aktywności fagocytarnej - zdolności internalizacji bakterii oraz uwalnianie licznych mediatorów rozpoczynających kaskadę reakcji zapalnej. Poza tym, w surowicy istnieje białko wiążące LPS (LPB- LPS binding protein (56)) oraz rozpuszczalna frakcja receptora CD14 (sCD14 – soluble CD14). Aktywacja makrofagów, w tym uwalnianie mediatorów jest silniejsza, jeżeli do receptorów komórkowych (CD14 lub CD11/CD18) przyłączy się kompleks LPS-białko wiążące LPS (wykazano, że uwalnianie TNFα jest 100-1000 razy silniejsze) lub kompleks LPS-sCD14. (50;79). Dodatkowo ostatnio opisano, że w odpowiedzi na LPS mogą brać również udział receptory TLR-2, TLR-4 (Toll-like receptors) (45). Warto w tym miejscu podkreślić, że LPS nie jest toksyczny dla komórek pacjenta, uszkodzenia powstają w wyniku odpowiedzi ustroju, głównie poprzez aktywację szeregu cytokin (57).

Wczesny etap odpowiedzi na zakażenie, jak wspomniano powyżej zależy od aktywacji makrofagów i monocytów. Molekułą, która wydaje się odgrywa kluczową rolę w tym procesie jest receptor CD14. Receptor CD14 poza występowaniem na powierzchni makrofagów i monocytów, może również być obecny na powierzchni wielojądrzastych granulocytów obojętnochłonnych. Receptor CD14 wykazuje powinowactwo nie tylko do LPS, ale także do innych produktów bakteryjnych np. peptydoglikanu – części ściany komórkowej bakterii Gram dodatnich. Wydaje się zatem, że receptor CD14 jest początkiem układu sygnalizacyjnego układu odpornościowego wspólnym dla różnych patogenów (45). W badaniach eksperymentalnych wykazano m.in., że u myszy, u których brak było ekspresji receptora CD14 na powierzchni makrofagów i monocytów nie występowały objawy wstrząsu septycznego po podaniu LPS lub innych składników ścian bakteryjnych. Haziot i wsp. wykazali również, że u myszy z niedoborem CD14 w czasie zakażenia *S. aureus* uwalniane są znacznie mniejsze ilości cytokin (głównie TNFα) (42). W modelach eksperymentalnych zaobserwowano jednakże, że ekspresja receptora CD14 na monocytach po stymulacji LPS jest znacząco mniejsza w porównaniu do komórek nie stymulowanych (44). Podobne wyniki uzyskano porównując ekspresję receptora CD14 u zdrowych ochotników i dorosłych pacjentów z posocznicą (108). Znaczenie tego faktu, z punktu widzenia klinicznego nie jest jednak wyjaśnione. Dodatkowo w powyższej pracy Hiki i wsp. stwierdzili zwiększone stężenia w surowicy rozpuszczalnej frakcji receptora CD14 u chorych z posocznicą. Przypuszcza się, że w trakcie odpowiedzi na zakażenie może dochodzić do „zrzucania" z powierzchni komórek

receptora CD14. Zaobserwowano, że kompleks LPS-sCD14 jest łatwiej neutralizowany przez makrofagi. Warto zauważyć, że zwiększenie stężenia sCD14 może być wartościowym wskaźnikiem diagnostycznym. Blanco i wsp. stwierdzili, że u noworodków z posocznicą stężenia sCD14 są 2 krotnie większe niż u dzieci zdrowych. Ponadto istnieje zależność między etiologią posocznicy a obserwowanymi stężeniami sCD14 (stężenia sCD14 są znacząco większe u dzieci z posocznicą o etiologii Gram ujemnej) (12).

Aktywacja makrofagów i monocytów prowadzi do uwalniania szeregu cytokin. Cytokinami nazywa się glikoproteiny nie będące immunoglobulinami, które są mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych oraz uczestniczą w regulacji krwiotworzenia (48). Wśród cytokin można wyróżnić substancje działające miejscowo (na zasadzie parakrynnej) oraz substancje działające ogólnoustrojowo (np. Interleukina-6). Inny podział cytokin oparty jest o czas, w którym są one uwalniane w odpowiedzi na bodziec: cytokiny uwalniane we wczesnej fazie zapalenia (0-24 godziny) oraz cytokiny uwalniane w późnej fazie zapalenia (po 24 godzinach od zadziałania bodźca) lub oparty jest na głównym efekcie działania: 1) hematopoetyny (IL-2, IL-7, IL-9, G-CSF, GM-CSF), 2) interferony, 3) chemokiny i 4) cytokiny TNF podobne.

W patofizjologii okresu noworodkowego najczęściej w piśmiennictwie uwzględniane są: interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), interleukina 8 (IL-8) oraz czynnik wywołujący martwicę guza (TNF -tumor necrosis factor) (39). IL-1 jest cytokiną należącą do grupy mediatorów pierwotnej odpowiedzi na czynniki stymulujące (m.in. LPS) i odgrywa istotną rolę w stymulacji uwalniania kolejnych mediatorów. Obecnie wyróżnia się dwie formy IL-1 - formę α oraz formę β. Formą biorącą udział w reakcji zapalnej jest głównie IL-1β. Tak jak istnieją dwie formy IL-1, również istnieją dwa receptory (IL-1RI oraz IL-1RII), odpowiadające za dalsze przekazanie sygnału. IL-1β wykazuje powinowactwo do receptora IL-1RI, który występuje na komórkach różnego typu: m.in. limfocytach T i B, makrofagach, komórkach śródbłonka, fibroblastach, osteoklastach, miocytach, hepatocytach i komórkach nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. Z lokalizacją receptora IL-1RI wiąże się działanie IL-1β – dojrzewanie limfocytów B i T, aktywacja makrofagów, produkcja niektórych białek ostrej fazy w wątrobie (ceruloplazmina, składnik C3 dopełniacza), działanie pirogenne, senność, katabolizm w komórkach mięśniowych itp. Poza tym IL-1β jest jedną z najważniejszych cytokin uwalniających kolejne cytokiny reakcji zapalnej (IL-2, IL-6, TNFα, Interferon γ). IL-6 uważana jest za cytokinę o najbardziej szerokim

zakresie działania i przez to za jeden z najważniejszych czynników regulujących reakcje zapalne i immunologiczne u człowieka. Udział w rozwoju reakcji zapalnej polega przede wszystkim na pobudzaniu hepatocytów do produkcji białek ostrej fazy (m.in. białka C-reaktywnego – CRP, haptoglobiny, fibrynogenu, fibronektyny, α2-makroglobuliny) oraz stymulacji przemiany limfocytów B w komórki produkujące przeciwciała. Należy podkreślić, że właśnie IL-6 jest najistotniejszym i najsilniejszym stymulatorem rozwoju reakcji ostrej fazy, czyli nieswoistej reakcji obronnej w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek.

Cytokiną należącą do innej grupy jest TNFα, dawniej zwany kachektyną ze względu na swój udział w rozwoju kacheksji u chorych z chorobami nowotworowymi Produkowany jest przede wszystkim przez makrofagi i monocyty. Najsilniejszym stymulatorem uwalniania TNFα jest LPS. Receptory dla TNFα (występują dwa typy receptorów TNF-RI i TNF-RII) obecne są na prawie wszystkich typach ludzkich komórek, przez co również ta cytokina charakteryzuje się szerokim zakresem działania. Udział w reakcji zapalnej wiąże się zarówno z działaniem parakrynnym (działa chemotaktycznie na makrofagi i granulocyty obojętnochłonne, wzmaga cytotoksyczność makrofagów, indukuje uwalnianie szeregu cytokin przez limfocyty i makrofagi) jak i endokrynnym (powoduje uwalnianie puli zapasowej granulocytów obojętnochłonnych ze szpiku kostnego). Cytokina ta jest interesująca również ze względu, że w ostatnich latach prowadzonych było wiele badań nad klinicznym zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał przeciwko TNFα (antyTNFαAb). Aktualnie podejmowane są próby leczenia za pomocą antyTNFαAb chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz dorosłych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (49).

Odmienne działanie od wymienionych powyżej cytokin w badaniach eksperymentalnych wykazuje Interleukina-10 (IL-10). Zaliczana jest do grupy mediatorów hamujących proces zapalny. Produkowana jest głównie przez limfocyty Th2, choć może być uwalniana w dużo mniejszych ilościach również przez limfocyty B, monocyty i makrofagi. W badaniach in vitro wykazano, że IL 10 hamuje uwalnianie cytokin zarówno przez limfocyty Th1 (IFN γ, IL-2, IL-3) jak i przez makrofagi i monocyty, w tym szczególnie silnie hamowane jest uwalnianie IL-1α, IL-6 i TNFα.

Posocznica u noworodka jest stanem, w którym wczesne rozpoznanie i wdrożenie odpowiedniego leczenia przyczynowego decyduje o rokowaniu. Rozpoznanie posocznicy na podstawie obrazu klinicznego jest tym trudniejsze im mniej dojrzałe jest dziecko. Wczesne objawy choroby mogą być niecharakterystyczne, a z

drugiej strony nie ma miarodajnego, pojedynczego testu laboratoryjnego umożliwiającego wiarygodną diagnozę posocznicy przed uzyskaniem dodatniego wyniku posiewu z krwi (101). Dla przykładu, według wytycznych Polskiego Towarzystwa Neonatologicznego jednym z kryteriów diagnozy posocznicy bakteryjnej u noworodka jest uzyskanie nieprawidłowych wyników co najmniej trzech spośród czterech testów laboratoryjnych: stężenia glukozy w surowicy, leukocytozy, wskaźnika stosunku form młodych do dojrzałych granulocytów, stężenia CRP (64). W związku z tym nadal poszukuje się nowych czułych i swoistych testów. Rozważane jest m.in. wykorzystanie oznaczania stężeń wspomnianych powyżej cytokin (IL-6, TNFα) oraz prokalcytoniny. Wstępne wyniki badań są zachęcające (14;21;33).

Elementem opieki nad noworodkiem z małą masą ciała stanowiącym szczególne wyzwanie dla neonatologów jest odpowiednie żywienie. Opracowanie programu żywienia wcześniaków powinno opierać się na poznaniu różnic w zapotrzebowaniu na składniki odżywcze u noworodków urodzonych przedwcześnie (90) i poznaniu odrębności w fizjologii przewodu pokarmowego. Podstawowe różnice w zapotrzebowaniu na składniki pokarmowe związane są ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym - gdyż u wcześniaków występuje duża utrata energii poprzez niewidzialną utratę wody, niedojrzałe są mechanizmy termoregulacji, jak również zwiększone zapotrzebowanie na energię występuje w przypadku wysiłku oddechowego, wzrastania, czy też wykonywania zabiegów medycznych (98). Również występują znaczące różnice w zapotrzebowaniu na składniki pokarmowe, w tym na białko. Związane jest to z nasiloną syntezą i dużym komórkowym „obrotem" białka. U wcześniaków brak jest także substancji prawidłowo gromadzonych w ostatnim trymestrze ciąży (43).

Prowadzenie żywienia u wcześniaków powinno uwzględniać niepełną dojrzałość czynnościową przewodu pokarmowego – niedojrzałość motoryczną jelit -zmniejszenie częstotliwości ruchów perystaltycznych dwunastnicy, małe różnice ciśnień w świetle jelit w czasie skurczów perystaltycznych, opóźnione opróżnianie żołądka (18), niewydolność zastawki krętniczo-kątniczej - możliwość kolonizacji jelita cienkiego przez bakterie jelita grubego, skrócenie czasu przebywania pokarmu w jelicie cienkim - zmniejszenie absorpcji (109)), niedojrzałą koordynację odruchów ssania i połykania (62), nie w pełni wykształcone szlaki metaboliczne (90). Również u wcześniaków nie w pełni dojrzałe jest wydzielanie hormonów jelitowych (zmniejszone wydzielanie gastryny i motyliny, brak wpływu insuliny na wydzielanie innych hormonów).

Dodatkowo niedojrzałość innych układów np. brak odruchu kaszlu również utrudniają żywienie (zwiększone ryzyko aspiracji pokarmu do dróg oddechowych).

Pierwszym etapem jest prowadzenie żywienia pozajelitowego oraz w zależności od stanu klinicznego noworodka stymulacja przewodu pokarmowego niewielkimi objętościami (minimal feeding) pokarmu naturalnego podawanego przez sondę do żołądka. Obecność pokarmu w świetle przewodu pokarmowego wpływa na dojrzewanie nabłonka jelitowego, stymuluje motorykę układu trawiennego oraz produkcję enterohormonów (8;80). Od 3-14 dnia życia u wcześniaków w ustabilizowanym stanie klinicznym należy rozpocząć żywienie dojelitowe. Większość autorów zaleca podawanie pokarmu przez sondę żołądkową w sposób przerywany (co 1-2 godziny) (35). Ma to na celu fizjologiczną stymulację wydzielania hormonów przewodu pokarmowego. Pokarmem z wyboru jest pokarm matki. Posiada najwłaściwsze proporcje składników pokarmowych, jest efektywnie wchłaniany posiada właściwości immunologiczne oraz zawiera różnego rodzaju enzymy, hormony i czynniki wzrostowe. Karmienie pokarmem naturalnym zmniejsza ryzyko wystąpienia NEC. Ponadto wykazano korzystny wpływ karmienia pokarmem naturalnym na rozwój centralnego układu nerwowego u wcześniaków (prawdopodobnie związane jest to z zawartością kwasów dekozaheksaenowego oraz arachidonowego) i na ich dalszy rozwój intelektualny (72;73). W przypadku trudności w jego uzyskaniu stosuje się mieszanki zawierające zwiększoną zawartością białka, składników mineralnych i witamin (102). W piśmiennictwie nie ma porozumienia, co do tempa zwiększania obciążenia przewodu pokarmowego (przyjmuje się tylko, że w pierwszym okresie prowadzonego żywienia nie powinno ono przekraczać 20 ml/kg/dobę (84)) oraz stężenia stosowanych mieszanek. Powolne wprowadzanie karmienia dojelitowego wiąże się z koniecznością długiego stosowania żywienia pozajelitowego, co może być istotnym czynnikiem ryzyka takich powikłań: jak posocznica Gram dodatnia, zaburzenia metaboliczne, cholestaza, zaburzenia w mineralizacji kości. Natomiast przy szybkim obciążaniu przewodu pokarmowego mogą wystąpić objawy nietolerancji karmienia (wzdęcia brzuszka, zaleganie pokarmu w żołądku) oraz zwiększa się ryzyko wystąpienia martwiczego zapalenia jelit (NEC - Necrotizing Enterocolitis).

NEC jest chorobą, na którą zapadają głównie noworodki urodzone przedwcześnie. Dotyczy ona od 1 do 5 % pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii noworodka (NICU - Neonatal Intensive Care Unit) (109). Etiologia NEC nie jest w pełni poznana. Pierwsze hipotezy na temat patogenezy NEC zakładały,

że istnieje związek pomiędzy niedokrwieniem jelit, wcześniactwem, karmieniem dojelitowym (zaobserwowano, że 90-95% pacjentów, u których wystąpił NEC, było karmionych dojelitowo (60;78)) i wzrostem bakterii w świetle przewodu pokarmowego. W myśl tej teorii niedokrwienie i niedotlenienie jelit u wcześniaków predysponowało do przechodzenia bakterii ze światła przewodu pokarmowego do krwi, a pokarm w świetle przewodu pokarmowego służył za pożywkę do rozwoju bakterii (55;83). Jednakże, obserwowane są przypadki NEC u donoszonych noworodków bez uchwytnych czynników ryzyka, a u wielu dzieci do rozwoju NEC dochodzi zanim rozpoczęte jest karmienie dojelitowe, co może przemawiać przeciwko tej hipotezie. Aktualnie przyjmuje się raczej, że do uszkodzenia ściany jelit może dochodzić na skutek działania różnych, niezależnych bodźców, przez co przewidzenie wystąpienia NEC oraz rozpoznanie wczesnych etapów choroby jest bardzo trudne. Zatem sugerowane jest istnienie mechanizmu – mediatorów wspólnych dla wszystkich wymienionych bodźców uszkadzających, odpowiedzialnego za rozwój choroby (91).

Objawy kliniczne martwiczego zapalenia jelit są w wielu przypadkach nie do rozróżnienia od objawów posocznicy. Dla przykładu, w postaci NEC o nagłym początku dominujące są objawy ogólnoustrojowe, a objawy brzuszne mogą wystąpić dopiero po kilku godzinach. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że w patogenezie istotną rolę mogą odgrywać właśnie cytokiny. Ponadto istnieje duża koincydencja pomiędzy NEC a zakażeniem bakteryjnym. Gupta i wsp. oceniają, że bakteriemia występuje u ok. 10-50% noworodków z NEC (38). Moro i wsp. wykazali, że względne ryzyko wystąpienia posocznicy u noworodków z NEC wynosi 15,6 (95CI: 5,76-42,2) w porównaniu do dzieci bez objawów martwiczego zapalenia jelit (89). Interesujące rozważania na temat proponowanego udziału cytokin w rozwoju NEC opublikowali w 1994 roku Kaplan i wsp. (17). Według autorów, istotnymi mediatorami odpowiedzi ustroju na bodziec uszkadzający jelita są: czynnik aktywujący płytki (PAF – *Platelet activating factor*), TNFα, endotelina-1. Jurges i wsp. stwierdzili znacznie większe stężenia PAF u dzieci z martwiczym zapaleniem jelit, zwłaszcza u noworodków, u których doszło do perforacji jelit (52). McKendrick i wsp. natomiast wykazali, że w 3 i 14 dobie od rozpoczęcia karmienia dojelitowego wzrasta poziom PAF w porównaniu z okresem przed karmieniem, co może sugerować, że rozpoczęcie karmienia jest bodźcem wyzwalającym odpowiedź zapalną (77). W mleku matki natomiast znaleziono PAF-AH (acetylhydrolaza PAF) - enzym rozkładający PAF, co może współuczestniczyć w ochronnym działaniu pokarmu naturalnego. Jednakże, z klinicznego punktu widzenia

oznaczanie PAF jest bardzo trudne, dostępna metoda jest bardzo kosztowna (metoda radioimmunologiczna) i wymaga pobrania dużych objętości krwi (ok. 1-2 ml). Rola TNFα jest mniej jednoznaczna. W badaniach eksperymentalnych Tracey i wsp. (118) zaobserwowali, że podanie szczurom TNFα powoduje wystąpienie martwicy jelit. Jednakże, u badanych zwierząt wystąpiły również objawy martwicy nerek i płuc, co nie jest zjawiskiem typowym dla NEC. TNFα najprawdopodobniej działa w jelicie poprzez uwalnianie PAF, jednakże brak jest wiarygodnych wyników badań potwierdzających tę hipotezę. Jeszcze mniej jest danych na temat innych mediatorów tj. IL-6, IL-10 w patogenezie NEC.

Hipoteza o udziale mediatorów reakcji zapalnej w patogenezie NEC wiąże się, również z faktem, że przewód pokarmowy jest największym narządem limfatycznym u człowieka. Ocenia się, że 70-80% komórek zdolnych do produkcji immunoglobulin znajduje się właśnie w przewodzie pokarmowym (13). Jak wielu układów, czynność układu limfatycznego przewodu pokarmowego u noworodków z niską urodzeniową masą ciała jest niedojrzała. Między innymi stwierdzić można zwiększoną przepuszczalność nabłonka jelitowego dla różnego rodzaju makromolekuł lub antygenów, zmniejszoną produkcję sekretoryjnych immunoglobulin klasy A (sIgA), i jak wspomniano powyżej zmienioną produkcję cytokin (75).

U wcześniaków początek NEC może być zarówno skryty (niezbyt nasilone objawy nietolerancji karmienia) jak i również piorunujący (objawy wstrząsu septycznego). Do typowego obrazu skrytego początku NEC należą objawy tj. okresowe powiększenie obwodu brzuszka, zmiana częstości i charakteru oddawanych stolców, krew (utajona) w stolcu. W czasie pojawiają się nowe objawy i po 1-2 dniach dochodzi do nagłego załamania stanu dziecka – występują bezdechy, niewydolność oddechowa, zaburzenia perfuzji obwodowej, hipotensja. Taki scenariusz najczęściej dotyczy wcześniaków będących w fazie „rekonwalescencji", czyli najczęściej po ukończeniu 2-3 tygodni życia. Niezwykle istotne, zatem staje się przewidzenie, u których noworodków, u których występują tak nieswoiste wczesne objawy kliniczne, rzeczywiście dojdzie do rozwoju NEC.

Obraz kliniczny NEC znalazł odzwierciedlenie w zaproponowanych przez Bella stadiach klinicznych choroby:

Stadium I – podejrzenie NEC – objawy choroby są nieswoiste: zaburzenia termoregulacji, bezdechy, obniżona aktywność, zalegania żołądkowe, wzdęcie

brzuszka, rzadko wymioty. Wyróżnia się stadium IA (brak makroskopowych objawów krwawienia z przewodu pokarmowego i IB (obecność świeżej krwi w stolcu).

Stadium II – potwierdzone NEC – wyróżnia się również 2 postacie: łagodną (IIA) charakteryzującą się poza objawami stwierdzanymi w stadium I wystąpieniem niedrożności przewodu pokarmowego (brak perystaltyki) oraz umiarkowaną (IIB), w której dodatkowo stwierdza się zaburzenia ogólnoustrojowe tj. kwasicę metaboliczną, trombocytopenię.

Stadium III – zaawansowanej choroby z nasilonymi objawami ogólnoustrojowymi (wstrząs, wykrzepianie wewnątrznaczyniowe, posocznica). W zależności od stanu jelit również w tym stadium wyróżnia się 2 postacie: bez perforacji jelit (IIIA) oraz z perforacją jelit (IIIB).

W rozpoznawaniu NEC najistotniejsza jest obserwacja chorego. Pomocnym może być wykonanie zdjęcia radiologicznego jamy brzusznej w projekcji bocznej poziomym promieniem. Do badań rutynowo wykonywanych należą również morfologia krwi z obrazem białokrwinkowym, badanie równowagi kwasowo-zasadowej, jonogram. Badania te nie posiadają wartości ani predykcyjnej ujemnej ani dodatniej, a głównie służą do ustalenia wskazań, co do leczenia objawowego (wyrównywanie kwasicy metabolicznej, wyrównywanie niedokrwistości, leczenie zaburzeń krzepnięcia, leczenie chirurgiczne) (46).

Podsumowując, można stwierdzić, że:

1. posocznica i martwicze zapalenie jelit są niezwykle istotnymi problemami okresu noworodkowego ze względu na dużą częstość występowania oraz, mimo postępu, na nadal utrzymującą się dużą śmiertelność i ryzyko innych odległych następstw
2. początkowe objawy obu chorób mogą być dyskretne i nieswoiste, co może opóźniać postawienie właściwej diagnozy
3. obecnie istniejące metody laboratoryjne nie są wystarczająco jednoznaczne w bardzo wczesnym rozpoznawaniu posocznicy i poszukuje się bardziej wiarygodnych
4. postęp w immunologii pozwolił na lepsze zrozumienie patomechanizmów reakcji zapalnej, przebiegu posocznicy i chorób jelit, jednakże informacje są wynikiem głównie eksperymentów in vitro lub badań u pacjentów dorosłych, dzieci i noworodków donoszonych.

5. ocena udziału cytokin w reakcji zapalnej u noworodków z bardzo niską masą ciała oraz możliwości wykorzystania oznaczania stężeń tych mediatorów w diagnostyce nie są jeszcze w pełni poznane.

Badanie ma, zatem na celu ocenę uwalniania cytokin pro- i przeciwzapalnych u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała. Analizie poddana zostanie użyteczność oznaczania wybranych cytokin w rozpoznawaniu oraz prognozowaniu przebiegu posocznicy i martwiczego zaplenia jelit. Lepsze poznanie tych procesów może w przyszłości pomóc w opracowaniu skuteczniejszych metod leczenia.

2. Cel pracy

Celem pracy jest ocena uwalniania cytokin pro i przeciwzapalnych u noworodków z bardzo małą masą ciała. Zostanie przeprowadzona analiza jakości i ilości uwalnianych cytokin w zależności od wieku płodowego i urodzeniowej masy ciała oraz wieku kalendarzowego u noworodków bez objawów zakażenia. Ma to na celu ustalenie wartości referencyjnych dla tej grupy dzieci. Drugim elementem pracy jest określenie roli mediatorów zapalenia u dzieci z objawami posocznicy Gram ujemnej, Gram dodatniej i grzybiczej oraz u dzieci z objawami martwiczego zapalenia jelit. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzona zostanie ocena przydatności wybranych badań laboratoryjnych w diagnostyce klinicznej.

Poniższe hipotezy zerowe (H_0) poddane zostaną szczegółowej analizie:

1. Stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL6, IL 10, prokalcytoniny, TNFα, jak również ekspresja receptora CD14 nie zależą od wieku płodowego oraz masy ciała noworodka

2. Stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL6, IL 10, prokalcytoniny, TNFα, jak również ekspresja receptora CD14 nie zależą od wieku kalendarzowego dziecka

3. Stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL6, IL 10, prokalcytoniny, TNFα, jak również ekspresja receptora CD14 u noworodków z objawami uogólnionego zakażenia lub martwiczego zapalenia jelit nie różnią się od stężeń obserwowanych u dzieci bez objawów infekcji.

3. Materiał

Badaniem objęto 89 noworodków z bardzo małą urodzeniową masą ciała hospitalizowanych w Oddziale Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka Kliniki Chorób Dzieci Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CMUJ w Krakowie w okresie od 1.02.1998 do 31.12.2000 r.

Przyjęto następujące kryteria włączenia do badania:

- Urodzeniowa masa ciała ≤ 1500g
- Wiek przy przyjęciu do oddziału < 72 godziny życia
- Ujemny wynik posiewu z krwi pobranego przy przyjęciu

Z badania wykluczono dzieci, u których:

- Rozpoznano wadę przewodu pokarmowego
- Ocena w skali Apgar w 5 minucie życia < 3 punkty
- Przy przyjęciu stwierdzono objawy krwawienia dokomorowego IV stopnia wg Papanicolau

W badanej grupie były 43 (48,3%) dziewczynki i 46 (51,7%) chłopców. Masa urodzeniowa badanych noworodków wynosiła od 520 do 1500g (Me – 1060 g). Należy zauważyć, że urodzeniowa masa ciała 36 noworodków (40%) była niższa niż 1000g. Wiek płodowy dzieci szacowano według reguły Naegelego na podstawie daty ostatniej miesiączki u matki. Wiek płodowy mieścił się w zakresie 24-34 tyg. (Me –28 tyg.).

Wiek w chwili przyjęcia do oddziału wynosił (mediana) 10 godzin, przy czym aż 53 dzieci (59%) przyjęto przed ukończeniem 12 godziny życia.

Stan większości dzieci po przyjęciu do oddziału oceniano jako ciężki – 75 (84%) wymagało wentylacji zastępczej, a 11 (13%) tlenoterapii. W czasie pobytu u 66 (74%) noworodków wykonano zabieg kaniulacji centralnych naczyń żylnych a u 75 (84%) założono stały dostęp tętniczy (linia tętnicza).

Szczegółową charakterystykę badanej grupy przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka badanej populacji

	Me	(25-75%)	zakres
Masa ur. (g)	1060	(950-1300)	520 ÷ 1500
Wiek płodowy (tyg.)	28	(27-30)	24 ÷ 34
Wiek przy przyjęciu (godz.)	10	(5-20)	

	mediana	zakres
Skala Apgar po 1 min.	4	1 ÷ 8
Skala Apgar po 5 min.	6	3 ÷ 10

Płeć	męska: 46	żeńska:	43
Droga porodu	PSN: 54	CC:	35

Wentylacja mechaniczna przy przyjęciu	75 (84%)
Tlenoterapia przy przyjęciu	86 (97%)
Kaniulacja naczyń centralnych	66 (74%)
Linia tętnicza	75 (84%)
Krwawienie wewnątrzczaszkowe I-II^0.	27 (30%)
Krwawienie wewnątrzczaszkowe III^0	11 (13%)
Leukomalacja okołokomorowa	12 (14%)

4. Metody

4.1. Plan badania:

Przy przyjęciu na oddział u każdego noworodka wykonano następujące badania laboratoryjne (oznaczenia wartości początkowych):

- morfologia krwi z obrazem białokrwinkowym
- posiew krwi - badanie bakteriologiczne
- krew - oznaczenie LPS
- krew - oznaczenie poziomu cytokin (IL-6, IL-10, TNFα) oraz PCT
- krew - oznaczenie bezwzględnej i odsetkowej liczby komórek $CD14^+$

W chwili przyjęcia do oddziału noworodkom w zależności od stanu klinicznego zabezpieczano wspomaganie oddechu. Ponadto w sposób standardowy noworodki objęte były kompletnym monitorowaniem funkcji układu krążenia i oddechowego oraz programem całkowitego lub częściowego żywienia pozajelitowego. U noworodków, u których nie występowały żadne niepokojące objawy w trakcie pierwszego miesiąca życia rutynowo w 10., 20. i 30. dobie życia wykonywano: morfologię krwi z obrazem białokrwinkowym, posiew krwi, oznaczenia stężeń LPS, PCT, interleukin oraz TNFα. Powyższe dzieci kwalifikowano do grupy kontrolnej (**Grupa A**)

W przypadku wystąpienia: objawów nietolerancji karmienia, powtarzających się bezdechów, bradykardii lub tachykardii, powiększenia wątroby i/lub śledziony, konieczności zwiększenia ustawień respiratora, hipotensji, utrzymującej się hipoksemii, zaburzeń perfuzji obwodowej lub innych niepokojących objawów - u noworodka pobierano krew na posiew bakteriologiczny i mykologiczny. Ponadto wykonywano: morfologię krwi z obrazem białokrwinkowym oraz oznaczenia stężenia LPS, PCT, IL-6, IL-10, TNFα. W przypadku uzyskania ujemnego wyniku posiewu z krwi dzieci kwalifikowano do grupy noworodków z objawami chorobowymi, lecz bez potwierdzenia bakteriologicznego posocznicy (**grupy B**), a w przypadku uzyskania dodatniego wyniku posiewu krwi dziecko kwalifikowano do grupy noworodków z posocznicą (**Grupa C**).

Ponadto wśród noworodków grup B i C wyodrębniono podgrupę dzieci z objawami martwiczego zapalenia jelit (**Grupa D**) na podstawie występowania objawów tj.:

1. zaleganie pokarmu w żołądku w ilości powyżej 50% podanej objętości dla 3 kolejnych karmień,
2. wymioty,
3. poszerzenie obwodu brzuszka powyżej 2 cm,
4. brak perystaltyki w jamie brzusznej,
5. objawy krwawienia z przewodu pokarmowego.

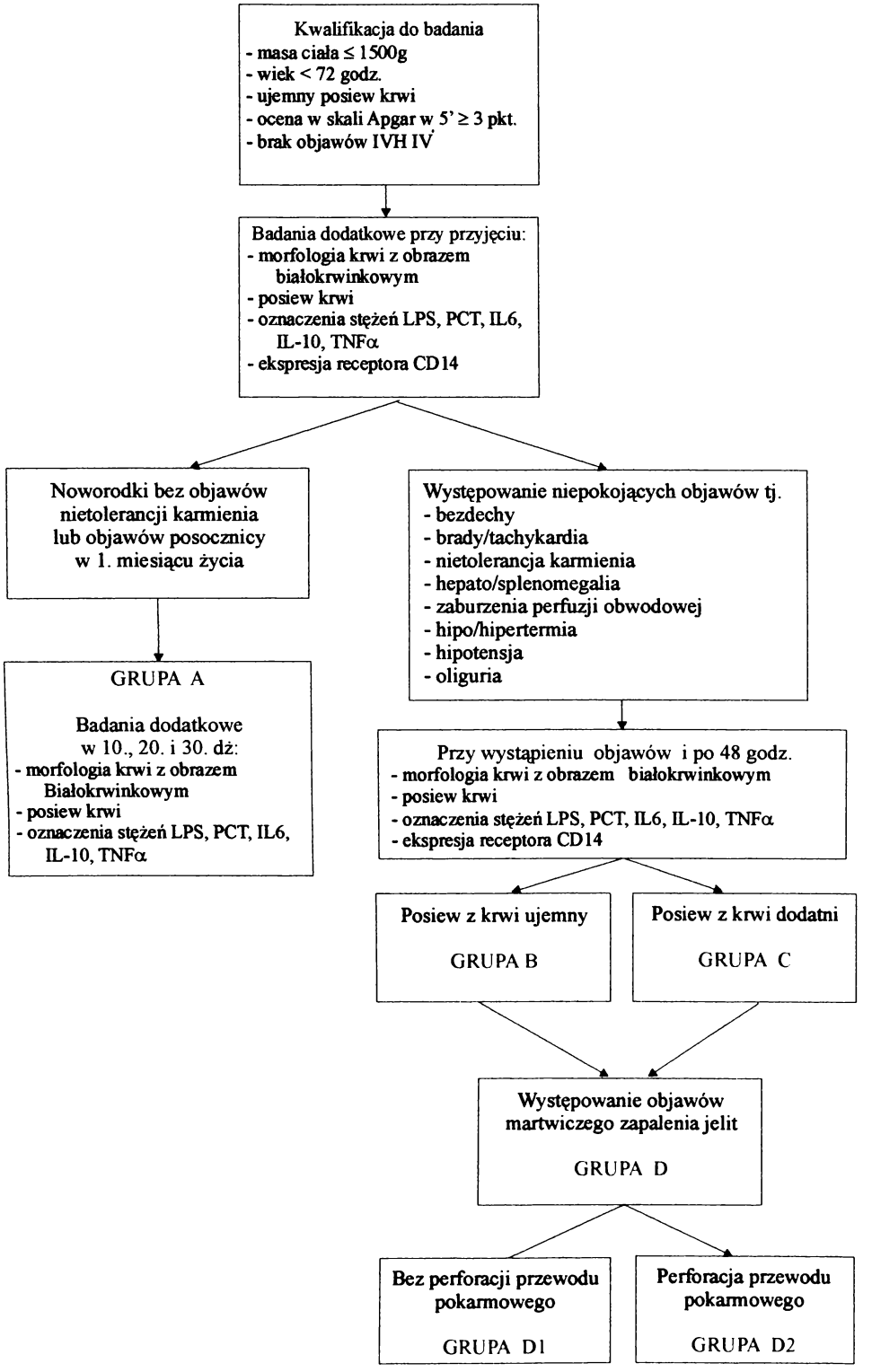
Dodatkowo poza wymienionymi powyżej badaniami stężenia cytokin, morfologii krwi z obrazem białokrwinkowym wykonywano przeglądowe badanie radiologiczne jamy brzusznej. Dzieci kwalifikowano do 2 podgrup: bez objawów perforacji przewodu pokarmowego (**grupa D1**), z objawami perforacji przewodu pokarmowego (**grupa D2**).

W grupach dzieci z posocznicą lub martwiczym zapaleniem jelit w celu oceny aktywności procesu chorobowego oraz udziału mediatorów oznaczano stężenia: LPS, PCT, CD14 oraz cytokin po 48 godzinach od postawienia rozpoznania.

Zasady kwalifikacji oraz zakres badań przedstawiono na rycinie 1.

U wszystkich dzieci włączonych do badania uzyskano pisemną, świadomą zgodę Rodziców lub Opiekunów na udział noworodka w badaniu. Ponadto projekt badawczy uzyskał akceptację Stałej Rektorskiej Komisji Etycznej ds. Badań Klinicznych przy Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (nr KE/8/5/KI/97 oraz nr KE/II/78/KI/97).

Rycina 1. Schemat badania



4.2. Metody laboratoryjne:

Krew do badań pobierano 2 metodami:

- u dzieci, u których założono dostęp tętniczy pobierano krew tętniczą,
- u pozostałych noworodków pobierano krew żylną poprzez nakłucie żył obwodowych

Przed pobraniem krwi miejsce nakłucia dokładnie oczyszczano i dezynfekowano roztworem alkoholu etylowego i następnie roztworem betadyny. Krew do wszystkich badań pobierano w sposób jałowy.

Do oznaczenia stężenia cytokin i LPS - krew (ok. 500 µl) pobierano do jałowych, nie zawierających endotoksyn próbówek (LPS-free test tubes dostarczonych przez firmę Chromogenix). Po pobraniu krew przekazywano natychmiast do Laboratorium Katedry Immunologii Klinicznej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii. Po około 30 minutach od pobrania po wykrzepieniu próbkę odwirowywano przez 10 minut w wirówce automatycznej (1000xg). Uzyskaną surowicę dzielono na 3 porcje (po około 100 µl) i zamrażano do czasu wykonania oznaczenia w temperaturze -70^0C. Okres przechowywania krwi nie przekraczał 6 miesięcy. Surowicę rozmrażano bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

Do oznaczenia ekspresji receptora CD14 na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pobierano 300 µl krwi pełnej do próbówki zawierającej 100 µl EDTA. Próbkę natychmiast przekazywano do laboratorium.

Morfologia krwi: liczbę leukocytów i płytek krwi oznaczano według zasady Cultera na aparacie Coulter Maxim. Obraz odsetkowy krwinek białych oceniano pod mikroskopem w preparacie barwionym metodą Papenhaima oceniając 100 kolejnych leukocytów w polu widzenia. Z otrzymanych wyników wyliczano bezwzględną liczbę granulocytów obojętnochłonnych oraz stosunek form niedojrzałych granulocytów obojętnochłonnych do całkowitej liczby granulocytów obojętnochłonnych (I/T).

Posiew krwi: krew na posiew w ilości 0,5 ml pobierano na specjalnie przygotowane podłoża firmy Bactec. Rutynowo krew pobierano jedynie na podłoże przeznaczone do hodowli bakterii tlenowych, a w uzasadnionych przypadkach dodatkowo pobierano krew na podłoże przeznaczone do izolacji grzybów lub bakterii beztlenowych. Prowadzono hodowle na podłożach namnażających w inkubatorze BACTEC 9240 firmy Becton-Dickinson umożliwiającym automatyczną detekcję wzrostu bakterii w

oparciu o ocenę spadku fluorescencji w zakażonym materiale. Po stwierdzeniu dodatniego wyniku wykonywano badanie mikroskopowe po wcześniejszym wybarwieniu preparatu metodą Grama i hodowle przesiewano na podłoża stałe (o składzie dobranym do potrzeb danego rodzaju bakterii). Hodowle kontynuowano i w przypadku wzrostu jednego gatunku wykonywano identyfikację bakterii i oznaczano lekowrażliwość.

Oznaczenie stężenia lipopolysacharydu (LPS): LPS oznaczano przy użyciu testu Coatest Plasma Endotoxin (firmy Chromogenix) zgodnie z instrukcją producenta. Zasada oznaczenia oparta jest na aktywacji przez endotoksynę kaskady enzymów z grupy proteaz serynowych. Proenzymy dla tej reakcji znajdują się w lizacie amebocytów (LAL – limulus amebocyte lysate). Zmieszanie endotoksyny z LAL aktywuje proteazę serynową, która powoduje odłączenie od bezbarwnej substancji wskaźnikowej (S-2423) chromoforu (p-nitroaniliny) zmieniającej zabarwienie próbki. Natężenie zabarwienia mierzone jest fotometrycznie przy długości fali 405-410 nm. Stężenie endotoksyny w próbce jest proporcjonalne do intensywności zabarwienia próbki po zakończeniu reakcji. Wynik oznaczenia wyrażano w pg/ml.

Oznaczenia stężenia IL-6, IL-10 i TNFα: Ocena stężenia interleukiny-6 i interleukiny-10 oraz TNFα wykonywana była metodą ELISA przy użyciu zestawów firmy Endogen (Human ELISA IL-6 oraz Human ELISA IL-10) oraz R&D (Quantikine High Sensitivity human TNFα) zgodnie z instrukcją producenta zestawów. Wyniki przeliczane były przez system komputerowy w oparciu o krzywą standardową.

Oznaczenia stężenia prokalcytoniny: Oznaczenia stężenia PCT dokonano metodą immunoluminometryczną przy użyciu zestawów LUMItest PCT firmy Brahms zgodnie z instrukcją producenta. Wyniki przeliczone były przez system komputerowy w oparciu o krzywą standardową i wyrażane w ng/ml.

Określenie liczby komórek CD14: wykonywane było metodą fluorescencji bezpośredniej. Barwienia komórek dokonano w krwi lizowanej. Tak przygotowane komórki poddano ocenie w cytofluorometrze przepływowym w oparciu o elektroniczną selekcję populacji komórek jednojądrzastych. Wynik przedstawiono w formie odsetka komórek $CD14^+$ w populacji komórek jednojądrzastych.

Wszystkie badania laboratoryjne wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Zakładzie Mikrobiologii Katedry Immunologii Klinicznej i Patologii oraz Pracowni Hematologicznej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CM UJ w Krakowie.

4.3. Metody statystyczne

Porównania zmiennych jakościowych (płeć, rodzaj porodu itp.) dokonano przy użyciu testu chi kwadrat w razie konieczności z poprawką Yatesa.

W przypadku zmiennych ilościowych w pierwszym etapie oceny dokonano sprawdzenia charakteru rozkładu. Normalność rozkładu testowano testem Lillieforsa, przyjmując założenie, że średnia i odchylenie standardowe zmiennych nie są znane i są dopiero obliczane z danych. Hipotezę o normalności rozkładu odrzucano, gdy wartość statystyki D była istotna statystycznie ($p<0,05$). Zmienne tj. stężenia cytokin, prokalcytoniny, LPS analizowano zarówno jako dane surowe jak i po przygotowaniu, tj. przekształceniu logarytmicznym (3;115).

Wartości statystyki D dla testu Lillieforsa dla wybranych zmiennych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wartości statystyki D dla testu Lillieforsa

(zmienne o rozkładzie normalnym pogrubiono)

Zmienna	Statystyka D	p
Masa urodzeniowa	0,15	<0,01
Wiek płodowy	0,12	<0,01
Wiek przy przyjęciu	0,27	<0,01
Długość respiratoroterapii	0,18	<0,01
Długość tlenoterapii	0,2	<0,01
Długość hospitalizacji	0,15	<0,01
Utrzymywanie centralnego dostępu dożylnego	0,2	<0,01
Utrzymywanie dostępu tętniczego	**0,14**	**>0,05**
Długość odżywiania pozajelitowego	0,21	<0,01
Leukocytoza	0,16	< 0,01
Płytki krwi	0,05	< 0,05
Indeks I/T	0,14	< 0,01
Log(Prokalcytonina)	0,19	< 0,01
Log(LPS)	0,38	< 0,01
Log(IL-6)	0,11	< 0,01
Log(IL-10)	0,25	< 0,01
Log(TNFα)	0,08	< 0,01
Ekspresja receptora CD14	0,14	< 0,01

Ze względu na fakt, że rozkład większości zmiennych był różny od rozkładu normalnego do porównania badanych grup stosowano analizę wariancji Kruskalla-Wallisa (Kruskall-Wallis ANOVA), a analizę korelacji przeprowadzono stosując test Spearmana.

Dodatkowo dokonano oceny czułości i swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej i ujemnej wybranych testów laboratoryjnych. Przyjęto następujące definicje (47):

czułość: odsetek noworodków z daną chorobą, u których wynik testu jest dodatni

swoistość: odsetek noworodków zdrowych, u których wynik testu jest ujemny

wartość predykcyjna wyniku dodatniego (PPV – positive predictive value): odsetek noworodków z dodatnim wynikiem testu, u których dana choroba jest obecna.

wartość predykcyjna wyniku ujemnego (NPV – negative predictive value): odsetek noworodków z ujemnym wynikiem testu, u których dana choroba jest nieobecna.

Dla każdego testu wyznaczono krzywą wiarygodności testu (krzywą ROC) oraz wyliczono wartości progowe dyskryminujące grupy. Ponadto przydatność testów porównano na podstawie obliczonych z wykresów pól powierzchni pod krzywą ROC.

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu komputerowych programów statystycznych: Statistica 5.5 PL (StatSoft, Inc. (1997). STATISTICA for Windows) oraz StatsDirect for Windows (2001).

Różnice i zależności uznano za istotne statystycznie, jeżeli prawdopodobieństwo odrzucenia prawdziwej hipotezy zerowej wynosiło mniej niż 5% ($p<0,05$).

5.1. Porównanie badanych grup

Ostateczną analizą objęto 87/89 (98%) noworodków. Powodem wykluczenia z badania było: wada przewodu pokarmowego (przegroda błoniasta odźwiernika) (n=1) i krwawienie śródczaszkowe IV stopnia (n=1), które wystąpiło w 2 dobie życia i było powodem zgonu dziecka.

Dziewięcioro spośród biorących udział w badaniu dzieci zmarło przed wypisem z oddziału noworodkowego, w tym 7 dzieci w trakcie badania. Przyczyną zgonu u 4 dzieci była posocznica Gram ujemna, a u 3 dzieci martwicze zapalenie jelit. Warto zwrócić uwagę, że u 2 spośród 3 zmarłych z powodu NEC noworodków, objawy choroby (perforacja jelit) wystąpiły przed rozpoczęciem karmienia.

W trakcie realizacji badania 28 noworodków zakwalifikowano do grupy kontrolnej (Grupa A), 13 dzieci do grupy z objawami choroby, ale z ujemnym wynikiem posiewu z krwi (Grupa B) i 46 noworodków do grupy dzieci z objawami posocznicy (Grupa C).

Wśród dzieci włączonych do grupy C odnotowano 36 epizodów posocznicy Gram dodatniej, 7 epizodów posocznicy Gram ujemnej i 5 epizodów posocznicy grzybiczej. Szczegółową etiologię posocznicy przedstawia tabela 3.

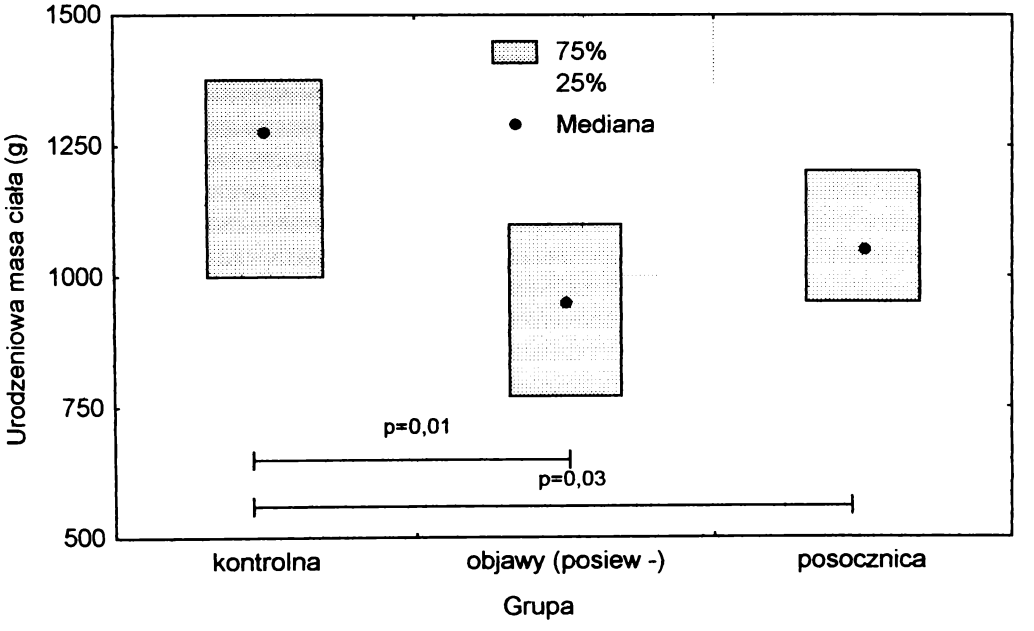
Tabela 3. Etiologia posocznicy

Drobnoustrój	**Liczba przypadków**
Bakterie Gram dodatnie	
Staphylococcus epidermidis	26
Staphylococcus aureus	3
Enteroccocus	4
Propionibacterium	1
Leuconostoc	1
Streptococcus B	1

Bakterie Gram ujemne	
Klebsiella pneumoniae	4
Enterobacter sp.	1
Escherichia coli	1
Pseudomonas aeruginosa	1
Grzyby chorobotwórcze	
Candida albicans	3
Candida parapsylosis	2

Badane grupy różniły się istotnie pod względem urodzeniowej masy ciała (Me: 1275g vs 950g vs 1050g, Kruskall-Wallis ANOVA, p=0,01). Porównanie masy ciała w badanych grupach przedstawia rycina 2.

Rycina 2. Porównanie masy ciała w badanych grupach



Wiek płodowy, wiek przy przyjęciu, stosunek dziewcząt i chłopców, liczba dzieci urodzonych drogami natury były podobne w badanych grupach.

Porównanie wybranych parametrów w ocenianych grupach przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Porównanie wybranych parametrów w badanych grupach

	Grupa kontrolna (n=28)	Dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi (n=13)	Dzieci z posocznicą (n=46)	P.
Masa ciała (g) Me	1275	950	1050	**0,01***
Wiek płodowy (tyg.) Me	29	28	28	0,14*
Wiek przy przyjęciu (godz.) Me	6	10	10	0,6*
Skala Apgar po 1 min. (Me)	5	2	4	0,07*
Skala Apgar po 5 min. (Me)	6	5	6	0,27*
Płeć (męska/żeńska)	16/12	5/8	23/23	0,5**
Droga porodu (PSN/CC)	19/9	10/3	23/23	0,12**

*p dla analizy wariancji Kruskalla-Wallisa (Kruskall-Wallis ANOVA)

** p dla testu chi kwadrat

Podobna liczba dzieci w ocenianych grupach wymagała oddechu zastępczego przy przyjęciu do oddziału (odpowiednio: 20/28; 11/13; 42/46; χ^2=5,1; p=0,1). Kaniulacji centralnych naczyń żylnych dokonano u 72% dzieci z grupy kontrolnej, 92% noworodków, u których występowały niepokojące objawy bez potwierdzenia bakteriologicznego posocznicy oraz 72% dzieci z posocznicą (χ^2=2,5; p=0,3). Wewnątrznaczyniowe monitorowanie ciśnienia tętniczego stosowano we wszystkich grupach u podobnej liczby dzieci (86% vs 77% vs 85%; χ^2=0,5; p=0,8). Odżywianie pozajelitowe prowadzono u wszystkich włączonych do badania dzieci, w tym u 88/89 dzieci stosowano całkowite odżywianie pozajelitowe.

Zaobserwowano różnice, co do częstości występowania krwawienia dokomorowego III stopnia w badanych grupach. Wystąpiło ono u 5/13 (38%) dzieci z grupy B a tylko u 2/28 (7,2%) noworodków z grupy kontrolnej i u 4/46 (8,7%) chorych z posocznicą (χ^2=9,2; p=0,01). Porównanie wybranych parametrów klinicznych w ocenianych grupach przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Porównanie wybranych parametrów klinicznych w badanych grupach

	Grupa kontrolna (n=28)	Dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi (n=13)	Dzieci z posocznicą (n=46)	p*
Respiratoroterapia przy przyjęciu	72%	92%	85%	0,1
Kaniulacja żylnych naczyń centralnych	72%	92%	72%	0,3
Krwawe monitorowanie ciśnienia tętniczego	86%	77%	85%	0,8
Odżywianie pozajelitowe	98%	100%	100%	0,9
Krwawienie dokomorowe III^0	7,1%	38,5%	8,7%	**0,01**

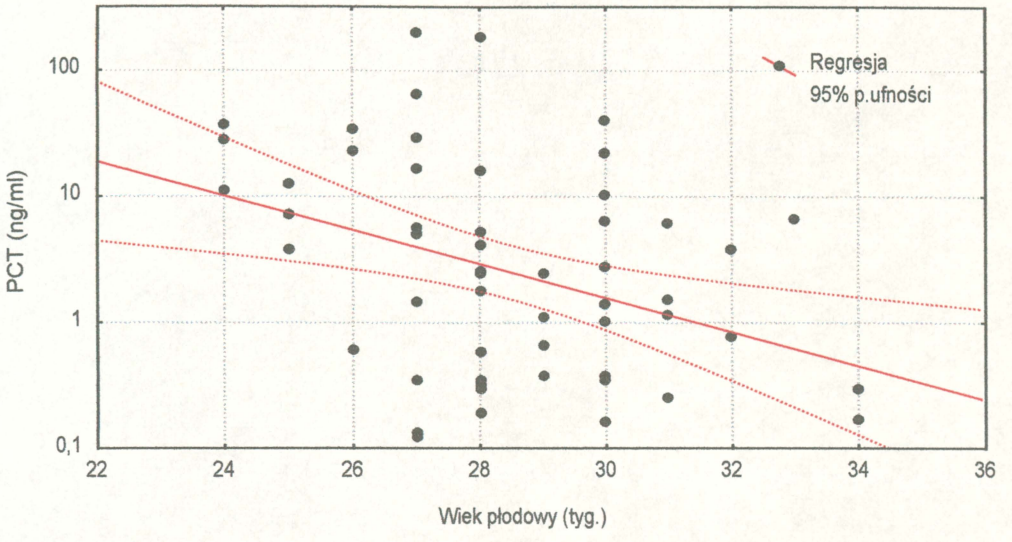
* p dla testu chi kwadrat

5.2. Ocena stężeń cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w zależności od wieku płodowego i urodzeniowej masy ciała

Przy przyjęciu do oddziału pobrano krew u 86 dzieci. U 3 dzieci pobranie krwi do badań wstępnych ze względów technicznych nie było możliwe. U wszystkich dzieci wykonano morfologię krwi z obrazem białokrwinkowym, natomiast ekspresję receptora CD14 oceniono u 74 dzieci. Stężenie IL-6 i IL-10 oznaczono u 80 dzieci, natomiast TNFα u 76 noworodków, LPS – 77 noworodków a PCT u 55 dzieci.

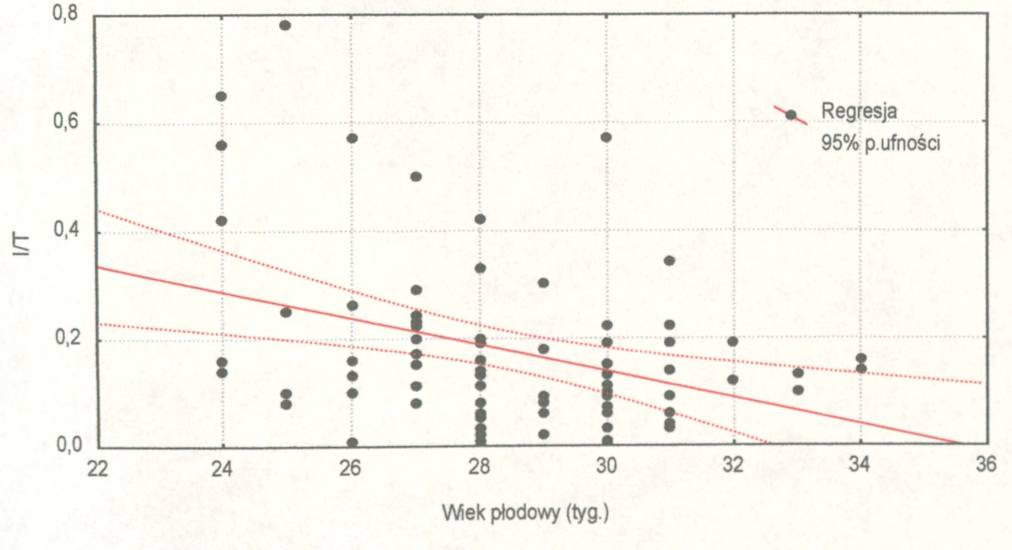
Stężenia cytokin, LPS, ekspresja receptora CD14 nie wykazywała korelacji ani z wiekiem płodowym ani z urodzeniową masą ciała badanych noworodków. Stężenie PCT było odwrotnie proporcjonalne do wieku płodowego badanych dzieci (współczynnik korelacji Spearmana R=-0,36, p=0,006; rycina 3). Natomiast korelacja pomiędzy masą ciała a stężeniem PCT nie osiągnęła znamienności statystycznej (współczynnik korelacji Spearmana R=-0,22, p=0,1).

Rycina 3. Zależność pomiędzy wiekiem płodowym a stężeniem prokalcytoniny oznaczonym przy przyjęciu do oddziału (R= -0,36)

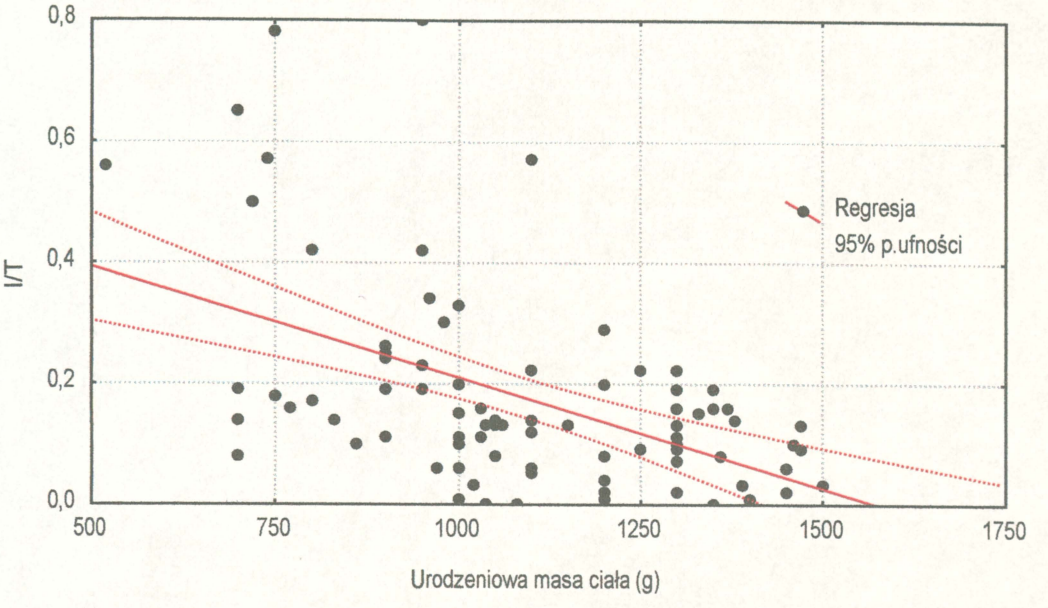


Spośród parametrów hematologicznych zaobserwowano odwrotną zależność między zarówno urodzeniową masą ciała jak i wiekiem płodowym a wskaźnikiem form niedojrzałych do dojrzałych granulocytów (odpowiednio współczynnik korelacji Spearmana R: -0,49 oraz -0,30: ryciny 4. i 5.).

Rycina 4. Zależność pomiędzy wiekiem płodowym a wskaźnikiem stosunku form niedojrzałych do dojrzałych granulocytów (R=-0,49)



Rycina 5. Zależność pomiędzy urodzeniową masą ciała a wskaźnikiem stosunku form niedojrzałych do dojrzałych granulocytów (R= -0,49)



Szczegóły analizy korelacji pomiędzy wybranymi wynikami badań laboratoryjnych a wiekiem płodowym i urodzeniową masą ciała przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Ocena korelacji pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi a urodzeniową masą ciała i wiekiem płodowym

	Masa urodzeniowa		Wiek płodowy	
	R*	p**	R*	p**
Leukocytoza	-0,09	0,38	-0,18	0,09
Płytki krwi	-0,07	0,48	-0,12	0,24
I/T	**-0,49**	**<0,001**	**-0,30**	**0,005**
$CD14^+$	-0,03	0,79	-0,15	0,20
IL-6	-0,03	0,75	0,01	0,92
IL-10	-0,04	0,66	-0,01	0,94
TNFα	-0,09	0,43	-0,09	0,41
PCT	-0,22	0,10	**-0,36**	**0,006**
LPS	0,12	0,28	0,14	0,24

* współczynnik korelacji R Spearmana

** p dla testu Spearmana

Przy przyjęciu do oddziału stężenia ocenianych cytokin, PCT, LPS i ekspresja CD14 była podobna we wszystkich badanych grupach (tabela 6).

Tabela 6. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 oznaczonych przy przyjęciu do OITN w badanych grupach

	Grupa kontrolna (n=28)	Dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi (n=13)	Dzieci z posocznicą (n=46)	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	5,06 (2,27-7,64)	9,87 (0-18,6)	4,7 (0-11,98)	0,49
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0,67 (0-11,75)	5,24 (0-11,5)	0 (0-5,54)	0,17
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	5,99 (2,09-9,66)	5,6 (1,23-12,06)	5,4 (3,5-9,2)	0,76
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	1,75 (0,35-6,62)	12,31 (2,42-36,9)	1,51 (0,37-6,34)	0,12
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	1,25 (0-42)	0 (0-16)	0 (0-35)	0,52
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	9,55 (3,8-18)	12 (4,5-16,6)	18 (7,4-36)	0,07

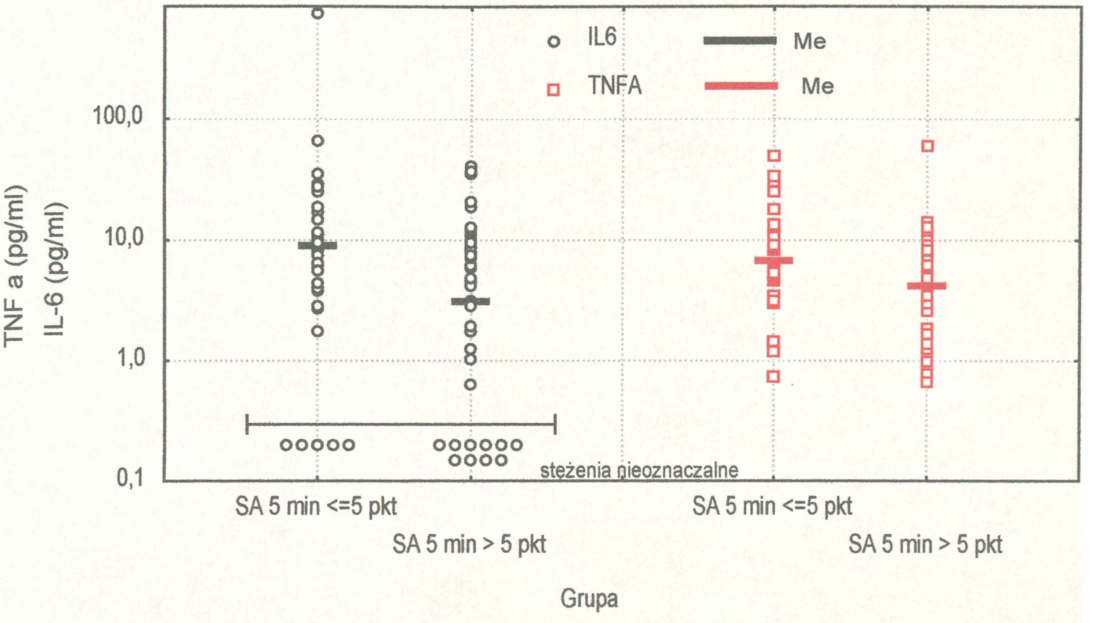
*p dla analizy wariancji Kruskalla-Wallisa

Dodatkowo porównano stężenia cytokin, LPS, PCT oraz ekspresję receptora CD14 w następujących podgrupach dzieci:

a. wentylowanych mechanicznie vs pozostających na oddechu własnym
b. urodzonych w ciężkiej zamartwicy (skala Apgar w 5 min. ≤ 5pkt.) vs noworodki ocenione w skali Apgar w 5 min. > 5 pkt.
c. z objawami IVH III-IV^0 vs bez objawów IVH III-IV^0

Stężenia LPS i PCT oraz ekspresja receptora CD14 była porównywalna we wszystkich wyróżnionych podgrupach. W przypadku dzieci urodzonych w ciężkiej zamartwicy zaobserwowano znamiennie wyższe stężenie IL-6 (Me: 9,15 pg/ml vs 3,15 pg/ml, p=0,02) oraz TNFα (Me: 6,2 pg/ml vs 4,2 pg/ml, p=0,01) w porównaniu do noworodków ocenionych w skali Apgar po 5 min. na więcej niż 5 pkt. (rycina 6.).

Rycina 6. Porównanie stężenia TNFα oraz IL-6 w grupach dzieci: urodzonych w ciężkiej zamartwicy i ocenionych w skali w 5 min. na co najmniej 6 pkt.



Wśród dzieci wentylowanych mechanicznie stwierdzono wyższe stężenia IL-6 (Me: 6,39 pg/ml vs 1,9 pg/ml; p=0,06) oraz PCT (Me: 3,73 ng/ml vs 0,62 ng/ml, p=0,08) ale różnice nie były znamienne statystycznie. Stężenie IL-10 było większe wśród dzieci z objawami IVH III-IV stopnia (Me: 5,64 pg/ml vs 0 pg/ml, p=0,07).

Zestawienie wyników przedstawiają tabele 7., 8. i 9.

Tabela 7. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 oznaczonych przy przyjęciu do OITN w podgrupach dzieci wentylowanych mechanicznie i pozostających na oddechu własnym

	Dzieci wentylowane mechanicznie (n=67)	Dzieci pozostające na oddechu własnym (n=13)	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	6,39 (2,63-11,54)	1,9 (0-3,17)	0,06
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-11,5)	0 (0-3,43,5)	0,52
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	5,6 (3,5-8,8)	4,32 (1,23-9,4)	0,30
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	3,73 (0,57-16)	0,62 (0,35-1,75)	0,08
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-32)	0 (0-43)	1,00
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	13 (5,2-29)	13,22 (7,9-18)	0,77

*p dla testu U Manna-Whitneya

Tabela 8. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 oznaczonych przy przyjęciu do OITN w podgrupach dzieci urodzonych w ciężkiej zamartwicy (skala Apgar w 5 min. ≤ 5pkt.) i ocenionych w skali Apgar w 5 min. > 5 pkt.

	Noworodki ocenione w SA w 5min. ≤ 5pkt. (n=34)	Noworodki ocenione w SA w 5min. > 5pkt. (n=39)	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	9,15 (3,8-14,4)	3,17 (0,6-8,6)	**0,02**
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-11,8)	0 (0-5,7)	0,5
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	6,2 (4,9-11,27)	4,2 (1,6-7,6)	**0,01**
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	5,47 (0,61-21,7)	1,5 (0,35-4,95)	0,12
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-16,3)	6 (0-49)	0,08
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	13,25 (5-36)	12 (5,9-26)	0,7

*p dla testu U Manna-Whitneya

Tabela 9. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 oznaczonych przy przyjęciu do OITN w podgrupie dzieci z ciężkim krwawieniem śródczaszkowym oraz w podgrupie noworodków bez objawów ciężkiego krwawienia śródczaszkowego

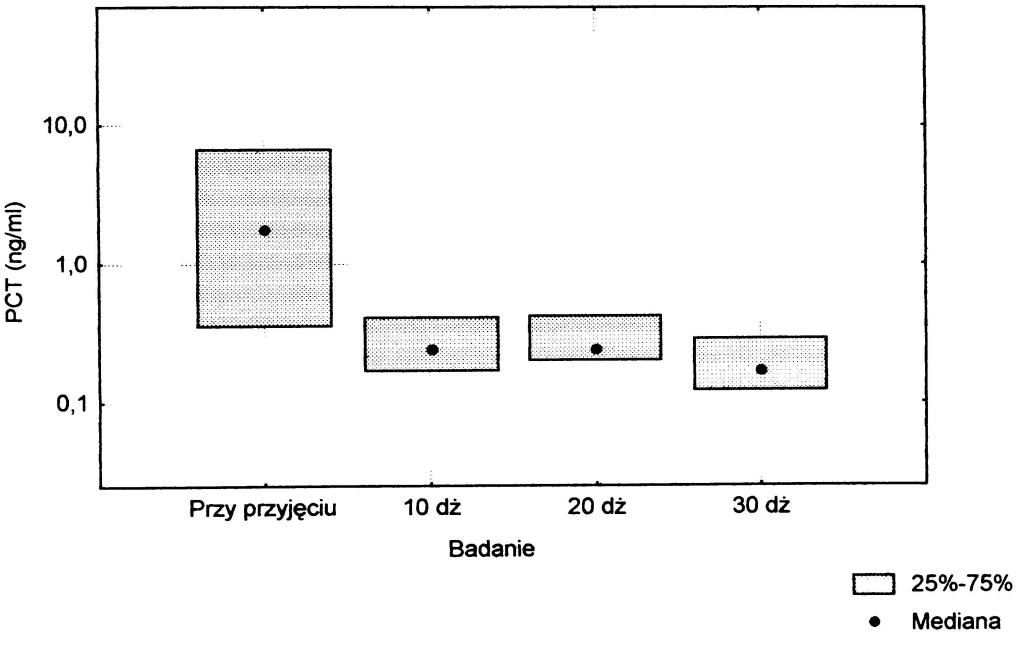
	Noworodki z IVH III-IV^0 (n=11)	Noworodki bez IVH III-IV^0 (n=54)	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	7,77 (1,58-21)	6,03 (1,9-10,69)	0,56
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	5,64 (0,17-21,8)	0 (0-11,5)	0,07
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	6,8 (1,4-10,16)	5,6 (3,49-9,4)	0,82
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	3,39 (0,47-24,6)	2,77 (0,77-11,15)	0,95
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-17,5)	0 (0-36)	0,66
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	13 (2-26)	13,8 (7,3-32)	0,24

*p dla testu U Manna-Whitneya

5.3. Ocena stężeń cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w zależności od wieku kalendarzowego

Oceny stężeń cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w zależności od wieku kalendarzowego dokonano opierając się na wynikach badań uzyskanych u dzieci zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (n=28). Zaobserwowano, że stężenie PCT było znacząco wyższe przy przyjęciu niż w kolejnych badaniach (odpowiednio Me: 1-3 dż – 1,75 ng/ml, 10dż –0,24 ng/ml; 20 dż. –0,24 ng/ml, 30 dż- 0,17 ng/ml; Kruskall-Wallis ANOVA, p=0,001 - rycina 7).

Rycina 7. Porównanie stężenia PCT w grupie kontrolnej: przy przyjęciu do OITN, w 10 dż, 20 dż i 30 dż



Stężenia IL-6, IL-10, TNFα, LPS i ekspresja receptora CD14 nie zależała od wieku kalendarzowego noworodków z małą urodzeniową masą ciała. Zestawienie wyników przedstawia tabela 10.

Tabela 10. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 oznaczonych u dzieci z grupy kontrolnej przy przyjęciu do OITN, w 10 dż, 20 dż i 30 dż

	Przy przyjęciu	10dż	20dż	30dż	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	5,06 (2,27-7,64)	3,07 (0,62-9,63)	4,6 (0,98-8,33)	3,18 (0-5,68)	0,25
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0,67 (0-11,75)	0 (0-3,13)	2,41 (0-10,08)	0 (0-5,41)	0,32
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	6 (2,09-9,66)	8,81 (5,84-11,64)	8,15 (4,74-14,12)	8,62 (5,94-12,1)	0,31
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	1,75 (0,35-6,62)	0,24 (0,17-0,41)	0,24 (0,2-0,42)	0,17 (0,12-0,29)	**0,0001**
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	1,25 (0-42)	0 (0-23)	0 (0-22)	0 (0-26)	0,67
$CD14^+$ (%) (Me)	9,55	21	21	15,34	0,06

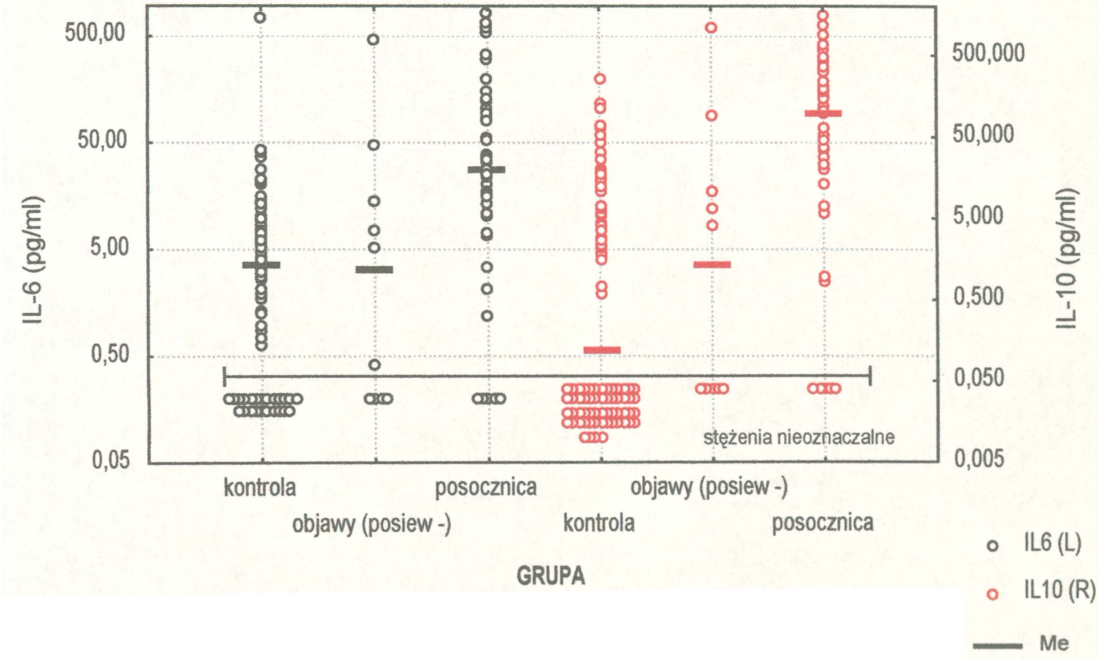
*p dla analizy wariancji Kruskalla-Wallisa

5.4. Ocena uwalniania cytokin, prokalcytoniny, LPS i ekspresji receptora CD14 w czasie posocznicy

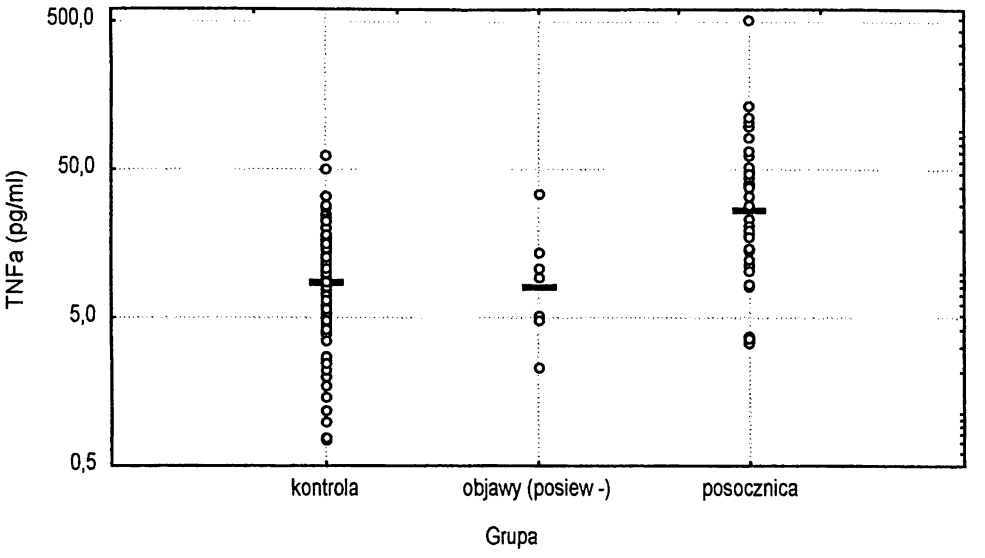
W pierwszym etapie dokonano porównania wyników badań w 3 badanych grupach: grupie A - kontrolnej, grupie B - dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi i grupie C – posocznicy. Przyjęto jako wyniki kontrolne wszystkie oznaczenia wykonane u dzieci z grupy kontrolnej w pierwszym miesiącu życia (n=112) za wyjątkiem wyników oznaczenia PCT. Ze względu na zmianę stężeń PCT w zależności od wieku kalendarzowego wyróżniono 2 podgrupy kontrolne: a) wyniki badań PCT wykonanych w 1-3 dż. i b) wyniki badań PCT wykonanych w 10-30 dż.

U dzieci z posocznicą stwierdzono znamiennie wyższe stężenia IL-6 (odpowiednio {Me} grupa A: 3,79 pg/ml vs grupa B: 3,18 pg/ml vs grupa C: 29,75 pg/ml; Kruskall-Wallis ANOVA, p.<0,0001), IL-10 (odpowiednio {Me} grupa A: 0 pg/ml vs grupa B: 1,32 pg/ml vs grupa C: 99,48 pg/ml; Kruskall-Wallis ANOVA, p.<0,0001; rycina 8.) i TNFα (odpowiednio {Me} grupa A: 8,4 pg/ml vs grupa B: 8,0 pg/ml vs grupa C: 26,6 pg/ml; Kruskall-Wallis ANOVA, p.<0,0001; rycina 9.).

Rycina 8. Porównanie stężenia IL-6 i IL-10 w badanych grupach

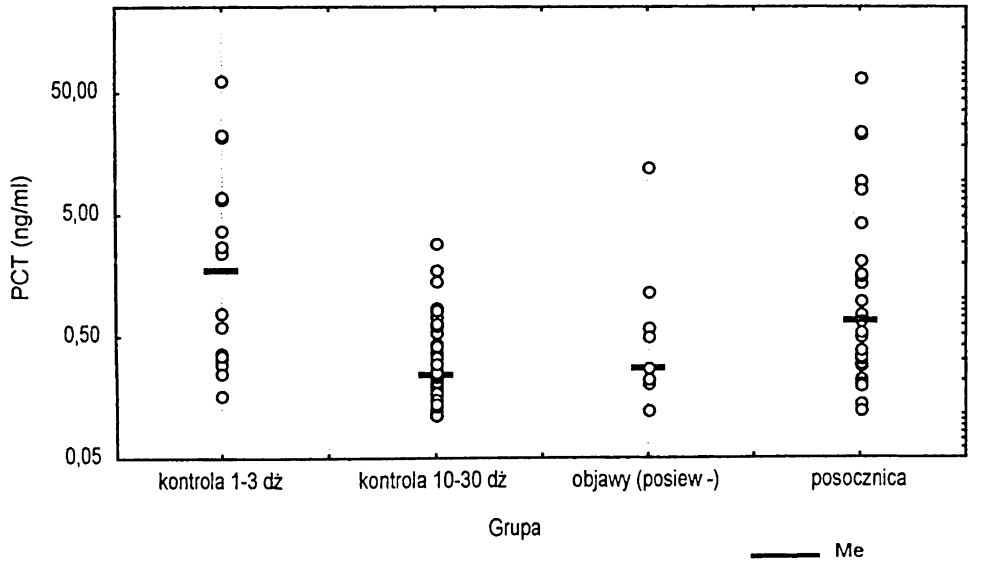


Rycina 9. Porównanie stężenia TNFα w badanych grupach



Stężenie PCT u noworodków z posocznicą w porównaniu do stężeń PCT uzyskanych u dzieci z grupy kontrolnej w wieku 10-30 dni było znacząco większe (odpowiednio {Me} grupa A w 10-30 dż: 0,23 ng/ml vs grupa B: 0,27 ng/ml vs grupa C: 0,65 ng/ml; Kruskall-Wallis ANOVA, p.<0,0001; rycina 10.).

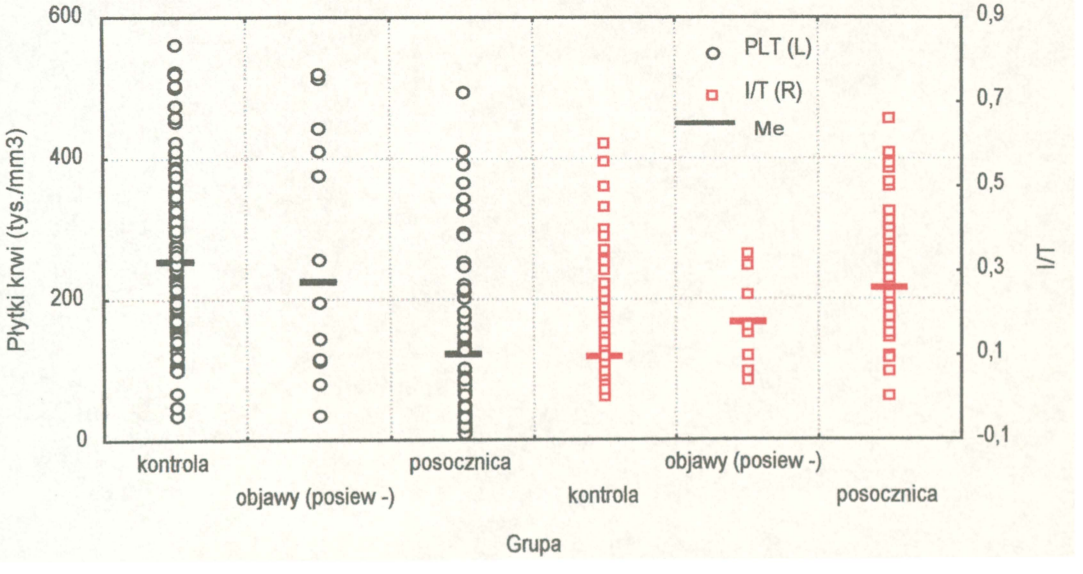
Rycina 10. Porównanie stężenia PCT w badanych grupach.



Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w stężeniach IL-6, IL-10, TNFα, PCT i ekspresji $CD14^+$ pomiędzy grupą kontrolną a grupą dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi. Jedynie stężenie LPS było większe wśród dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi w porównaniu do grupy kontrolnej jak również w porównaniu do grupy dzieci z posocznicą (odpowiednio {Me} grupa A: 0 pg/ml vs grupa B: 45,6 ng/ml vs grupa C: 0 ng/ml; Kruskall-Wallis ANOVA; p=0,08).

Dodatkowo oceniono zmiany wartości leukocytozy, płytek krwi i wskaźnika stosunku form niedojrzałych do dojrzałych granulocytów w badanych grupach. Stwierdzono, że dzieci z rozpoznaną posocznicą charakteryzowały się mniejszą liczbą płytek krwi (Me: 121.000/mm^3 vs 261.000/mm^3 vs 225.000/mm^3; Kruskall-Wallis ANOVA; p=0,001) oraz większym wskaźnikiem I/T granulocytów (Me: 0,27 vs 0,11 vs 0,15; Kruskall-Wallis ANOVA; p=0,001; rycina 11.)

Rycina 11. Porównanie wartości płytek krwi i indeksu I/T granulocytów w badanych grupach



Porównanie wyników badań laboratoryjnych w ocenianych grupach zawiera tabela 11.

Tabela 11. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 w badanych grupach.

	Grupa kontrolna	Dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi	Dzieci z posocznicą	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	3,79 (0,75-7,6)	3,18 (0-14,15)	29,75 (10,39-141)	**0,001**
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-6,4)	1,32 (0-10,5)	99,48 (27,2-236)	**0,001**
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	8,4 (5,19-12,1)	8,0 (5-10,7)	26,6 (11-47,2)	**0,001**
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	1,75¤ / 0,23 (0,15-0,37)	0,27 (0,22-0,57)	0,65 (0,31-1,81)	0,25¤/ 0,001
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-27)	45,6 (0-130)	0 (0-69)	0,08
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	15,59 (8,35-26,6)	15,5 (10-20)	23 (10-44,3)	0,26
Leukocytoza (tys./mm^3) (Me; 25%-75%)	12 (9,4-17)	14,15 (8,55-18,1)	11,4 (8,5-17,6)	0,54
Płytki krwi (tys./mm^3) (Me; 25%-75%)	261 (168-337)	225 (113-426)	121 (47-214)	**0,001**
I/T (Me; 25%-75%)	0,11 (0,05-0,19)	0,15 (0,06-0,24)	0,27 (0,18-0,37)	**0,001**

*p dla analizy wariancji Kruskalla-Wallisa ¤ - wyniki PCT oznaczone w 1-3 dż.

Kolejnym etapem analizy było porównanie stężeń cytokin, LPS, PCT, ekspresji CD14 w podgrupach dzieci wyróżnionych ze względu na etiologię posocznicy. Badane podgrupy różniły się istotnie pod względem obserwowanych stężeń IL-6 i IL-10. Stężenie IL-6 było znamiennie większe wśród noworodków z posocznicą Gram ujemną (Me=434 ng/ml) w porównaniu do dzieci z posocznicą Gram dodatnią (Me=26 ng/ml) lub posocznicą grzybiczą. (Me=20 ng/ml) (Kruskall-Wallis ANOVA, p=0,02). Stężenie IL-10 było wyższe wśród dzieci z posocznicą Gram ujemną (Me=397 ng/ml) niż wśród dzieci z posocznicą grzybiczą (Me-90,8 ng/ml) lub posocznicą Gram dodatnią (Me=58,18 ng/ml) (Kruskall-Wallis ANOVA p=0,04). Stężenia PCT, LPS oraz ekspresja receptora CD14 były podobne w badanych podgrupach. Wartości leukocytozy i płytek krwi obwodowej, także nie różniły się znamiennie pomiędzy ocenianymi podgrupami. Wskaźnik I/T granulocytów natomiast był znamiennie większy wśród

dzieci z posocznicą Gram ujemną (Me=0,37) niż z posocznicą Gram dodatnią (Me=0,22) lub posocznicą grzybiczą (Me=0,24) (Kruskall-Wallis ANOVA, p=0,03)

Porównanie wyników badań laboratoryjnych w ocenianych podgrupach zawiera tabela 12.

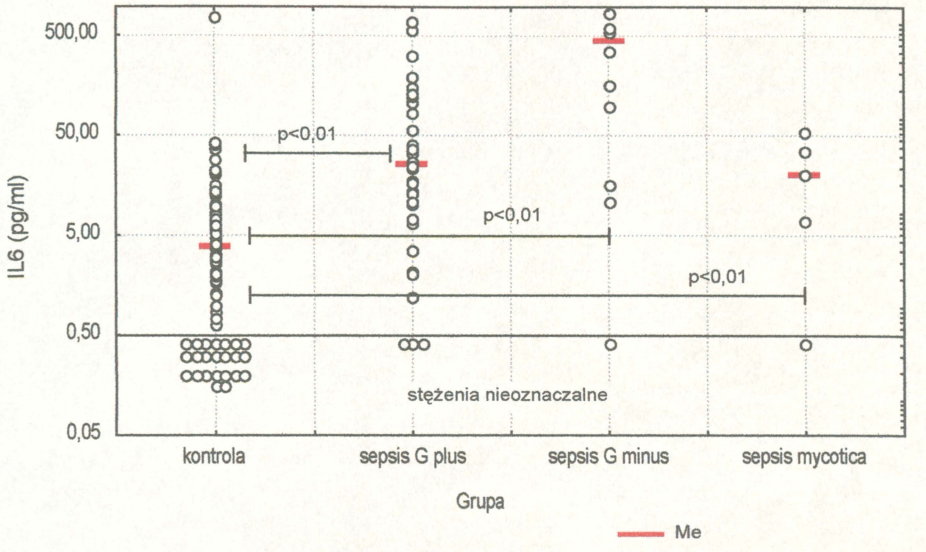
Tabela 12. Porównanie stężenia cytokin, PCT, LPS i ekspresji CD14 w grupach wyróżnionych na podstawie etiologii posocznicy

	Posocznica Gram dodatnia (n=36)	Posocznica Gram ujemna (n=7)	Posocznica Grzybicza (n=5)	p*
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	26 (7-103)	434 (55,6-579)	20 (7-34,8)	**0,02**
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	58,18 (22,3-179)	397,2 (105-869)	90,8 (37,7-236)	**0,04**
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	18,63 (8,1-37,4)	42,8 (28,4-61,3)	39,6 (14-64,8)	0,17
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	0,44 (0,25-1,26)	4,23 (1,53-22,57)	0,75 (0,49-1,23)	0,08
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-31)	16,6 (0-1000)	12,5 (0-46)	0,28
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	26,5 (10-41)	15,5 (1,8-47)	27 (20-53)	0,67
Leukocytoza (tys./mm^3) (Me; 25%-75%)	12,1 (9,4-21,1)	11,25 (5,3-13)	7,9 (5,8-11,6)	0,1
Płytki krwi (tys./mm^3) (Me; 25%-75%)	130 (63-246)	71,5 (19-173)	66,5 (39-152)	0,2
I/T (Me; 25%-75%)	0,22 (0,14-0,36)	0,37 (0,26-0,5)	0,24 (0,24-0,29)	**0,03**

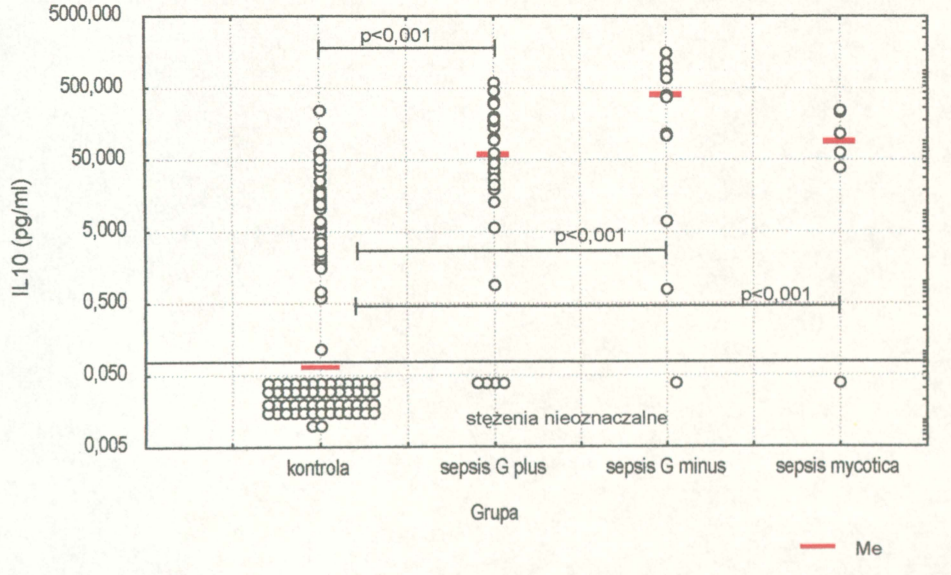
*p dla analizy wariancji Kruskalla-Wallisa

Następnie dokonano szczegółowej oceny wyników badań, w zakresie, których różniły się dzieci z grupy kontrolnej i noworodki z posocznicą (IL-6, IL-10, TNFα, PCT, płytki krwi, I/T). Stwierdzono, że stężenia IL-6, IL-10, TNFα, liczba płytek krwi oraz wartość I/T są znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej zarówno u dzieci z posocznicą Gram dodatnią, Gram ujemną, jak i posocznicą grzybiczą (ryciny 12.-15.).

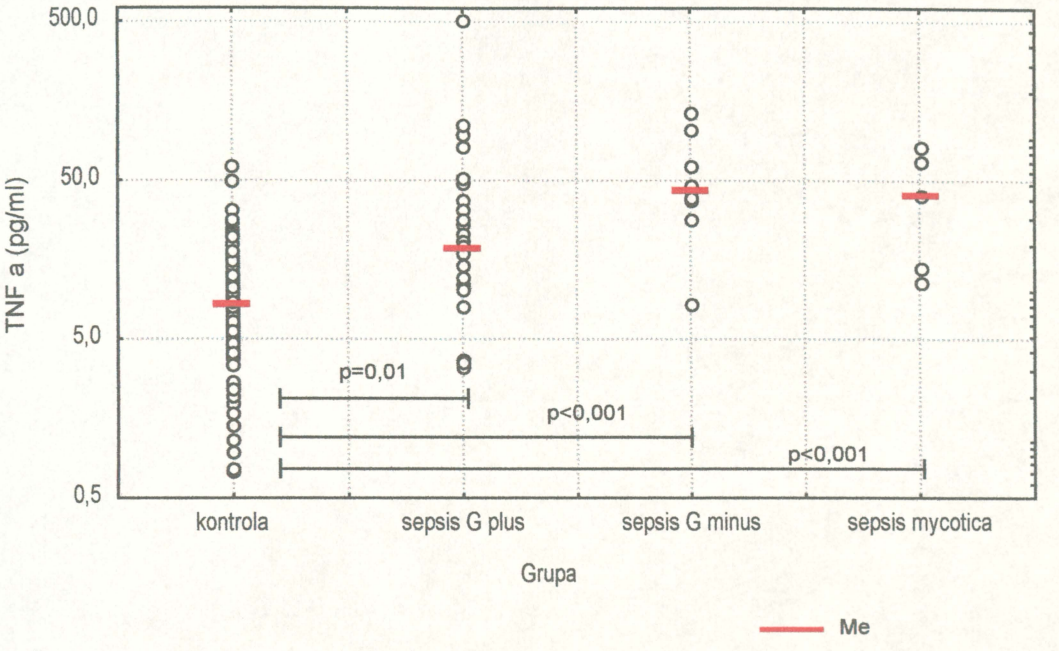
Rycina 12. Porównanie stężenia IL-6 pomiędzy grupą kontrolną a grupą noworodków z posocznicą o różnej etiologii



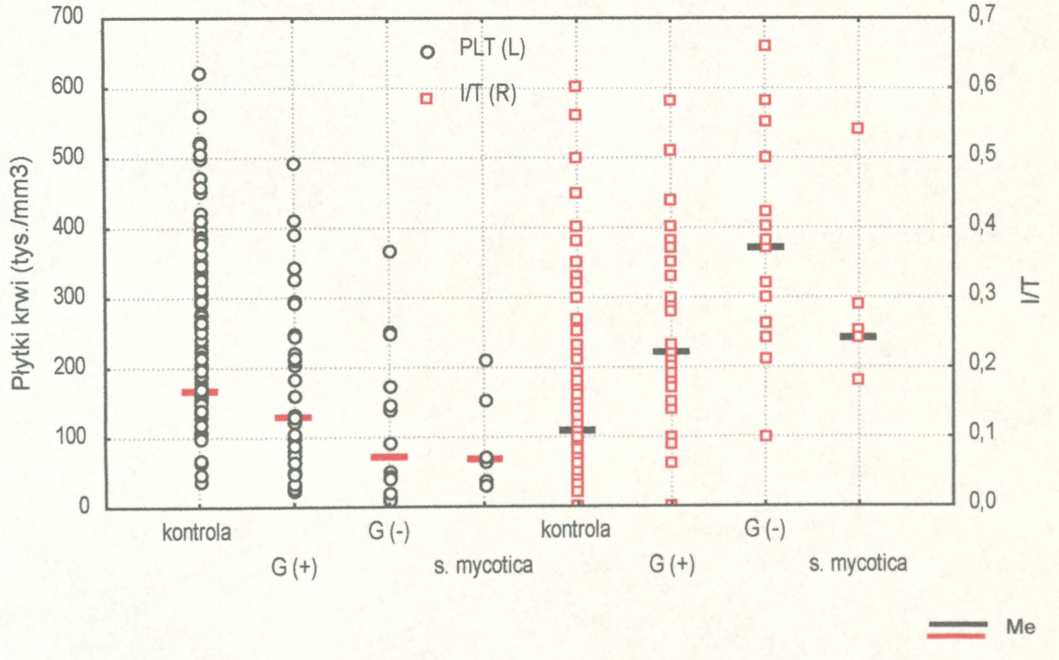
Rycina 13. Porównanie stężenia IL-10 pomiędzy grupą kontrolną a grupą noworodków z posocznicą o różnej etiologii



Rycina 14. Porównanie stężenia TNFα pomiędzy grupą kontrolną a grupą noworodków z posocznicą o różnej etiologii

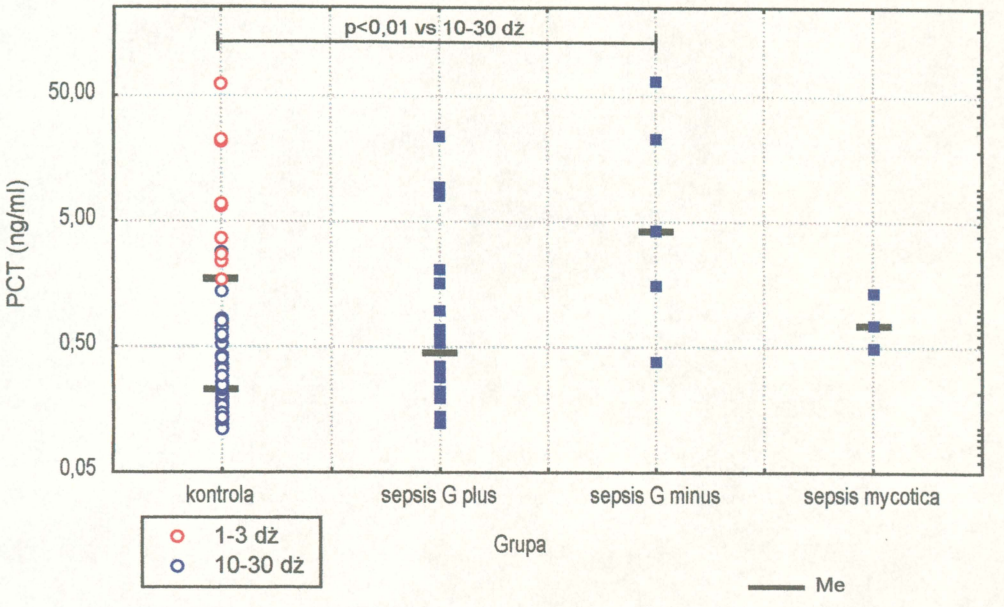


Rycina 15. Porównanie liczby płytek krwi oraz wskaźnika I/T granulocytów pomiędzy grupą kontrolną a grupą noworodków z posocznicą o różnej etiologii



Stężenie PCT było znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie u dzieci z posocznicą Gram ujemną (rycina 16.).

Rycina 16. Porównanie stężenia PCT pomiędzy grupą kontrolną a grupą noworodków z posocznicą o różnej etiologii



5.5. Ocena uwalniania cytokin, LPS, prokalcytoniny oraz ekspresji receptora CD14 w czasie martwiczego zapalenia jelit.

W czasie trwania badania objawy nietolerancji karmienia rozpoznano u 23 noworodków (25,8%), w tym u 14 dziewczynek i 9 chłopców. Urodzeniowa masa ciała dzieci z objawami nietolerancji karmienia (Me) wynosiła 1000g i była znamiennie mniejsza od urodzeniowej masy ciała dzieci z grupy kontrolnej (Me-1275g; p=0,004). Wiek płodowy dzieci z objawami nietolerancji karmienia był mniejszy w porównaniu do grupy kontrolnej (Me: 28 tyg. vs 29 tyg., p=0,02). Natomiast liczba dziewczynek i chłopców, ocena w skali Apgar po 1. i 5. min., liczba dzieci urodzonych drogami natury były podobne w obu ocenianych grupach (tabela 13.).

W 11 przypadkach nietolerancja karmienia związana była z objawami posocznicy Gram (+), u 5 dzieci towarzyszyła posocznicy Gram (-) a u 7 noworodków była jedynym obserwowanym objawem.

Objawy perforacji jelit zaobserwowano u 2 dzieci (2,2% ocenianej populacji) i u obu dzieci wystąpiły przed rozpoczęciem karmienia dojelitowego.

Tabela 13. Porównanie wybranych parametrów demograficznych w grupach: kontrolnej i z objawami nietolerancji karmienia

	Grupa kontrolna (n=28)	Dzieci z objawami nietolerancji karmienia (n=23)	p
Masa ciała (g) Me	1275	1000	**0,004***
Wiek płodowy (tyg.) Me	29	28	**0,02***
Skala Apgar po 1 min. (Me)	5	4	0,14*
Skala Apgar po 5 min. (Me)	6	6	0,7*
Płeć (męska/żeńska)	16/12	9/14	0,3**
Droga porodu (PSN/CC)	19/9	14/8	0,8**

*p dla testu U Manna-Whitneya ** p dla testu chi kwadrat

U dzieci z objawami nietolerancji karmienia stwierdzono znamiennie większe stężenia IL-6 (8,52 *vs* 3,79 pg/ml, p=0,01), IL-10 (8,76 *vs* 0 pg/ml, p<0,01) i PCT (0,66 *vs* 0,25 ng/ml, p=0,01). Ponadto u większej liczby dzieci z objawami nietolerancji karmienia stwierdzono obecność LPS w krwi w porównaniu do grupy kontrolnej (11/23 *vs* 6/28, χ^2 z poprawką Yatesa=2,28, p=0,09). Jak również obserwowane stężenia była znacząco większe (Me: 32 pg/ml *vs* 0 pg/ml, p=0,002, rycina 17). Porównanie wybranych wyników badań laboratoryjnych przedstawia tabela 14.

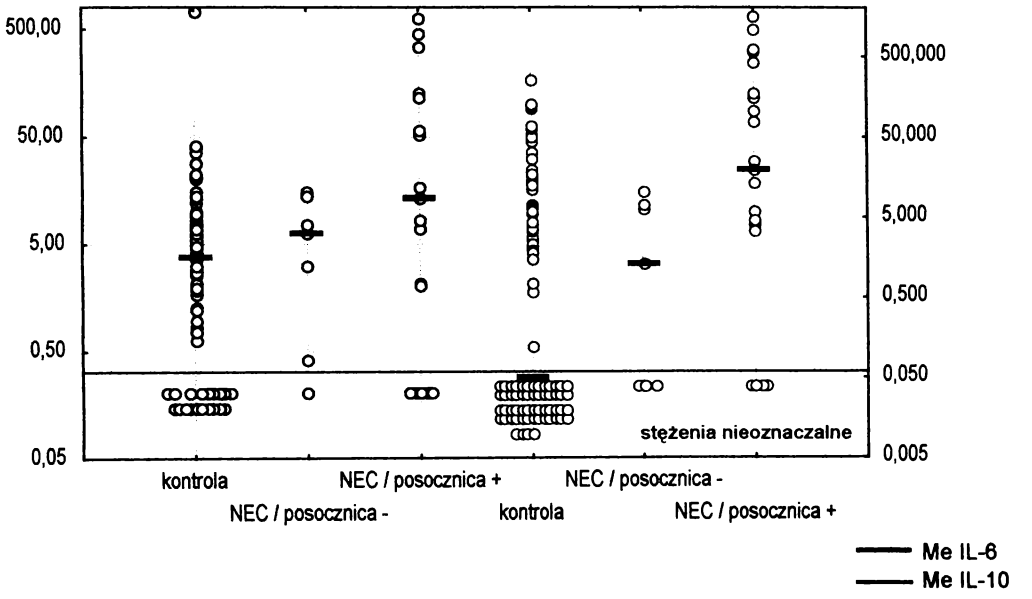
Tabela 14. Porównanie wybranych wyników badań laboratoryjnych w grupach: kontrolnej i z objawami nietolerancji karmienia..

	Grupa kontrolna (n=28)	Dzieci z objawami nietolerancji karmienia (n=23)	p
IL-6 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	3,79 (0,75-7,6)	8,52 (2,1-55,3)	**0,01***
IL-10 (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-5,8)	8,76 (3,2-155)	**0,0001***
TNFα (pg/ml) (Me; 25%-75%)	8,44 (5,2-12,2)	10,15 (3,8-33)	0,11*
PCT (ng/ml) (Me; 25%-75%)	0,25 (0,17-0,61)	0,66 (0,27-4,07)	**0,01***
LPS (pg/ml) (Me; 25%-75%)	0 (0-23)	32 (0-130)	**0,02***
$CD14^+$ (%) (Me; 25%-75%)	15	23	0,06*

*p dla testu U Manna-Whitneya

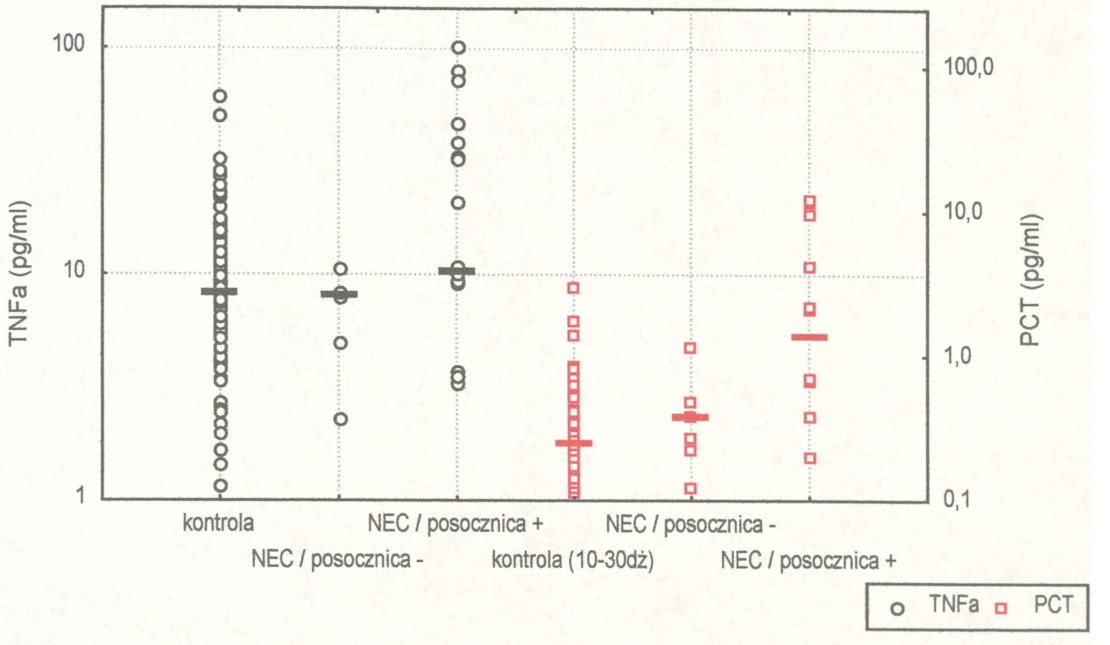
Jednakże, dlatego, że u 2/3 dzieci objawy nietolerancji karmienia towarzyszyły posocznicy, dodatkowo przeprowadzono analizę w 2 podgrupach noworodków: bez objawów posocznicy i z objawami posocznicy. Stwierdzono, że stężenia ocenianych cytokin są znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie u dzieci, u których przy występowaniu objawów nietolerancji karmienia uzyskano dodatni wynik posiewu z krwi (IL-6 odpowiednio: 3,7 pg/ml; 6,2pg/ml; 13,2 pg/ml, $p<0,01$, IL-10 odpowiednio: 0 pg/ml; 1,3 pg/ml; 19,6 pg/ml, $p.<0,001$ – rycina 17.).

Rycina 17. Porównanie stężenia IL-6 i IL-10 pomiędzy grupą kontrolną a podgrupami (bez/z posocznicą) noworodków z objawami nietolerancji karmienia



Stężenia TNFα i PCT nie różniły się znamiennie statystycznie pomiędzy ocenianymi grupami (rycina 18.)

Rycina 18. Porównanie stężenia TNFα i PCT pomiędzy grupą kontrolną a podgrupami (bez/z posocznicą) noworodków z objawami nietolerancji karmienia



Ze względu na fakt, że tylko u 2 dzieci wystąpiła perforacja przewodu pokarmowego nie przeprowadzono oceny uwalniania cytokin w grupach D1 *vs* D2.

5.6. Korelacje pomiędzy uwalnianymi w czasie posocznicy i nietolerancji karmienia/NEC cytokinami

Oceny korelacji pomiędzy uwalnianymi cytokinami dokonano łącznie w grupach dzieci z objawami nietolerancji karmienia/NEC oraz dzieci z posocznicą. Oceną objęto 55 dzieci, u których uzyskano co najmniej 2 wyniki badań dodatkowych.

Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniami IL-6 i IL-10 (wsp. korelacji Spearmana R=0,72, p<0,001; rycina 19.), IL-6 i TNFα (wsp. korelacji Spearmana R=0,57, p<0,001; rycina 20), IL-10 i TNFα (wsp. korelacji Spearmana R=0,69, p<0,001; rycina 21) oraz pomiędzy TNFα i PCT (wsp. korelacji Spearmana R=0,44, p=0,01; rycina 22).

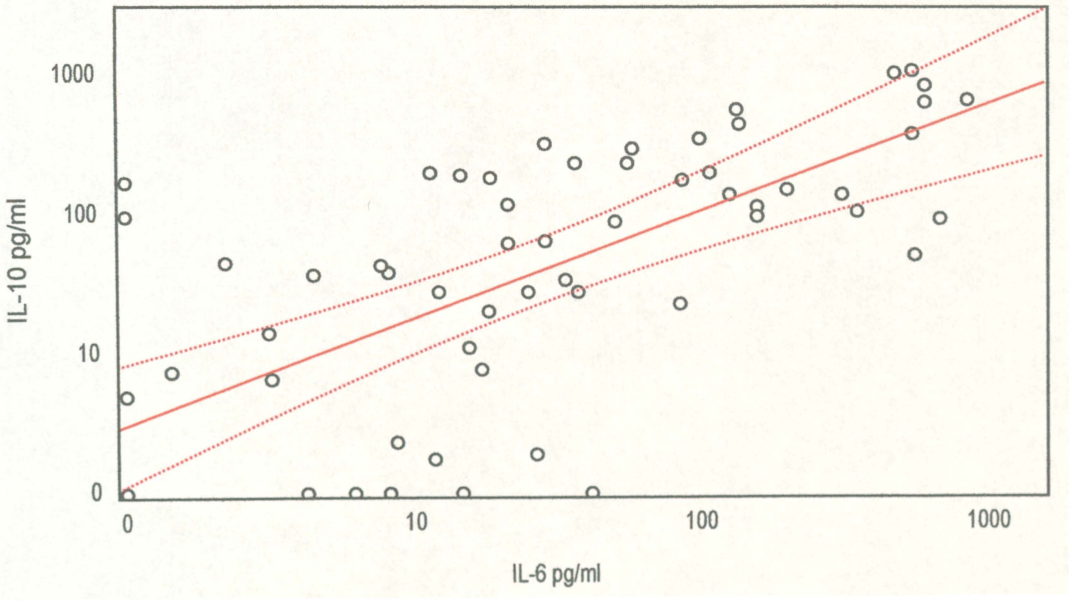
Zestawienie współczynników korelacji przedstawia tabela 15.

Tabela 15. Ocena korelacji pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi

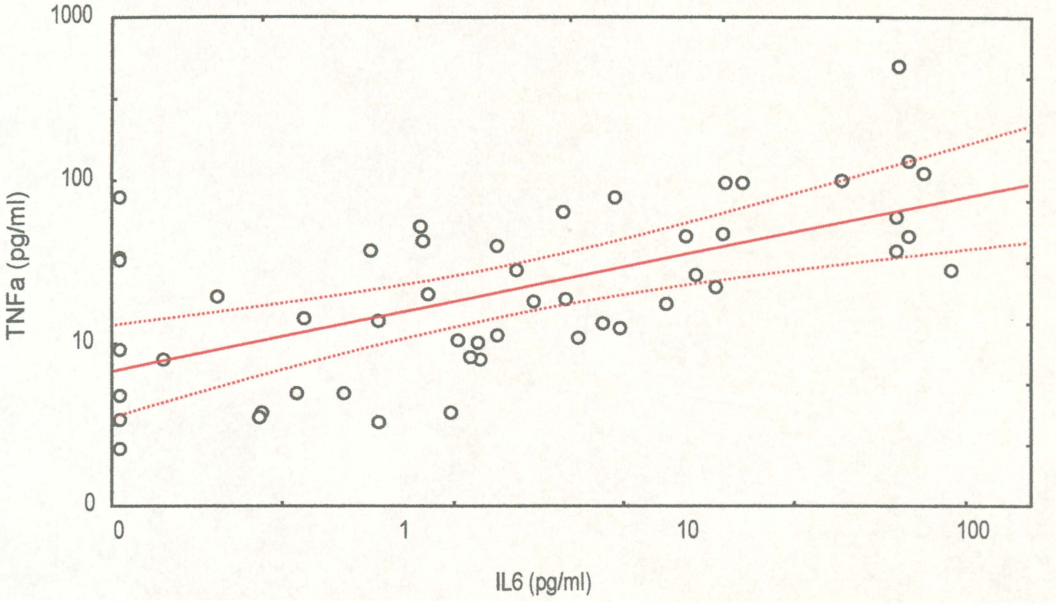
		CD14$^+$	IL-6	IL-10	TNFα	PCT	LPS
CD14$^+$	R* p**		-0,06 0,70	0,17 0,30	0,03 0,86	0,02 0,91	-0,01 0,94
IL-6	R* p**			**0,72** **0,00**	**0,57** **0,00**	0,25 0,14	0,03 0,81
IL-10	R* p**				**0,69** **0,00**	0,38 0,06	0,03 0,83
TNFα	R* p**					**0,44** **0,01**	0,13 0,36
PCT	R* p**						-0,09 0,59
LPS	R* p**						

*R - współczynnik korelacji Spearmana ** p dla testu Spearmana

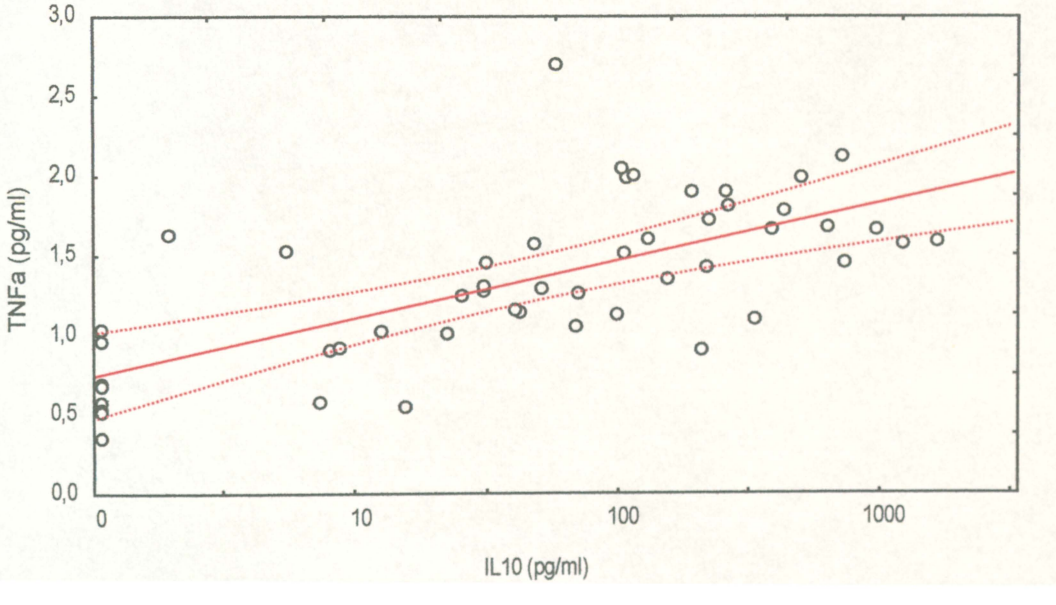
Rycina 19. Korelacja pomiędzy stężeniami IL-6 i IL-10 u noworodków z posocznicą i/lub objawami nietolerancji karmienia



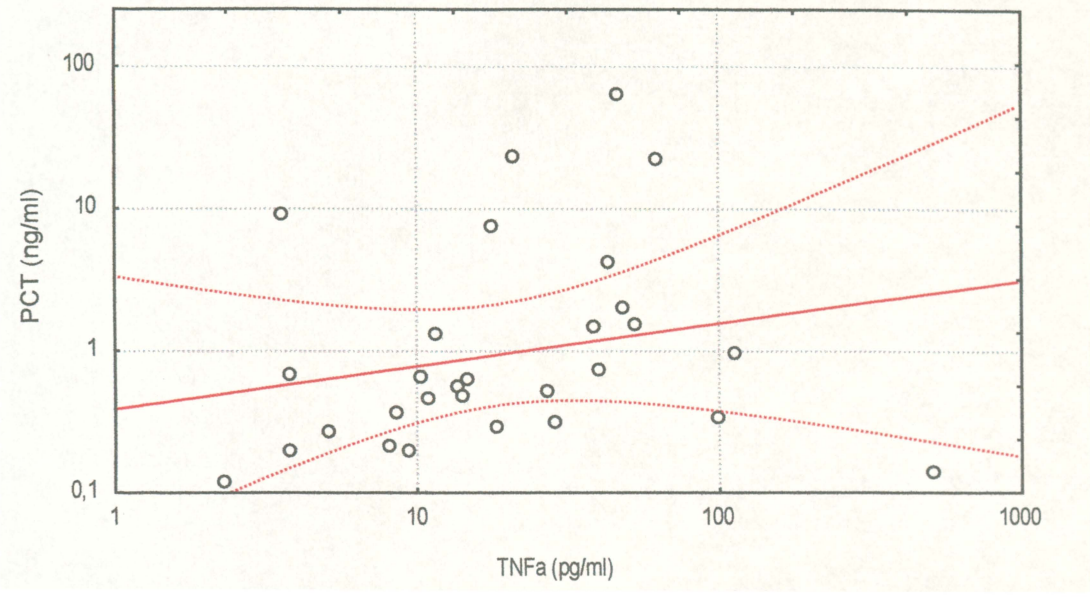
Rycina 20. Korelacja pomiędzy stężeniami IL-6 i TNFα u noworodków z posocznicą i/lub objawami nietolerancji karmienia



Rycina 21. Korelacja pomiędzy stężeniami IL-10 i TNFα u noworodków z posocznicą i/lub objawami nietolerancji karmienia

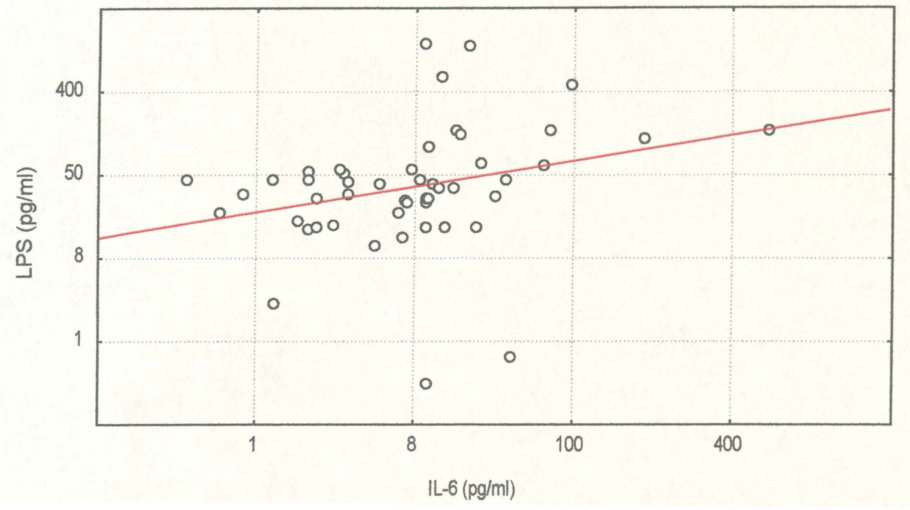


Rycina 22. Korelacja pomiędzy stężeniami TNFα i PCT u noworodków z posocznicą i/lub objawami nietolerancji karmienia.

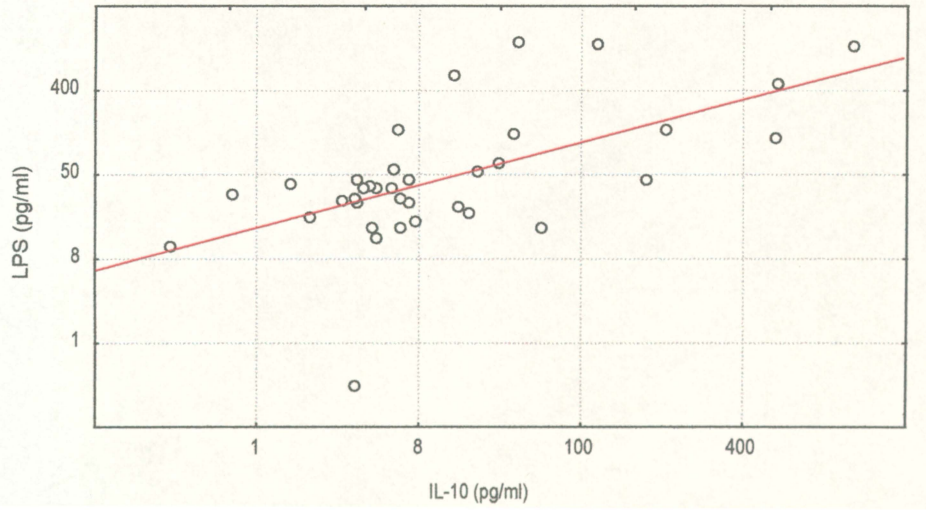


Dodatkowo poza wymienionymi powyżej zależnościami wśród noworodków z objawami nietolerancji karmienia zaobserwowano istotne korelacje pomiędzy stężeniem IL-6 a LPS (R=0,39, p.=0,01, rycina 23.) oraz pomiędzy stężeniem IL-10 a LPS (R=0,54, p<0,01, rycina 24.).

Rycina 23. Korelacja pomiędzy stężeniami IL-6 i LPS u noworodków z objawami nietolerancji karmienia



Rycina 24. Korelacja pomiędzy stężeniami IL-10 i LPS u noworodków z objawami nietolerancji karmienia



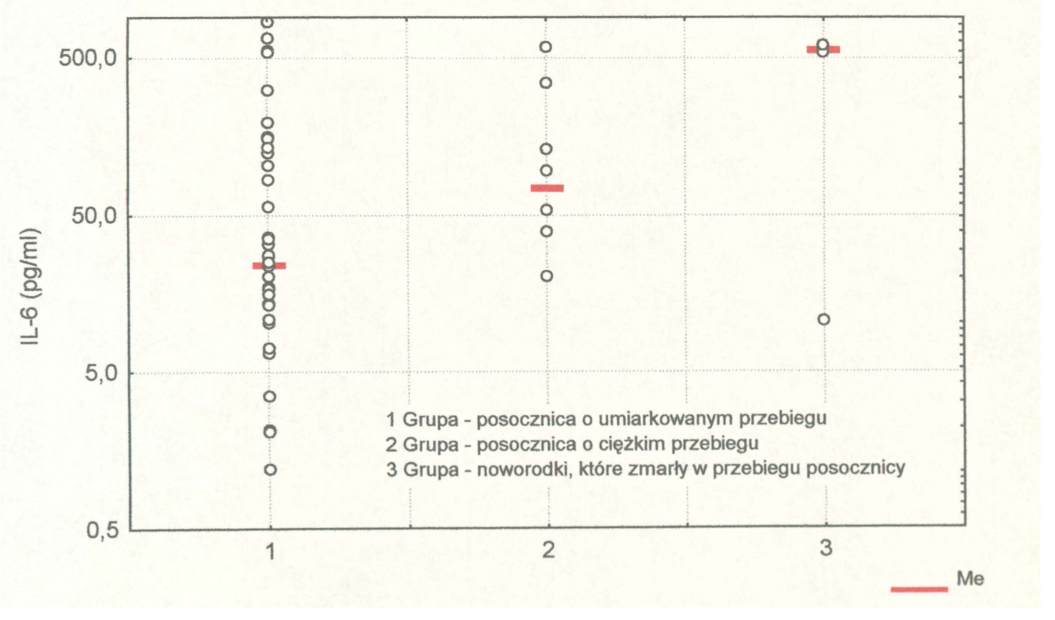
Przeprowadzono także, ocenę stężenia cytokin w podgrupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym. W czasie trwania programu, w chwili podejrzenia posocznicy w karcie obserwacyjnej szczegółowo odnotowywano objawy w momencie pobrania krwi do badań tj. 1) bezdechy/ pogorszenie parametrów wentylacji,

2) zaburzenia czynności serca, 3) hepatosplenomegalia, 4) zaburzenia perfuzji obwodowej/hipotensja, 5) oliguria, 6) inne (zapalenie stawów, kwasica metaboliczna).

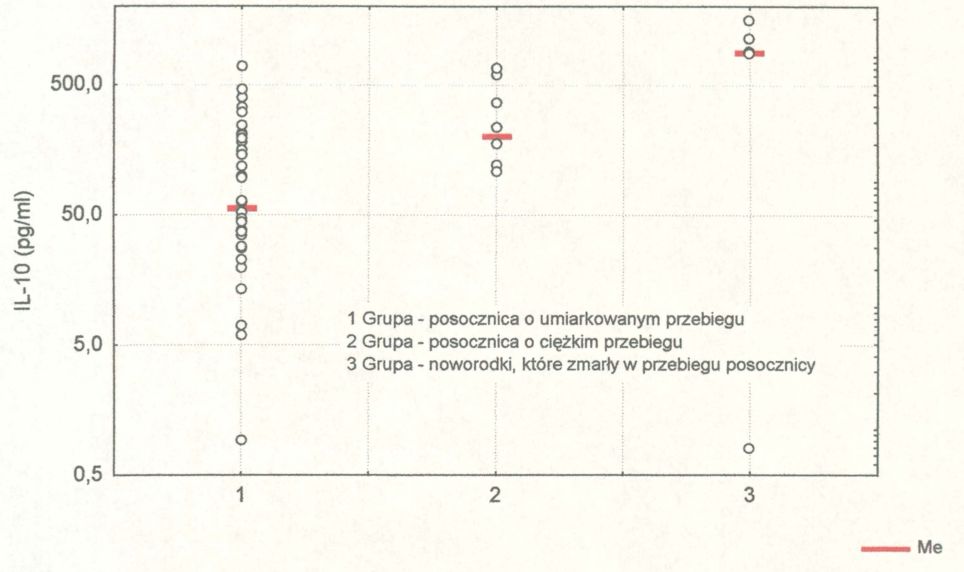
Wyróżniono 3 podgrupy dzieci: 1) z posocznicą o umiarkowanym nasileniu (1-3 objawy) (n=36), 2) posocznica o ciężkim przebiegu (4-6 objawów) (n=8), 3) noworodki, które zmarły w przebiegu posocznicy (n=4).

Stwierdzono istotną korelację pomiędzy nasileniem posocznicy a obserwowanymi stężeniami IL-6 (odpowiednio Me: 24 pg/ml; 75 pg/ml; 554 pg/ml, Kruskall-Wallis ANOVA, p<0,01, rycina 25) oraz IL-10 (odpowiednio Me: 57 pg/ml, 205 pg/ml, 889 pg/ml, Kruskall-Wallis ANOVA, p.<0,01; rycina 26.).

Rycina 25. Porównanie stężenia IL-6 w grupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym

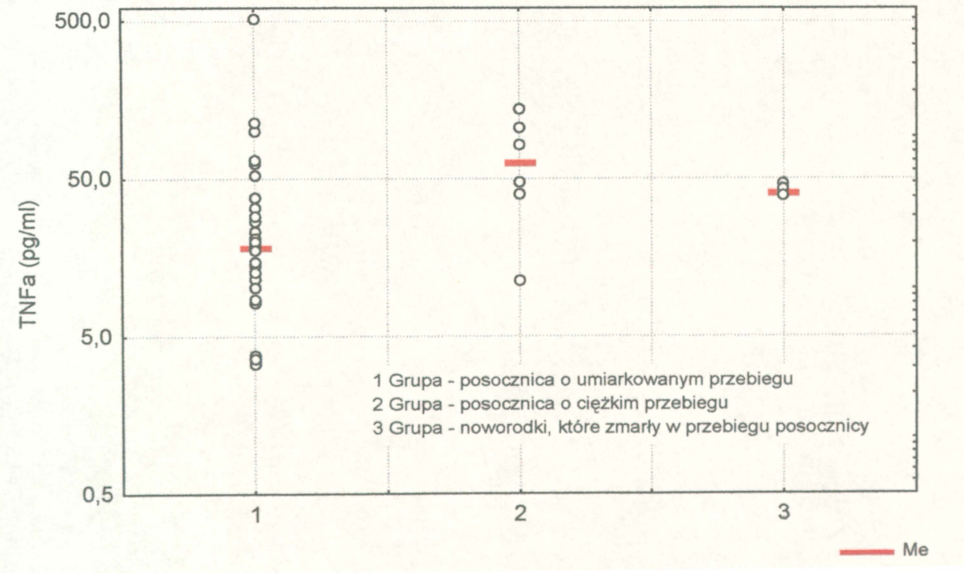


Rycina 26. Porównanie stężenia IL-10 w grupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym



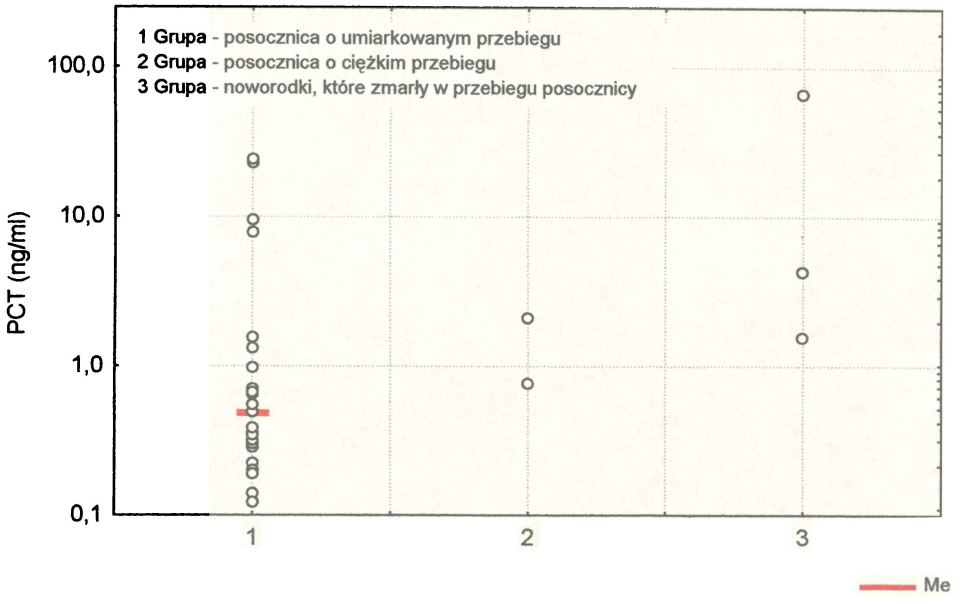
Stwierdzono również, że stężenia TNFα były większe w grupie noworodków z posocznicą o ciężkim przebiegu w porównaniu do dzieci z posocznicą o umiarkowanym przebiegu (Me: 63,6 pg/ml vs 18,2 pg/ml, test U Manna-Whitneya, p=0,01, rycina 27).

Rycina 27. Porównanie stężenia TNFα w grupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym



Ze względu na małą liczbę wykonanych oznaczeń analiza statystyczna związku stężenia PCT z przebiegiem klinicznym nie była możliwa (rycina 28.).

Rycina 28. Porównanie stężenia prokalcytoniny w grupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym



5.7. Ocena dynamiki uwalniania cytokin u dzieci z posocznicą

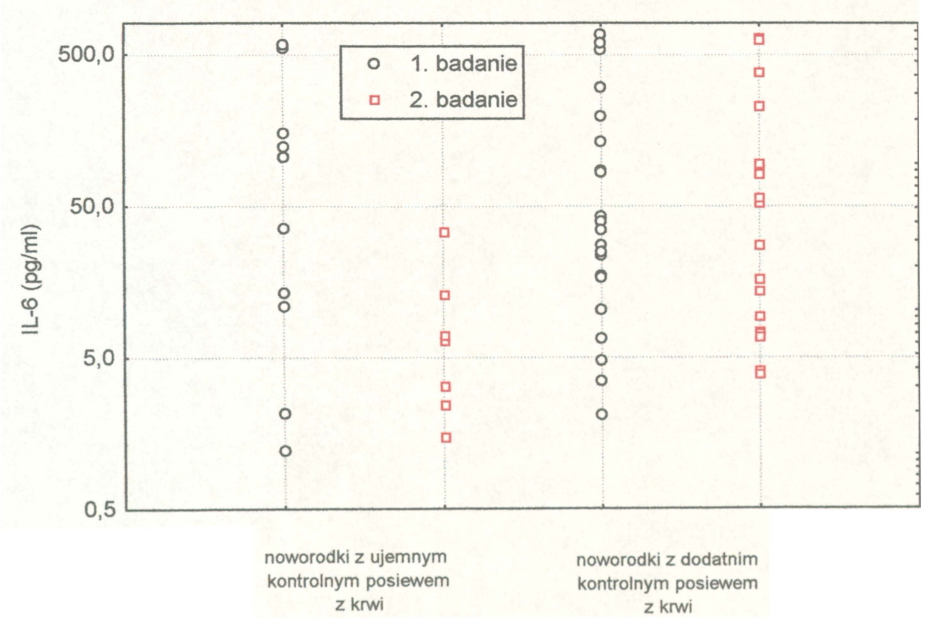
Badania kontrolne pobrano po 48-96 godzinach od rozpoznania u 36/46 noworodków z potwierdzoną bakteriologicznie posocznicą, w tym u 31 dzieci z posocznicą wywołaną przez bakterie Gram dodatnie, 4 noworodków z posocznicą Gram ujemną i 1 dziecka z posocznicą grzybiczą. Wśród ocenianych dzieci, dwoje zmarło (po 4 i po 12 dniach od rozpoznania posocznicy).

Stężenia TNFα, PCT, LPS oraz ekspresja receptora CD14 po 48-96 godzinach od rozpoznania posocznicy były mniejsze od stężeń oznaczonych przy wystąpieniu pierwszych objawów, jakkolwiek różnica nie była znamienna statystycznie (odpowiednio Me: TNFα: 20,6pg/ml *vs* 16,6 pg/ml; PCT: 0,62 ng/ml *vs* 0,3 ng/ml; LPS: 0 pg/ml *vs* 0 pg/ml; $CD14^+$: 24% *vs* 23%). Stężenia IL-6 (Me: 31 pg/ml *vs* 8,26 pg/ml; test kolejności par Wilkoxona, p=0,05) i IL-10 (Me: 95 pg/ml *vs* 7,22 pg/ml test

kolejności par Wilkoxona, p=0,02) różniły się znacząco w dwóch ocenianych badaniach.

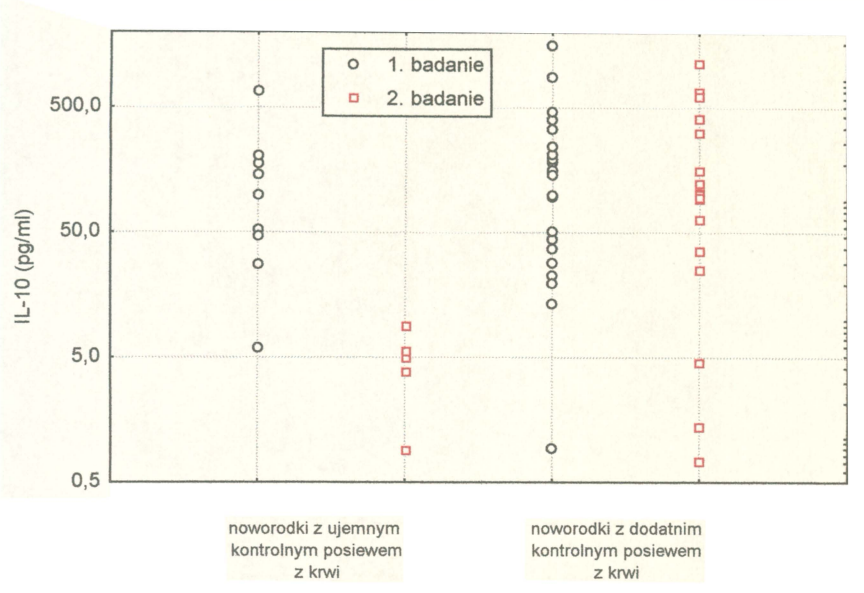
U 13 noworodków zaobserwowano zwiększenie stężeń IL-10 w czasie 48-96 godzin, a u 17 dzieci zmniejszenie stężeń IL-10 w czasie 48-96 godzin. Podobnie stężenie IL-6 zwiększyło się po 48-96 godzinach u 12 dzieci, a zmniejszyło u 18 dzieci. Najistotniejszym czynnikiem różnicującym dzieci, u których obserwowano zwiększenie stężeń IL-6 i IL-10 od noworodków, u których stężenia cytokin zmniejszyły się był fakt utrzymywania się objawów posocznicy oraz wynik kontrolnego posiewu z krwi. U wszystkich dzieci, u których kontrolny wynik posiewu z krwi po 48-96 godzinach od 1. badania był ujemny (n=9) zaobserwowano znamienne zmniejszenie stężeń cytokin (rycina 29., 30.).

Rycina 29. Ocena dynamiki uwalniania IL-6 u noworodków z posocznicą



Biblioteka CM UJ w Krakowie

Rycina 30. Ocena dynamiki uwalniania IL-10 u noworodków z posocznicą



5.8. Ocena przydatności klinicznej oznaczania wybranych badań laboratoryjnych

Jak wykazano powyżej badane grupy różniły się pod względem obserwowanych stężeń IL-6, IL-10, TNFα i PCT jak również liczby płytek krwi i wskaźnika I/T granulocytów. W związku z tym dokonano oceny przydatności klinicznej wymienionych badań laboratoryjnych. Oceniono przydatność diagnostyczną oraz rokowniczą.

Przydatność diagnostyczną rozważano w dwóch płaszczyznach:

- rozróżnienia pomiędzy noworodkami bez niepokojących objawów (grupa kontrolna) a dziećmi chorymi (grupa A *vs* grupa B+C)
- wyróżnienia wśród noworodków z niepokojącymi objawami dzieci z posocznicą (grupa B *vs* grupa C)

Aby wyznaczyć wartości progowe dla poszczególnych testów w pierwszym etapie wyznaczono krzywe opisujące zależność między odsetkami wyników prawdziwie i fałszywie dodatnich – krzywe ROC. Po wyznaczeniu wartości progowych wyliczono czułość, swoistość, PPV i NPV. Na podstawie wyliczenia pola powierzchni pod krzywą dla danego testu, odzwierciedlającego zdolność testu do prawidłowego

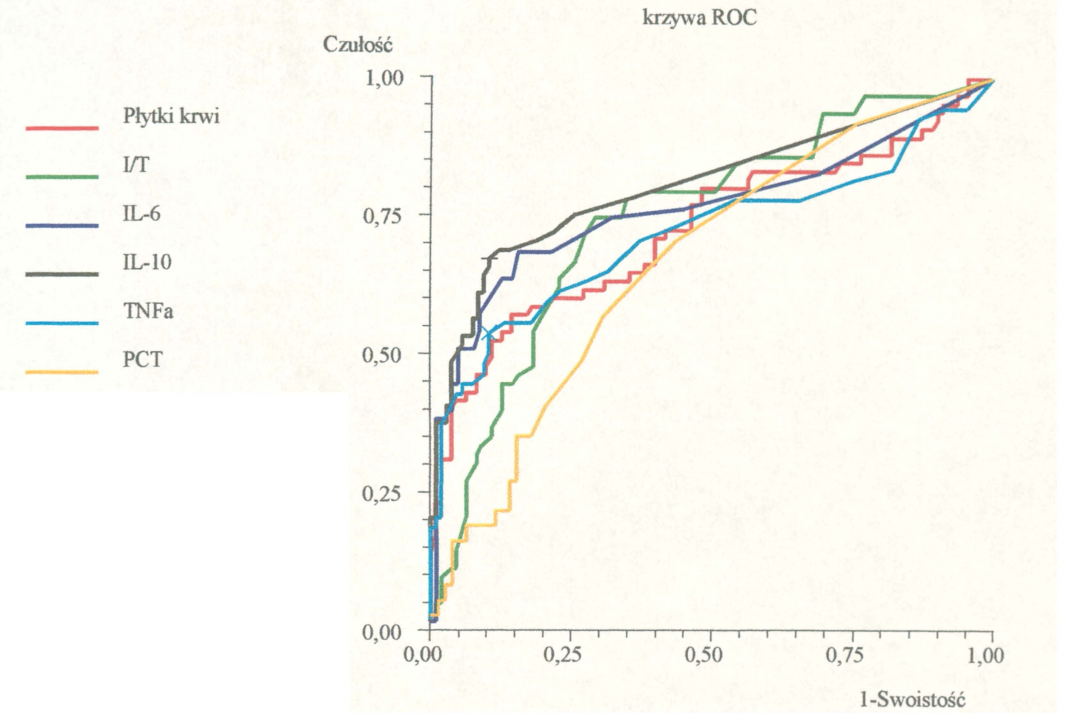
rozgraniczania wyników prawidłowych i nieprawidłowych - porównano przydatność ocenianych badań.

Badaniem charakteryzującym się największą czułością i swoistością w rozróżnianiu pomiędzy noworodkami z grupy kontrolnej a dziećmi chorymi było oznaczanie stężenia IL-10. Stwierdzenie stężenia IL-10 > 20 pg/ml pozwalało odróżnić noworodki chore od zdrowych z czułością wynoszącą 67% i swoistością równą 90%. Oznaczenie stężenia IL-6 > 10 pg/ml pozwalało rozróżnić noworodki chore od dzieci zdrowych z czułością 68% i swoistością 84%. Podobną czułością (62%) i swoistością (77%) charakteryzowało się stwierdzenie wskaźnika I/T granulocytów > 0,2. Najmniejszą wartość diagnostyczną posiadało oznaczanie liczby płytek krwi, TNFα i PCT. Szczegółowe wyniki analizy czułości, swoistości, PPV, NPV i wiarygodności testów przedstawiono w tab. 16. Krzywe ROC przedstawia rycina 31.

Tabela 16. Ocena wiarygodności wybranych testów laboratoryjnych w różnicowaniu noworodków z grupy kontrolnej (A) i noworodków chorych (B+C)

	Wartość progowa	czułość	swoistość	PPV	NPV	Obszar pod krzywą ROC
PLT	<150.000/mm^3	57%	85%	69%	77%	72%
I/T	> 0,2	62%	77%	61%	78%	74%
IL-6	>10 pg/ml	68%	84%	73%	81%	75%
IL-10	**>20 pg/ml**	**67%**	**90%**	**80%**	**82%**	**81%**
TNFα	>10 pg/ml	70%	63%	49%	80%	71%
PCT	>0,5 ng/ml	51%	70%	45%	75%	67%

Rycina 31. Krzywe ROC wybranych testów laboratoryjnych w różnicowaniu noworodków z grupy kontrolnej (A) i noworodków chorych (B+C)

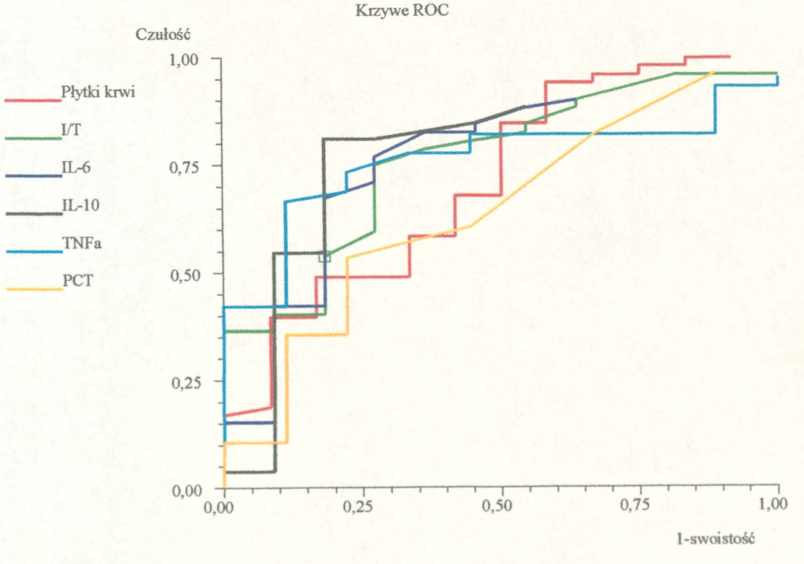


Podobne wyniki uzyskano oceniając przydatność testów w rozpoznawaniu posocznicy wśród dzieci z niepokojącymi objawami (grupa B vs grupa C). Najlepszą czułością i swoistością charakteryzowało się oznaczanie IL-10 (odpowiednio 79% i 82%). Stwierdzenie zwiększonego stężenia IL-6 (>10pg/ml; czułość 77%, swoistość 73%) lub TNFα (>14 pg/ml; czułość 67%, swoistość 89%) pozwalało także odróżnić dzieci z posocznicą od noworodków z innymi niepokojącymi objawami. Testy takie jak PLT, I/T oraz PCT charakteryzowały się małą czułością (47-54%). Szczegółowe wyniki analizy czułości, swoistości, PPV, NPV i wiarygodności testów przedstawiono w tab. 17. Krzywe ROC przedstawia rycina 32.

Tabela 17. Ocena wiarygodności wybranych testów laboratoryjnych w rozpoznawaniu posocznicy

	Wartość progowa	czułość	swoistość	PPV	NPV	Obszar pod krzywą ROC
PLT	<100.000/mm^3	47%	83%	93%	26%	71%
I/T	> 0,25	54%	82%	93%	27%	76%
IL-6	>10 pg/ml	77%	73%	93%	40%	76%
IL-10	**>15 pg/ml**	**79%**	**82%**	**96%**	**45%**	**80%**
TNFα	>14 pg/ml	67%	89%	97%	35%	76%
PCT	>0,65 ng/ml	53%	78%	88%	35%	66%

Rycina 32. Krzywe ROC wybranych testów laboratoryjnych w rozpoznawaniu posocznicy



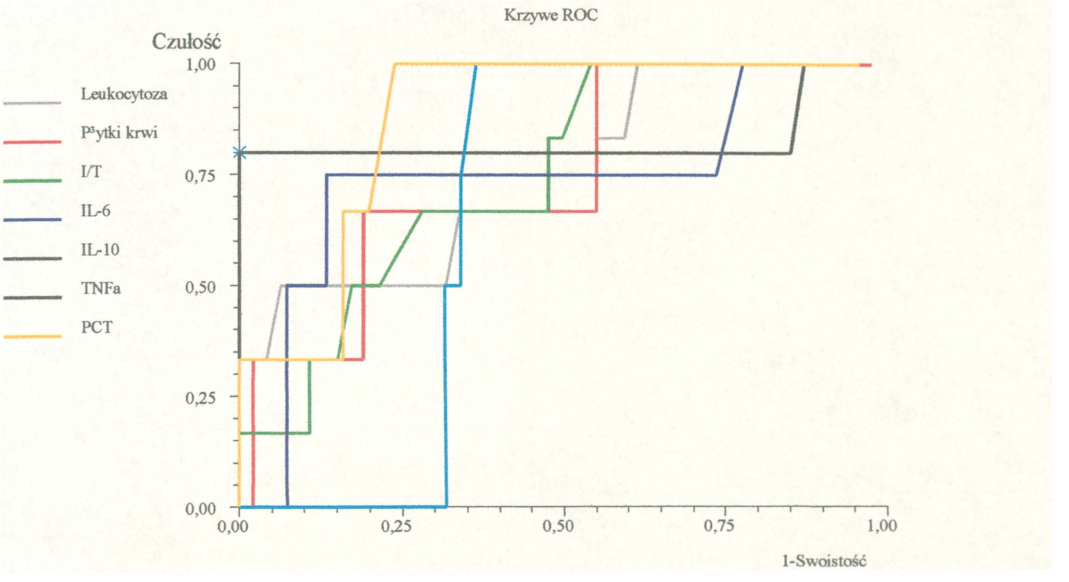
Za przydatność rokowniczą przyjęto możliwość przewidzenia zgonu dziecka na podstawie wyniku badania pobranego w momencie początku choroby (grupa B+C). Jak wykazano na rycinach 25.-28. stwierdzono istotne różnice wartości obserwowanych stężeń IL-6, IL-10, TNFα i PCT w zależności od przebiegu klinicznego posocznicy. Wyróżnienia noworodków, które zmarły w przebiegu posocznicy można dokonać na podstawie oznaczenia IL-10 oraz PCT. Stwierdzenie stężenia IL-10 >680 pg/ml

pozwalało przewidzieć zgon dziecka z czułością wynoszącą 80% i swoistością 100%. Oznaczało to, że każdy noworodek, u którego stwierdzono tak duże stężenia IL-10 zmarł. Przeciwnie do oznaczenia IL-10, pomiar PCT umożliwiał wyróżnienie dzieci o pomyślnym rokowaniu (żadne dziecko, u którego stwierdzono stężenie PCT <1,4 ng/ml nie zmarło). Testy takie jak liczba leukocytów i płytek krwi obwodowej, wskaźnik I/T granulocytów, IL-6, TNFα charakteryzowały się dużą wartością predykcyjną ujemną (94-100%), jednakże ich wartość predykcyjna dodatnia była mała (18-50%). Szczegółowe wyniki analizy czułości, swoistości, PPV, NPV i wiarygodności testów przedstawiono w tab. 18. Krzywe ROC przedstawia rycina 33.

Tabela 18. Ocena przydatności rokowniczej wybranych testów laboratoryjnych

	Wartość progowa	czułość	swoistość	PPV	NPV	Obszar pod krzywą ROC
L	<5.000/mm^3	50%	94%	50%	94%	74%
PLT	<40.000/mm^3	67%	81%	31%	95%	72%
I/T	> 0,35	67%	67%	21%	94%	75%
IL-6	>340 pg/ml	75%	90%	38%	98%	77%
IL-10	**>680 pg/ml**	**80%**	**100%**	**100%**	**98%**	**83%**
TNFα	>40 pg/ml	75%	67%	18%	96%	67%
PCT	**<1,4 ng/ml**	**100%**	**76%**	**33%**	**100%**	**86%**

Rycina 33. Krzywe ROC przydatności rokowniczej wybranych testów laboratoryjnych



6. Dyskusja

Praca przedstawia ocenę uwalniania cytokin pro i przeciwzapalnych u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała. Analizie poddano kohortę 89 dzieci, ze urodzeniową masą ciała (Me) 1060g. Miejscem badania był trzeciorzędowy oddział intensywnej terapii noworodka szpitala uniwersyteckiego. Stan kliniczny większości dzieci był ciężki, 75% leczonych dzieci wymagało wentylacji zastępczej. Ocenie poddano, zatem szczególną grupę dzieci o największym ryzyku wystąpienia uogólnionego zakażenia oraz martwiczego zapalenia jelit (89).

Ocena uwalniania Interleukiny-6, Interleukiny-10 i TNFα u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniami interleukiny-6, interleukiny-10 i TNF-α a wiekiem płodowym lub urodzeniową masą ciała. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami przedstawionymi przez Messera i wsp., którzy oceniając grupę 288 noworodków urodzonych pomiędzy 24 a 42 tyg. ciąży nie stwierdzili zależności pomiędzy stężeniem IL-6 a wiekiem płodowym (82). W badaniu tym jednakże, przeważały noworodki donoszone (Mediana 38,5 tyg.). Doellner i wsp. (24). porównali stężenia IL-6 w grupach noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu i noworodków urodzonych przedwcześnie nie stwierdzając istotnych różnic. Jednak, w cytowanym badaniu nie przeprowadzono dokładnej analizy korelacji pomiędzy wiekiem płodowym a obserwowanymi stężeniami IL-6. Lehrnbecher i wsp. (68) przebadali 44 noworodki w wieku 24-42 tygodni, również nie stwierdzając zależności pomiędzy dojrzałością dziecka a stężeniami IL-6 w krwi pępowinowej. Inne wyniki przedstawili Blanco i wsp. (11), którzy stwierdzili odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy wiekiem płodowym a stężeniem IL-10. Badaniem tym objęto 40 noworodków w wieku płodowym (Me) 32 tygodni, a więc dzieci dojrzalsze niż w prezentowanej pracy, w tym 20 najmniejszych dzieci wymagało wentylacji mechanicznej, co mogło mieć wpływ na wynik analizy.

Najprawdopodobniej, zatem nie dojrzałość noworodka jest głównym czynnikiem warunkującym uwalnianie cytokin. W ostatnich latach opublikowano kilka badań eksperymentalnych oraz klinicznych oceniających wpływ różnych czynników na uwalnianie cytokin u noworodków. Bessler i wsp. (9) porównali produkcję IL-1b, IL-6 i TNFα przez makrofagi u wcześniaków, noworodków donoszonych i dorosłych przed i po zakończeniu leczenia deksametazonem. Autorzy stwierdzili, że spontaniczne uwalnianie cytokin u wcześniaków leczonych deksametazonem jest znacznie mniejsze niż u dorosłych. W przeciwieństwie do tego uwalnianie cytokin po stymulacji makrofagów LPS było znacznie zwiększone u noworodków leczonych deksametazonem. Sirota i wsp. (111) oceniali wpływ leczenia ibuprofenem na uwalnianie cytokin przez makrofagi wcześniaków stwierdzając w porównaniu do dorosłych znacznie zwiększone uwalnianie cytokin pro zapalnych oraz zahamowanie uwalniania cytokin przeciwzapalnych. Badania powyższe mogą wskazywać na istnienie związku pomiędzy hormonami stresu a układem cytokin. W innym badaniu stwierdzono natomiast, że również stosowanie fototerapii może wpływać na obserwowane stężenia cytokin (zwiększone stężenie IL-10) (112).

Do najistotniejszych czynników decydujących o stężeniu cytokin w pierwszych dniach życia u „nieinfekcyjnych" dzieci mogą należeć niedotlenienie oraz krwawienie śródczaszkowe (104). W materiale własnym wyróżniono 2 podgrupy dzieci: ocenione w skali Apgar w 5 min. życia na mniej niż 6 punktów (n=34) oraz grupę kontrolną (n=39). Stężenia IL-6 oraz TNFα były znacząco większe w grupie dzieci z zamartwicą. Dane te są zgodne z opublikowanymi przez Fotopoulusa i wsp., którzy oceniali stężenia IL-1b, IL-6 i TNFα w surowicy w 1 dobie życia u wcześniaków z objawami niedotlenienia okołoporodowego (pH krwi pępowinowej < 7,1, resuscytacja na sali porodowej > 3 min.). Autorzy stwierdzili m.in., że stężenia wszystkich 3 cytokin są znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo stężenie IL-6 w 1. dobie życia było wskaźnikiem rokowniczym stanu neurologicznego w wieku 18 miesięcy. Podobne wyniki uzyskano oceniając stężenia TNFα i IL-1b w płynie mózgowo-rdzeniowym u noworodków donoszonych z objawami encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej. Wykazano także, istnienie korelacji pomiędzy stanem klinicznym dziecka (wg skali Sarnat) a stężeniami cytokin w pierwszych 6 godzinach życia (96).

Stan klinicznym mogącym modyfikować uwalnianie cytokin może także być krwawienie śródczaszkowe. Baumaister i wsp. przedstawili interesujący opis serii przypadków noworodków z pokrwotocznym wodogłowiem, u których ocena stężenia

IL-6 była przydatna diagnostycznie (różnicowanie z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych) i rokowniczo (5). Analiza związku pomiędzy krwawieniem śródczaszkowym a uwalnianiem cytokin w materiale własnym była ograniczona ze względu na fakt, że jednym z kryteriów wyłączenia dziecka z badania było stwierdzenie krwawienia śródczaszkowego IV stopnia. Oceniono, zatem jedynie grupę dzieci z objawami IVH III stopnia (n=11) nie stwierdzając istotnych statystycznie różnic, co do uzyskanych stężeń cytokin. W tym roku opublikowane zostały również wyniki badań wskazujące na udział cytokin w rozwoju leukomalacji okołokomorowej (PVL – periventricular leucomalacia) u wcześniaków. Wysunięto hipotezę, że jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za rozwój PVL jest TNFα wykazujący silne właściwości myelinotoksyczne.

Do innej grupy czynników mogących modyfikować uwalnianie cytokin w pierwszych dniach życia należy stan układu oddechowego. Przesłankami pozwalającymi wysunąć taką hipotezę mogą być wyniki badań McColma (76), który stwierdził, że u wcześniaków, u których rozwinęły się objawy dysplazji oskrzelowo-płucnej (BPD – bronchopulmonary dysplasia), w pierwszych dniach życia stężenie IL-10 w aspiracie z dróg oddechowych jest znamiennie mniejsze lub niewykrywalne w porównaniu do noworodków wentylowanych mechanicznie, u których nie obserwowano rozwoju BPD. Wyniki te potwierdzili Craig i wsp., którzy ponadto zaobserwowali u dzieci z BPD zwiększone stężenia IL-8 (51). Lienicke i wsp. oceniali seryjnie (1., 3., 5. i 7. dż) stężenia TNFα stwierdzając znamienne zwiększenie stężeń cytokiny począwszy od 3 doby życia u wcześniaków z BPD (71). W materiale własnym porównano dzieci, które w momencie pobrania krwi do badań były wentylowane mechanicznie oraz noworodki oddychające spontanicznie. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach cytokin pomiędzy tymi grupami. Stężenia cytokin oceniane były jednakże w surowicy oraz większość oznaczeń dokonana została w 1. dobie życia dziecka, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Drugim testowanym elementem była ocena zależności pomiędzy wiekiem kalendarzowym dziecka a obserwowanymi stężeniami cytokin. Analiza taka możliwa była tylko wśród noworodków włączonych do grupy kontrolnej. W omawianym materiale stężenia IL-6, IL-10, TNFα nie zależały od wieku kalendarzowego noworodków z małą urodzeniową masą ciała. Zależności pomiędzy wiekiem kalendarzowym a stężeniem IL-6 nie stwierdzili także Doellner i wsp. (24). Kuster i wsp. oceniali stężenia IL-1ra, IL-6 oraz cICAM-1 u 20 wcześniaków bez objawów

infekcji. Stężenia badanych cytokin nie zależały od wieku kalendarzowego dzieci. Z drugiej jednak strony w badaniach prowadzonych przez Blanco i wsp. (11) zaobserwowano, że stężenie IL-10 zmniejsza się proporcjonalnie do wieku kalendarzowego dziecka. Autorzy wysunęli hipotezę, że większe stężenia IL-10 obserwowane u wcześniaków w pierwszych dniach życia związane są ze zwiększonym stężeniem mediatorów „stresu" uwolnionych w czasie porodu przedwczesnego. Dane te nie znalazły potwierdzenia w kolejnych badaniach opublikowanych przez Romagnoliego i wsp.(103). W cytowanej prac brak było korelacji zarówno pomiędzy wiekiem kalendarzowym i stężeniem IL-6 jak i stężeniem IL-10.

Wyniki prezentowanego badania potwierdziły hipotezę, że uwalnianie cytokin u dzieci z posocznicą jest znamiennie większe niż u wcześniaków bez objawów uogólnionego zakażenia. Stężenia IL-6, IL-10 i TNFα wśród noworodków z posocznicą, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej jak i grupy dzieci z niepokojącymi objawami klinicznymi i ujemnym posiewem krwi były kilkakrotnie większe. Obserwacje te są w pełni zgodne z wynikami badań dostępnych w piśmiennictwie (16;21;24;37;68;82;94;97;103;110). Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w stężeniach IL-6, IL-10, TNFα pomiędzy grupą kontrolną a grupą dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi. Zakres uzyskanych stężeń w grupie dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu z krwi był bardzo duży. Wiązało się to najprawdopodobniej z kryteriami kwalifikacji dzieci do tej grupy tj. występowania każdych niepokojących objawów klinicznych. W praktyce do grupy tej kwalifikowano zarówno noworodki z łagodnymi objawami nietolerancji karmienia jak i dzieci z pogorszeniem parametrów wentylacji, zaburzeniami metabolicznymi czy też zlokalizowanymi zakażeniami (zapalenie płuc). Podobne wyniki uzyskali Doellner i wsp. (24). W dyskusji zwrócili uwagę, że związane to mogło być z faktem kwalifikacji do badania dzieci z łagodnymi i umiarkowanymi objawami klinicznymi, zazwyczaj prowadzonej w godzinach wieczornych przez młodych, niedoświadczonych lekarzy. Buck i wsp. ocenili, że stężenia IL-6 są większe niż u zdrowych noworodków, tylko u 45% dzieci badanych z powodu podejrzenia zakażenia, u których następnie wynik posiewu z krwi był ujemny. Mimo że, w materiale własnym nie stwierdzono różnic w stężeniach cytokin pomiędzy grupą z objawami klinicznymi i ujemnym posiewem z krwi a grupą kontrolną najprawdopodobniej również w przypadku lokalnego charakteru zaburzeń uwalnianie cytokin zarówno pro jak i przeciwzapalnych jest zwiększone. Romagnoli i wsp. (103) stwierdzili, że stężenia IL-6

i IL-10 w grupie wcześniaków z zapaleniem płuc są kilkakrotnie większe niż wśród noworodków z grupy kontrolnej.

Wyniki pracy wskazują także, że niezwykle istotnym czynnikiem wpływającym na uwalnianie cytokin jest etiologia zakażenia. Stężenie IL-6 było znamiennie większe wśród noworodków z posocznicą Gram ujemną w porównaniu do dzieci z posocznicą Gram dodatnią lub posocznicą grzybiczą. Stężenie IL-10 było także większe wśród dzieci z posocznicą Gram ujemną niż wśród dzieci z posocznicą grzybiczą lub posocznicą Gram dodatnią. W piśmiennictwie brak jest danych porównujących uwalnianie cytokin w zależności od etiologii posocznicy.

W prezentowanej pracy przeprowadzono także ocenę stężenia cytokin w podgrupach noworodków z posocznicą o różnym przebiegu klinicznym. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że uwalnianie IL-6, IL-10 i TNFα koreluje z nasileniem posocznicy – obserwowane stężenia IL-6, IL-10 i TNFα były większe w grupie noworodków z posocznicą o ciężkim przebiegu w porównaniu do dzieci z posocznicą o umiarkowanym przebiegu. Najwyższe stężenia IL-6 oraz IL-10 stwierdzono u dzieci, które zmarły z powodu posocznicy. Wyniki te są zgodne z obserwacjami przedstawionymi przez Damasa i wsp. (20). Autorzy ocenili uwalnianie IL-6, IL-8 i TNFα u 53 dorosłych przyjmowanych do oddziału intensywnej terapii z powodu posocznicy. Stosując skalę APACHE II stwierdzili bardzo silną korelację pomiędzy nasileniem objawów klinicznych a stężeniami cytokin. Podobne wyniki u dzieci przedstawili Hatherill i wsp. (41). Potwierdzeniem tej zależności są również obserwacje Sulivana i wsp. - stężenia IL-6 u dzieci, które zmarły z powodu posocznicy były znamiennie większe niż u dzieci, które zostały wyleczone (114). W piśmiennictwie jednakże mało jest wiarygodnych danych na temat takiej korelacji u noworodków. Romagnoli i wsp. w swojej pracy zaobserwowali, że stężenia zarówno IL-6 jak i IL-10 u wcześniaków, które zmarły z powodu posocznicy nie były znacząco większe niż wartości stwierdzone u noworodków, które przeżyły (103).

W czasie trwania badania objawy nietolerancji karmienia rozpoznano u 23 noworodków tj. 25,8% badanej populacji. Podobną częstość występowania nietolerancji karmienia u noworodków z bardzo niską masą ciała odnotowali także La Gamma i wsp. (25%) (60). Wilson i wsp. porównując różne strategie żywienia enteralnego wcześniaków, stwierdzili natomiast, że objawy takie jak powiększenie obwodu brzuszka czy też zalegania żołądkowe występują w pierwszych 2 tygodniach życia u od 27% do 63% noworodków z bardzo niską masą ciała (120). W prezentowanej pracy

potwierdzono, że najistotniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia nietolerancji karmienia jest niedojrzałość noworodka - urodzeniowa masa ciała dzieci z objawami nietolerancji karmienia była średnio o 275 g mniejsza w porównaniu do grupy dzieci bez objawów nietolerancji karmienia. Oceniając uwalnianie cytokin u dzieci z objawami nietolerancji karmienia i NEC jednym z istotnych problemów jest ustalenie związku tych objawów z posocznicą. W przedstawianej pracy u 16/23 (70%) dzieci posiew z krwi pobrany w momencie wystąpienia objawów nietolerancji karmienia był dodatni. W badaniu Edelsona i wsp. (25) posocznicę rozpoznano tylko u 25% dzieci z NEC. Gupta i wsp. (38) oceniają, że bakteriemia występuje u od 10 do 50% dzieci z NEC. Wydaje się, że duża częstość posocznicy w materiale własnym może być związana z faktem, że objawy NEC lub nietolerancji karmienia były wtórne do posocznicy.

W porównaniu do grupy kontrolnej u dzieci z objawami nietolerancji karmienia stwierdzono znamiennie wyższe stężenia IL-6 i IL-10. Jednakże, jak już wspomniano powyżej, dlatego iż u 70% dzieci objawy nietolerancji karmienia towarzyszyły posocznicy. Dodatkowo przeprowadzono analizę w dwóch podgrupach noworodków: bez objawów posocznicy i z objawami posocznicy. Stwierdzono, że stężenia ocenianych cytokin są znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie u dzieci, u których przy występowaniu objawów nietolerancji karmienia uzyskano dodatni wynik posiewu z krwi. Podobne wyniki uzyskali Edelson i wsp (25). Autorzy zaobserwowali, że u dzieci bez posocznicy z objawami NEC I lub II stopnia stężenia IL-6 i IL-10 są prawidłowe. Harris i wsp. (40) porównali 3 grupy dzieci: 1) z objawami NEC i współistniejącą posocznicą, 2) z objawami NEC bez posocznicy i 3) kontrolną. Stężenia IL-6 i TNFα były znamiennie większe tylko w grupie z objawami uogólnionego zakażenia. W świetle powyższych obserwacji niezwykle istotne są wyniki badań oceniających korelację pomiędzy uwalnianiem cytokin a ciężkością NEC. Aktualnie mało jest wiarygodnych badań na ten temat. Jedynie Edelson i wsp. (25) podjęli się takiej próby oceniając uwalnianie IL-1b, IL-8, IL-10 u 12 noworodków z NEC I stopnia, 18 noworodków z NEC II stopnia oraz 6 noworodków z NEC III stopnia. Autorzy odnotowali, że stężenia cytokin w przypadku NEC I stopnia i NEC II stopnia są nie znamiennie większe od stężeń obserwowanych u zdrowych dzieci, natomiast stężenia cytokin w przypadku NEC III stopnia są od kilku do kilkunastu razy większe w porównaniu do pozostałych grup. Podobne wyniki uzyskano, gdy uwzględniono jako zmienną dodatkową fakt występowania posocznicy. W materiale

własnym ze względu na małą liczbę dzieci z zaawansowanym stadium NEC (tylko u 2 noworodków rozpoznano NEC III stopnia) nie przeprowadzono powyższej analizy. Można, zatem przypuszczać, że stwierdzenie zwiększonego stężenia cytokin u noworodków z objawami nietolerancji karmienia świadczy albo o istnieniu uogólnionego zakażenia lub nasilonego procesu martwiczego w jelitach.

Kolejną istotną obserwacją w prezentowanej pracy jest stwierdzenie statystycznej zależności pomiędzy stężeniami badanych cytokin. Korelacje istniały zarówno w grupie dzieci z potwierdzoną posocznicą jak również wśród dzieci z objawami nietolerancji karmienia i NEC. Wyniki powyższe potwierdzają wcześniejsze obserwacje uzyskane w badaniach in vitro (107). Korelację pomiędzy stężeniami IL-6 i IL-10 u noworodków z posocznicą przedstawili także badacze włoscy (103). Można przyjąć zatem, że uwalnianie cytokin pro i przeciwzapalnych u wcześniaków jest proporcjonalne i odrzucić wcześniejsze hipotezy, że jedną z przyczyn zwiększonej podatności na zakażenia noworodków urodzonych przedwcześnie jest dysproporcja pomiędzy dojrzałością odpowiedzi pro i przeciwzapalnej (119). Najprawdopodobniej proporcjonalne uwalnianie cytokin pro i przeciwzapalnych wynika z faktu, że czynniki inicjujące produkcję obu grup mediatorów są podobne.

Niezwykle istotnym z praktycznego punktu widzenia jest ocena dynamiki uwalniania cytokin. W prezentowanej pracy badania kontrolne wykonywano po 48-96 godzinach od rozpoznania. Z powodów etycznych zrezygnowano z seryjnego oznaczania cytokin co 6-24 godzin. Dostępne wyniki badań u dorosłych wskazują, że zarówno TNFα, IL-6, jak i IL-10 są cytokinami wczesnej fazy odpowiedzi zapalnej. IL-6 uwalniana jest po około 3 godzin od zadziałania bodźca, natomiast TNFα już po około 1 godzinie. Także okresy półtrwania tych cytokin są krótkie i wynoszą odpowiednio 6 i 3 godziny (2). Uwalnianie IL-10 w stosunku do TNFα jest opóźnione, a jej utrzymywanie się w krążeniu jest dłuższe (103). Buck i wsp. (14) zaobserwowali, że tylko u 33% noworodków donoszonych utrzymuje się zwiększone stężenie IL-6 po 24 godzinach od rozpoznania posocznicy. Odmienne wyniki przedstawili Harris i wsp. (40). W badaniu, którym objęto 18 noworodków urodzonych w 24-40 tyg. ciąży zwiększone stężenia IL-6 utrzymywały się przez około 48 godzin, natomiast stężenie TNFα przy rozpoznaniu posocznicy było w normie i zwiększało się dopiero po 24 godzinach. Z tego punktu widzenia niezwykle istotnymi są wyniki opublikowane przez Kustera i wsp. (58). Autorzy seryjnie mierzyli u noworodków w pierwszym miesiącu życia stężenia IL-6, IL-1ra oraz cICAM-1 i stwierdzili, że zwiększenie stężenia IL-6

obserwowane jest już na 2 dni przed wystąpieniem objawów posocznicy. Aktualnie, przyjmuje się więc, że oznaczanie stężenia cytokin może być użyteczne we wczesnej diagnostyce posocznicy jedynie, jeżeli krew do badania pobrana jest w momencie wystąpienia pierwszych objawów klinicznych.

W prezentowanym badaniu stwierdzono istotne różnice pomiędzy stężeniami IL-6 i IL-10 w dwóch kolejnych badaniach. U 13 noworodków zaobserwowano zwiększenie stężeń IL-10, a u 17 dzieci zmniejszenie stężeń IL-10. Podobnie stężenie IL-6 zwiększyło się po 48-96 godzinach u 12 dzieci, a zmniejszyło u 18 dzieci. Najistotniejszym czynnikiem różnicującym dzieci, u których obserwowano zwiększenie stężeń IL-6 i IL-10 od noworodków, u których stężenia cytokin zmniejszyły się był fakt utrzymywania się objawów posocznicy oraz wynik kontrolnego posiewu z krwi. U wszystkich dzieci, u których kontrolny wynik posiewu z krwi po 48-96 godzinach od pierwszego badania był ujemny zaobserwowano znamienne zmniejszenie stężeń cytokin. Podobne obserwacje przedstawili Groll i wsp. (37) oraz Kantar i wsp. (54). Powrót stężenia IL-6 do wartości prawidłowych u noworodków, u których leczenie posocznicy było skuteczne opisali natomiast Panero i wsp. (97). Wyniki badań Ramognoli i wsp. (103) wskazują natomiast, że seryjne oznaczanie stężeń IL-6 lub IL-10 posiada dużą wartość predykcyjną i pozwala wyodrębnić grupę noworodków o niepomyślnym rokowaniu.

Podsumowując wyniki badań własnych i przegląd piśmiennictwa można stwierdzić, że uwalnianie cytokin (IL-6, IL-10, TNFα) u noworodków z bardzo niską masą ciała:

1. nie zależy od dojrzałości noworodka, ani od wieku kalendarzowego dziecka
2. zależy od rodzaju czynnika wyzwalającego reakcję zapalną – największe stężenia cytokin odnotowywane są u dzieci z uogólnionym zakażeniem wywołanym przez bakterie Gram ujemne lub u dzieci z III stopnia martwiczym zapaleniem jelit
3. wykazuje korelacje z ciężkością choroby

Ocena uwalniania prokalcytoniny u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała.

Pierwszym etapem oceny uwalniania prokalcytoniny u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała była ocena wpływu dojrzałości dziecka - zaobserwowano zależność pomiędzy wiekiem płodowym a stężeniem prokalcytoniny. Inne wyniki przedstawili Chiesa i wsp. (19), którzy oceniali stężenia PCT u 156 noworodków donoszonych i 55 wcześniaków w wieku 0-3 dni. Autorzy stwierdzili, że jedynymi czynnikami wpływającymi na stężenie PCT jest wiek dziecka (godzina życia) oraz cukrzyca u matki w wywiadzie. Ponadto w cytowanej pracy przedstawiono godzinową ocenę dynamiki uwalniania PCT. Według autorów stężenie PCT zwiększa się od 12 godziny życia, osiągając maksimum około 24 godziny życia i następnie stopniowo zmniejsza się powracając do wartości porównywalnych dla niemowląt i dzieci starszych około 48-72 godziny życia. Mechanizm tego zjawiska, jego rola jak również czynniki modyfikujące jego przebieg jak dotychczas nie zostały wyjaśnione. Nawiązując do wyników tego badania również w materiale własnym przeprowadzono ocenę stężenia PCT w zależności od wieku kalendarzowego. Niemożliwa, jednakże była analiza korelacji pomiędzy stężeniami PCT a wiekiem dziecka w pierwszych 3 dniach życia, gdyż w czasie trwania badania nie odnotowywano dokładnej godziny pobrania krwi. Wykazano jedynie, że stężenie PCT było znacząco większe w pierwszym oznaczaniu (1.-3. dż.) niż w kolejnych badaniach. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami opublikowanymi przez (88) Monnereta i wsp., którzy stwierdzili, że zarówno u noworodków donoszonych jak i u wcześniaków w pierwszym dniu życia stężenie PCT jest znamiennie większe niż w kolejnych dobach. Biorąc pod uwagę fakt, że w materiale własnym wiek chronologiczny przy przyjęciu noworodków skrajnie niedojrzałych był niższy, można przypuszczać, że stwierdzana korelacja między wiekiem płodowym a stężeniami PCT może być zafałszowana właśnie przez wiek kalendarzowy w momencie wykonania badania. Jednakże, obserwacje powyższe mają istotne konsekwencje kliniczne. Interpretacja wyników PCT musi odnosić się do wieku dziecka, a w pierwszych 3 dniach życia do dokładnej godziny życia noworodka.

Ze względu na zmianę stężeń PCT w zależności od wieku kalendarzowego, wyniki oznaczeń uzyskanych u dzieci z kohorty kontrolnej podzielono na 2 grupy: wyniki oznaczeń wykonanych w 1-3 dż. dziecka oraz wykonanych w 10-30 dż. dziecka. Wykazano, że stężenie PCT u noworodków z posocznicą jest znamiennie większe w

porównaniu do stężeń PCT uzyskanych u dzieci z grupy kontrolnej w wieku 10-30 dni. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w stężeniu PCT pomiędzy grupą kontrolną a grupą dzieci z objawami choroby i ujemnym wynikiem posiewu krwi. Dane te są zgodne z wynikami przedstawianymi w piśmiennictwie (19;22;41;88).

Następnym etapem analizy było porównanie stężenia PCT w podgrupach dzieci wyróżnionych ze względu na etiologię posocznicy. Stężenia PCT były największe wśród dzieci z posocznicą Gram ujemną i co istotne klinicznie stężenie PCT było znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie właśnie u dzieci z posocznicą Gram ujemną. Na podobną zależność zwracają uwagę również Chiesa i wsp., którzy stwierdzili, że stężenia PCT u dzieci z posocznicą wywołaną koagulazoujemnymi gronkowcami są znamiennie mniejsze niż w przypadku zakażeń innymi drobnoustrojami (19). W badaniach, którymi objęto dorosłych (22) oraz dzieci (41) wykazano, że najistotniejszym czynnikiem mającym związek ze stężeniem PCT jest nasilenie objawów choroby, a nie etiologia zjawiska. De Werra i wsp. (22) stwierdzili zwiększone stężenia PCT tylko u chorych z objawami wstrząsu septycznego, natomiast wśród osób z objawami posocznicy bez wstrząsu lub zapalenia płuc stężenia były w normie. Ze względu na małą liczbę wykonanych oznaczeń analiza statystyczna związku stężenia PCT z przebiegiem klinicznym w materiale własnym nie była możliwa, jednak zaobserwowano, że żadne dziecko, u które stężenie PCT wynosiło mniej niż 1,4 ng/ml nie zmarło, co może sugerować istnienie takiej korelacji. Dodatkowo stwierdzono, że stężenia PCT po 48-96 godzinach od rozpoznania posocznicy są wprawdzie nie znamiennie, ale mniejsze od stężeń oznaczonych przy wystąpieniu pierwszych objawów. Najprawdopodobniej wiązało się to z faktem, że przeważającą grupą dzieci wśród noworodków z objawami posocznicy byli chorzy z posocznicą wywołaną przez gronkowce koagulazoujemne, u których początkowe wartości PCT były małe.

Warto podkreślić, że mechanizm uwalniania i rola PCT w posocznicy nie są wyjaśnione. Z klinicznego punktu widzenia istotne wydają się być wyniki badań in vitro, w których wykazano, że podanie PCT dwukrotnie zwiększa śmiertelność zwierząt z posocznicą (43% vs 93% zwierząt zmarło). Efekt ten można było zahamować przez podanie surowicy zawierającej przeciwciała przeciwko prokalcytoninie (93). Wyniki tego eksperymentu wskazują, że rola PCT w posocznicy u dzieci może być bardzo istotna, wymagane są jednak dalsze badania kliniczne.

W przedstawianym badaniu wykazano, że stężenia PCT są znamiennie większe u noworodków z objawami nietolerancji karmienia/NEC niż u dzieci z grupy kontrolnej. Jednak, podobnie jak w przypadku cytokin, szczegółowa ocena w podgrupach wyróżnionych ze względu na występowanie lub brak objawów posocznicy, wykazała, że stężenia PCT są znamiennie większe w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie u dzieci, u których przy występowaniu objawów nietolerancji karmienia uzyskano dodatni wynik posiewu z krwi. Wyniki te sugerują, że przydatność kliniczna oznaczania PCT u noworodków z objawami nietolerancji karmienia jest mała.

Inną istotną obserwacją jest stwierdzenie braku korelacji PCT z innymi cytokinami (jedynie wykazano dodatnią korelację z TNFα). Wytłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, że u większości badanych dzieci nasilenie kliniczne objawów posocznicy było umiarkowane i przez to nie dochodziło do uwalniania PCT, do którego najprawdopodobniej wymagane jest zadziałanie silniejszego bodźca niż do uwalniania IL-6 lub IL-10.

Podsumowując należy przyjąć, że uwalnianie PCT:

1. zależy od wieku kalendarzowego dziecka
2. jest zwiększone u dzieci z nasilonymi objawami klinicznymi posocznicy lub martwiczego zapalenia jelit (posocznica o ciężkim przebiegu, posocznica o etiologii Gram ujemnej)

Ocena obecności lipopolysacharydu (LPS) we krwi noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała.

Ocena obecności LPS od wielu lat wykorzystywana jest do testowania jałowości płynów stosowanych do iniekcji, odczynników laboratoryjnych oraz w badaniach eksperymentalnych in vitro (45). Pierwszym wykorzystaniem w warunkach klinicznych było oznaczanie LPS u dorosłych po zabiegach chirurgicznych obejmujących jelita (69). W 1985 roku Schiefele i wsp. opisali zwiększone stężenia endotoksyny w stolcu wcześniaków w pierwszych dniach karmienia dojelitowego (106). Kolejne prace oceniające występowanie endotoksynemii u wcześniaków przeprowadzone zostały w latach 90-tych. Jednakże ich wyniki były bardzo rozbieżne – częstość endotoksynemii wśród „bezobjawowych" wcześniaków oceniana była od 2% do 40% (77;117). W materiale własnym dodatni wynik - obecności LPS -stwierdzono w 19/105 (18%)

losowo pobranych w 1. miesiącu życia próbkach krwi od noworodków bez żadnych niepokojących objawów klinicznych. Obecność LPS we krwi występowała dwa razy częściej wśród dzieci z objawami nietolerancji karmienia. Obserwowane stężenia LPS u dzieci z nietolerancją karmienia były znacząco większe w porównaniu do stężeń u dzieci z grupy kontrolnej. Uwzględnienie wyniku posiewu z krwi nie zmieniło uzyskanych wyników. Nie wykazano natomiast różnic co do wielkości stężeń LPS pomiędzy grupą dzieci z posocznicą i grupą kontrolną. Interpretując powyższy wynik należy pamiętać, że w grupie dzieci z posocznicą zakażenie bakteriami Gram ujemnymi było przyczyną choroby tylko u 7 (15%) noworodków. Interesującym natomiast jest wykazanie korelacji pomiędzy stężeniami LPS a IL-6 i IL-10. Obserwacja ta może potwierdzać, że obecność LPS we krwi wykazana testem diagnostycznym nie jest zjawiskiem przypadkowym lecz istotnym klinicznie, gdyż wywołuje wprost proporcjonalną do stężenia LPS odpowiedź cytokinową.

Można, zatem przyjąć, że w przypadku nietolerancji karmienia dochodzi do zwiększenia przepuszczalności bariery jelitowej i bakterie Gram ujemne znajdujące się w przewodzie pokarmowym mogą wnikać do krwi dziecka. Uzyskane wyniki nie pozwalając jednoznacznie ocenić użyteczności klinicznej oznaczania LPS u wcześniaków i wskazują na potrzebę kontynuacji badań. Poznanie roli LPS u noworodków w warunkach in vivo może także pomóc w opracowaniu skutecznych metod leczenia (74).

Ocena odsetka komórek $CD14^+$ u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała.

Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że receptor CD14 znajdujący się na powierzchni komórek jednojądrzastych krwi odgrywa kluczową rolę w patofizjologii posocznicy Gram ujemnej (42;108). Udział receptora CD14 w odpowiedzi na zakażenie bakteriami Gram (+) nie jest tak jednoznaczny (42). W piśmiennictwie brak jest wiarygodnych danych na temat ekspresji receptora CD14 u noworodków z bardzo małą masą ciała. W prezentowanej pracy wykazano, że ekspresja receptora CD14 nie korelowała ani z wiekiem płodowym ani z urodzeniową masą ciała badanych noworodków. Nie stwierdzono również wpływu na ekspresję receptora CD14 czynników takich jak: mechaniczna wentylacja, zamartwica, krwawienie

śródczaszkowe. Odsetek komórek $CD14^+$ nie zależał od wieku kalendarzowego noworodków z małą urodzeniową masą ciała. Stwierdzono natomiast nieznaczne zwiększenie odsetka komórek $CD14^+$ u dzieci z objawami uogólnionego zakażenia. Wyniki te są sprzeczne z danymi uzyskanymi z doświadczeń in vitro, w których stymulacja monocytów LPS powodowała zmniejszenie liczby komórek jednojądrzastych $CD14^+$ (44). Ingalls i wsp. wysunęli hipotezę, że w czasie odpowiedzi na antygen (LPS) dochodzi do „zrzucania" receptorów CD14 z powierzchni monocytów. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być wyniki Blanco i wsp., którzy wykazali zwiększone stężenia rozpuszczalnej frakcji receptora CD14 u noworodków z objawami zarówno posocznicy Gram ujemnej jak i Gram dodatniej. Prezentowane badanie wskazuje, że (prawdopodobnie ze względu na złożoność zjawiska) ocena odsetka komórek $CD14^+$ nie jest, na obecnym etapie wiedzy, testem użytecznym w praktyce klinicznej.

Ocena przydatności klinicznej oznaczania wybranych cytokin i prokalcytoniny u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała.

W ostatnich latach oznaczanie cytokin jest coraz częściej stosowaną metodą diagnostyczną. Wiąże się to zarówno z poznaniem fizjologii i patofizjologii cytokin w ustroju człowieka, jak również z większą dostępnością testów diagnostycznych (zmniejszenie kosztów zakupu odczynników, możliwość oznaczania wybranych cytokin przy łóżku chorego). Klasycznym zastosowaniem oznaczania cytokin w perinatologii jest diagnostyka porodu przedwczesnego. El-Bastawissi i wsp. opublikowali w 2000 roku meta analizę, której wyniki wskazują, że oznaczanie IL-6 w płynie owodniowym jest wiarygodnym wskaźnikiem diagnostycznym porodu przedwczesnego bez względu na stan infekcyjny kobiety ciężarnej (26). W okresie noworodkowym najwięcej uwagi poświęca się zastosowaniu oznaczeń cytokin w diagnostyce posocznicy. Badania koncentrują się w dwóch kierunkach: użyteczności w rozpoznawaniu posocznicy o wczesnym początku oraz rozpoznawaniu posocznicy o późnym początku. W pierwszym przypadku oceniane może być stężenie cytokin w krwi pępowinowej lub krwi noworodka. Oznaczanie stężenia cytokin w krwi pępowinowej, ze względu na łatwość

uzyskania krwi do badań budziło zainteresowanie badaczy od wielu lat. Obiecujące wyniki dotyczącego tego zagadnienia opublikowali m.in. Lehrnbecher i wsp.(68). Autorzy oceniali stężenia IL-6 oraz IL-6R stwierdzając, że stężenie IL-6>150 pg/ml pozwala z czułością 69% i swoistością 91% rozpoznać zakażenie. Stężenia większej liczby cytokin (IL-1b, IL-6, IL-8, G-CSF) w krwi pępowinowej oceniali w ostatnio opublikowanej pracy Buscher i wsp.(16). Na podstawie uzyskanych danych wysunięto wniosek, że jedynie oznaczanie IL-6 (stężenie>15 ng/ml!) może być użyteczne, ale charakteryzuje się małą wiarygodnością (czułość 57%, swoistość 69%). Większą wiarygodność w rozpoznawaniu posocznicy o wczesnym początku wykazuje oznaczanie stężenia cytokin w krwi noworodka. Najczęściej ocenianą cytokiną była IL-6. Wiarygodność tego testu według różnych autorów wynosi: czułość od 78% do 100%, swoistość od 71% do 100%, PPV od 40% do 67%, NPV od 78% do 97%, jednakże punkty graniczne wyliczone w tych badaniach różniły się znacząco (15-200 ng/ml) (24;82;97;110). Innymi ocenianymi w badaniach obejmujących noworodki cytokinami były TNFα, IL-1β, rozpuszczalne receptory dla TNFα, jednak wiarygodność tych testów jest mniejsza niż IL-6.

Jednym z celów prezentowanego badania była ocena wiarygodności oznaczania wybranych cytokin w diagnostyce posocznicy o późnym początku. Wykazano, że badane grupy różniły się istotnie pod względem obserwowanych stężeń IL-6, IL-10, TNFα i PCT jak również liczby płytek krwi i wskaźnika I/T granulocytów. W związku z tym dokonano oceny przydatności klinicznej wymienionych badań laboratoryjnych. Oceniono przydatność diagnostyczną oraz rokowniczą. Przydatność diagnostyczną rozważano w 2 płaszczyznach - rozróżnienia pomiędzy noworodkami bez niepokojących objawów (grupa kontrolna) a dziećmi chorymi oraz wyróżnienia wśród noworodków z niepokojącymi objawami dzieci z posocznicą. W przypadku diagnostyki posocznicy u noworodków za użyteczny klinicznie można uznać test charakteryzujący się dużą czułością oraz dużą wartością predykcji ujemnej, co oznacza, że nie „pominie się" dziecka chorego. Pod tym względem badaniem najlepiej rozróżniającym noworodkami chore od dzieci z grupy kontrolnej było oznaczanie stężenia IL-10 (NPV=82%) oraz IL-6 (NPV=80%). Spośród standardowych badań największą wartość wykazywało stwierdzenie wskaźnika I/T granulocytów > 0,2. Najmniejszą wartość diagnostyczną posiadało oznaczanie liczby płytek krwi, TNFα i PCT. Podobne wyniki uzyskano oceniając przydatność testów w rozpoznawaniu posocznicy wśród dzieci z niepokojącymi objawami (największą wiarygodnością charakteryzowały się oznaczenia

IL-10 (czułość-79%) i IL-6 (czułość-77%). Testy takie jak liczba płytek krwi, I/T oraz PCT charakteryzowały się małą czułością (47-54%). Prezentowane dane, za wyjątkiem oceny wiarygodności PCT są zgodne z prezentowanymi w piśmiennictwie. Wiarygodność oznaczania IL-6 w zależności od doboru chorych (noworodki donoszone vs wcześniaki, szpital uniwersytecki vs szpital miejski) oceniana jest na 73-89% a NPV na 80-91% (14;21;81;92;94). Podobną wiarygodnością charakteryzuje się oznaczanie TNFα (czułość-80-82%, NPV-85%) (21;92) lub rozpuszczalnego receptora dla IL-2 (czułość-71%, NPV-87%) (113). Ogólnie oceniając, oznaczanie stężeń cytokin charakteryzuje się większą wiarygodnością od standardowo wykonywanych badań (leukocytoza, liczba płytek krwi, I/T, CRP), jednak nadal wiarygodność pojedynczego testu nie jest zadawalająca. Aktualnie, aby poprawić prawdopodobieństwo postawienia właściwej diagnozy proponuje się łączne rozpatrywanie wyników co najmniej 2 badań. W piśmiennictwie najczęściej polecane jest jednoczasowe oznaczanie IL-6 oraz CRP. Wiąże się to z faktem, że CRP jest białkiem uwalnianym pod wpływem IL-6 i stwierdzane jest w krwioobiegu zazwyczaj po 24 godzinach od rozpoczęcia reakcji zapalnej. Wg Ng i wsp. taka łączną ocena IL-6 i CRP pozwala rozpoznać posocznicę z czułością wynoszącą 93% (NPV-95%) (92).

Istotnym elementem prezentowanej pracy jest ocena przydatności rokowniczej wybranych badań laboratoryjnych, co jak dotychczas nie było jeszcze przedmiotem badań, w których brały udział noworodki z bardzo niską masą ciała. Za przydatne klinicznie przyjęto możliwość przewidzenia niepomyślnego rokowania (zgonu dziecka) na podstawie wyniku badania pobranego w momencie początku choroby. Jak przedstawiono powyżej stwierdzono istotne różnice wartości obserwowanych stężeń IL-6, IL-10, TNFα i PCT w zależności od przebiegu klinicznego posocznicy. Prezentowane wyniki wskazują, że wyróżnienia noworodków, które zmarły w przebiegu posocznicy można dokonać na podstawie oznaczenia IL-10 oraz PCT. Stwierdzenie stężenia IL-10 >680 pg/ml charakteryzowało się wartością predykcyjną dodatnią wynoszącą 100%, co oznaczało, że każdy noworodek, u którego stwierdzono tak duże stężenia IL-10 zmarł. Podobną korelację pomiędzy stężeniami IL-10 a ryzykiem zgonu u starszych dzieci z posocznicą przedstawili Sulivan i wsp (114). Przeciwnie do oznaczenia IL-10, pomiar PCT umożliwiał wyróżnienie dzieci o pomyślnym rokowaniu (żadne dziecko, u którego stwierdzono stężenie PCT <1,4 ng/ml nie zmarło). Należy zauważyć, że zgodne z prezentowanymi wyniki odnoście wartości predykcyjnej PCT u dzieci w wieku od 1 miesiąca do 16 lat przedstawili Hatherill i wsp

(41). Inne testy takie jak liczba leukocytów i płytek krwi obwodowej, wskaźnik I/T granulocytów, stężenie IL-6, TNFα charakteryzowały się dużą wartością predykcyjną ujemną (94-100%), jednakże ich wartość predykcyjna dodatnia była mała (18-50%).

Inne podejście do wartości oznaczania cytokin przedstawili Franz i wsp. (28). Autorzy w przypadku podejrzenia posocznicy dzieci losowo przydzielali do jednej z 2 grup, w których o rozpoczęciu antybiotykoterapii decydowano na podstawie: 1) objawów klinicznych lub 2) wyniku oznaczenia stężenie IL-8 oraz CRP przy łóżku chorego. Wyniki były zaskakujące – po pierwsze łączna ocena IL-8 i CRP wykazała zgodność z wynikiem posiewu krwi w 96% przypadków, a po drugie pozwoliła zmniejszyć stosowanie antybiotyku aż o 73%.

Przydatność kliniczna oznaczania cytokin w ostatnich latach stale wzrasta. Poza wartością diagnostyczną w rozpoznawaniu posocznicy oznaczanie cytokin wykorzystywane jest w badaniach nad patomechanizmem uszkodzenia centralnego układu nerwowego u wcześniaków (27;53) i noworodków donoszonych (95;104) jak również w badaniach dotyczących rozwoju dysplazji oskrzelowo-płucnej (51;70;76). Lepsze zrozumienie mechanizmów immunologicznych pozwala również wprowadzać skuteczniejsze metody leczenia posocznicy (23). Takim przykładem jest wykorzystanie pentoksyfiliny w leczeniu posocznicy u noworodków (63;67). Poznanie roli cytokin pozwoliło również na ich wykorzystanie w praktyce klinicznej. Przykładem takiego zastosowania jest leczenie posocznicy noworodkowej przebiegającej z leukopenią za pomocą rekombinowanych preparatów czynników wzrostowych G-CSF i GM-CSF (6;10;87).

7. Weryfikacja hipotez

1. Uzyskane wyniki pozwalają przyjąć hipotezę, że stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL-6, IL-10, prokalcytoniny, TNFα, jak również ekspresja receptora CD14 nie zależą od wieku płodowego oraz masy ciała noworodka.
2. Uzyskane wyniki pozwalają przyjąć hipotezę, że stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL-6, IL-10, TNFα, jak również ekspresja receptora CD14 nie zależą od wieku kalendarzowego dziecka
3. Uzyskane wyniki pozwalają odrzucić hipotezę, że stężenia w surowicy prokalcytoniny nie zależy od wieku kalendarzowego dziecka
4. Uzyskane wyniki pozwalają odrzucić hipotezę, że stężenia w surowicy LPS oraz cytokin: IL-6, IL-10, prokalcytoniny, TNFα u noworodków z objawami uogólnionego zakażenia lub martwiczego zapalenia jelit nie różnią się od stężeń obserwowanych u dzieci bez objawów infekcji.

8. Wnioski

1. Oznaczanie stężeń cytokin (IL-6, IL-10, TNFα) oraz prokalcytoniny charakteryzuje się większą wiarygodnością w rozpoznawaniu posocznicy lub martwiczego zapalenia jelit od standardowo wykonywanych badań (leukocytoza, liczba płytek krwi, I/T, CRP). Ze względu na fakt, że wiarygodność pojedynczego testu nie jest zadawalająca, wskazane jest łączne oznaczanie co najmniej 2 parametrów, dzięki czemu można uzyskać poprawę wiarygodności.

2. Oznaczanie cytokin (zwłaszcza IL-10) charakteryzuje się dużą wartością prognostyczną i pozwala wyróżnić noworodki o złym rokowaniu przez co wykonywanie powyższych oznaczeń może być użyteczne w praktyce klinicznej.

9. Streszczenie

Wprowadzenie: Posocznica i martwicze zapalenie jelit są niezwykle istotnymi problemami okresu noworodkowego ze względu na dużą częstość występowania oraz mimo postępu, na nadal utrzymującą się dużą śmiertelność i ryzyko innych odległych następstw. Początkowe objawy obu chorób mogą być dyskretne i nieswoiste, co może opóźniać postawienie właściwej diagnozy. Obecnie istniejące metody laboratoryjne nie są wystarczająco jednoznaczne w bardzo wczesnym rozpoznawaniu posocznicy i poszukuje się metod bardziej wiarygodnych. Postęp w immunologii pozwolił na lepsze zrozumienie patomechanizmów reakcji zapalnej, przebiegu posocznicy i chorób jelit, jednakże informacje są wynikiem głównie eksperymentów in vitro lub badań u pacjentów dorosłych, dzieci i noworodków donoszonych. Ocena udziału cytokin w reakcji zapalnej u noworodków z bardzo niską masą ciała oraz możliwości wykorzystania oznaczania stężeń tych mediatorów w diagnostyce nie są jeszcze w pełni poznane.

Cel: Ocena uwalniania cytokin pro- i przeciwzapalnych u noworodków z bardzo niską urodzeniową masą ciała. Analiza użyteczności oznaczania wybranych cytokin w rozpoznawaniu oraz prognozowaniu przebiegu posocznicy i martwiczego zaplenia jelit.

Materiał i metody: Badaniem objęto 89 noworodków z bardzo małą urodzeniową masą ciała. 23 noworodki zakwalifikowano do grupy kontrolnej (brak objawów posocznicy lub nietolerancji karmienia), u 43 dzieci rozpoznano posocznicę o późnym początku, a pozostałe 23 noworodki zakwalifikowano do grupy z objawami chorobowymi (posocznicy lub nietolerancji karmienia), lecz bez potwierdzenia bakteriologicznego posocznicy. U wszystkich dzieci przy przyjęciu wykonano oznaczenia: morfologii krwi z obrazem białokrwinkowym, posiew krwi, stężeń LPS, PCT, IL-6 i IL-10 oraz TNFα U noworodków włączonych do grupy kontrolnej badania powtórzono w 10., 20. i 30. dobie życia. U dzieci z pozostałych grup powyższe badania wykonano w momencie wystąpienia niepokojących objawów choroby i celem oceny dynamiki choroby po 48-96 godzinach od postawienia wstępnego rozpoznania.

Wyniki: Uwalnianie cytokin (IL-6, IL-10, TNFα) u noworodków z bardzo niską masą ciała nie zależało od dojrzałości noworodka, ani od wieku kalendarzowego dziecka. Największe stężenia cytokin odnotowano są u dzieci z uogólnionym zakażeniem wywołanym przez bakterie Gram ujemne lub u dzieci z III stopnia martwiczym zapaleniem jelit. Stężenia cytokin korelowały z ciężkością posocznicy. Uwalnianie prokalcytoniny zależało od wieku kalendarzowego dziecka i było zwiększone jedynie u dzieci z nasilonymi objawami klinicznymi posocznicy o ciężkim przebiegu lub u dzieci z posocznicą o etiologii Gram ujemnej. Oznaczanie stężeń cytokin (IL-6, IL-10, TNFα) oraz prokalcytoniny charakteryzowało się większą wiarygodnością w rozpoznawaniu posocznicy lub martwiczego zapalenia jelit od standardowo wykonywanych badań (leukocytoza, liczba płytek krwi, I/T, CRP). Ponadto oznaczanie IL-10 pozwalało wyróżnić noworodki o złym rokowaniu. Obecność LPS we krwi występowała częściej wśród dzieci z objawami nietolerancji karmienia, a obserwowane stężenia LPS w tej grupie chorych były znacząco większe w porównaniu do stężeń u dzieci z grupy kontrolnej.

Wnioski: Uwalnianie cytokin u noworodków z bardzo niską masą ciała nie zależy od dojrzałości noworodka, lecz od czynnika wyzwalającego reakcję zapalną. Uwalnianie cytokin koreluje z ciężkością choroby i zatem posiada dużą wartość diagnostyczną i prognostyczną.

10. Piśmiennictwo

1. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: "Nutritional needs of low-birth-weight infants." Pediatrics 1985, 75; 976

2. Anderson, M. R., Blumer, J. L.: "Advances in the therapy of sepsis in children." Pediatr.Clin.North Am. 1997, 44; 179-186.

3. Armitage, P.: "Metody statystyczne w badaniach medycznych." Wyd. 1, PZWL Warszawa 1978,

4. Awasthi, S., Coalson, J. J., Yoder, B. A., Crouch, E., King, R. J.: "Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons." Am.J.Respir.Crit.Care Med. 2001, 163; 389-397.

5. Baumeister, F. A., Pohl-Koppe, A., Hofer, M., Kim, J. O., Weiss, M.: "IL-6 in CSF during ventriculitis in preterm infants with posthemorrhagic hydrocephalus." Infection 2000, 28; 234-236.

6. Bedford Russel, A. R.: "A trial of recombinant human granulocyte colony stimulating factor for the treatment of very low birthweight infants with presumed sepsis and neutropenia ." Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed 2001, 84; F172-F176.

7. Bellanti, J. A., Zeligs, B. J., Pung, Y. H.: "Immunology of the fetus and newborn." w: Neonatology: patophysiology and management of the newborn wyd. 5 pod red. Avery, G. B., Fletcher, M. A., MacDonald, M. G. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 1999, 1093-1122.

8. Berseth, C. L.: "Minimal enteral feeding." Clinics in Perinatology 1995, 22; 195-205.

9. Bessler, H., Mendel, C., Straussberg, R., Gurary, N., Aloni, D., Sirota, L.: "Effects of dexamethasone on IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha production by mononuclear cells of newborns and adults." Biol.Neonate 1999, 75; 225-233.

10. Bilgin, K.: "A Randomized Trial of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Neonates With Sepsis and Neutropenia." Pediatrics 2001, 107; 36-41.

11. Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A., Coto, D.: "Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns." Eur.J.Pediatr. 2000, 159; 420-423.

12. Blanco, A., Solis, G., Arranz, E., Coto, D., Ramos, A., Telleria, J.: "Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram positive and Gram negative bacteria." Acta Paediatr. 1996, 85; 728-732.

13. Brandzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K.: "Immunobiology and immunopathology of the human gastrointestinal immune system." Gastroenterology 1989, 97; 1562-1584.

14. Buck, C., Bundschu, J., Gallati, H., Bartmann, P. , Pohlandt, F.: "Interleukin-6: A sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection." Pediatrics 1994, 93; 54-58.

15. Buckley, R. H.: "T, B, and NK cells." w: Nelson Textbook pf Pediatrics wyd. 16 pod red. Behrman, R. E., Kliegman, R. M., Arvin, A. M. W.B. Saunders Company, Philadelphia 2000, 590-595.

16. Buscher, U., Chen, F. C., Pitzen, A., Menon, R. , Vogel, M., Obladen, M., Dudenhausen, J. W.: "Il-1 beta, Il-6, Il-8 and G-CSF in the diagnosis of early-onset neonatal infections." J.Perinat.Med. 2000, 28; 383-388.

17. Caplan, M. S., MacKendrick, W.: "Inflammatory mediators and intestinal injury." Clinics in Perinatology 1994, 21; 235-246.

18. Carlos, M. A., Babyn, P. S., Marcon, M. A., Moore, A. M.: "Changes in gastric emptying in early postnatal life." J.Pediatr. 1997, 130; 931-937.

19. Chiesa, C., Panero, A., Naila, P., Stegagno, M., DeGiusti, M., Osborn, J. F., Pacifico, L.: "Reliability of Procalcitonin concentrations for diagnosis of sepsis in critically ill neonates." Clinical Infectious Disease 1998, 26; 664-672.

20. Damas, P., Canivet, J. L., DeGrotte, D., Virndts, Y., Albert, A., Franchimont, P.: "Sepsis and serum cytokine concentrations." Crit Care Med. 1997, 25; 405-412.

21. de Bont, E. S., Martens, A., van Raan, J., Samson, G., Fetter, W. P., Okken, A., de Leij, L. H., Kimpen, J. L.: "Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alfa (TNFα) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis." Acta Paediatr. 1994, 83; 696-699.

22. de Werra, I., Jaccard, C., Corradin, S. B., Chiolero, R., Yersin, B.: "Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: Comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia." Crit Care Med. 1997, 25; 607-613.

23. Docke, W. D., Reinke, P., Syrbe, U., Platzer, C., Asadullah, K.: "Immunoparalysis in sepsis - from phenomenon to treatment strategies." Transplantationsmedizin 1997, 9; 55-65.

24. Doellner, H., Arntzen, K. J., Haereid, P. E., Aag, S., Austgulen, R.: "Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis." J.Pediatr. 1998, 132; 295-299.

25. Edelson, M. B., Bagwell, C. E., Rozycki, H. J.: "Circulationg pro and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis." Pediatrics 1999, 103; 766-771.

26. El Bastawissi, A. Y., Williams, M. A., Riley, D. E., Hitti, J., Krieger, J. N.: "Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review." Obstet.Gynecol. 2000, 95; 1056-1064.

27. Fotopoulos, S., Pavlou, K., Skouteli, H., Papassotiriou, I., Lipsou, N., Xanthou, M.: "Early markers of brain damage in premature low-birth-weight neonates who suffered from perinatal asphyxia and/or infection." Biol.Neonate 2001, 79; 213-218.

28. Franz, A. R., Steinbach, G., Kron, M., Pohland, F. : "Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using Interleukin-8 and C-Reactive protein as markers of bacterial infections." Pediatrics 1999, 104 ; 447-453.

29. Freij, B. J., McCracken, G. H.: "Acute infections." w: Neonatology: patophysiology and management of the newborn wyd. 5 pod red. Avery, G. B., Fletcher, M. A., MacDonald, M. G. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 1999, 1189 -1230.

30. Freij, B. J., Sever, J. L.: "Chronic infections." w: Neonatology: patophysiology and managemant of the newborn wyd. 5 pod red. Avery, G. B., Fletcher, M. A., MacDonald, M. G. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 1999, 1123-1188.

31. Gajewska, E., Czyżewska, M.: "Zakażenia." w: Neonatologia wyd. 1 pod red. Szczapa, J. PZWL, Warszawa 2000, 102-142

32. Gaynes, R. P., Edwards, J. R., Jarvis, W. R., Culver, D. H., Tolson, J. S., Martone, W. J.: "Nosocomial Infections among neonates in high-risk nurseries in the United States." Pediatrics 1996, 98; 357-361.

33. Gendrel, D., Assicot, M.: "Procalcitonin as a early marker of neonatal infection." J.Pediatr. 1996, 128 ; 570-576.

34. Gotoff, S. P.: "Infections of the neonatal infant." w: Nelson Textbook of Pediatrics wyd. 16 pod red. Behrman, R. E., Kliegman, R. M., Arvin, A. M. W.B. Saunders Company, Philadelphia 2000, 514-540.

35. Grant, J., Denne, S. C.: "Effect of intermittent versus continuos enteral feeding on energy expenditure in preterm infants." J.Pediatr. 1992, 118; 928-

36. Gray, J. E., Richardson, D. K., McCormick, M. C., Goldman, D. A.: "Coagulase-Negative Staphylococcal bacteriemia among very low birth weight infants: relation to admission illness severity, resource use, and outcome." Pediatrics 1995, 95; 225-230.

37. Groll, A. H., Meiser, A., Weise, M., Rettwitz-Volk, W., von Loewenich, V.: "Interleukin 6 as early mediator in neonatal sepsis." Pediatr.Infect.Dis.J. 1992, 11; 496-497.

38. Gupta, S. K., Burke, G., Herson, V. C.: "Necrotizing enterocolitis: laboratory indicators of surgical disease." J.Pediatr.Surgery 1994, 29; 1472-1475.

39. Hageman, J. R., Caplan, M. S.: "An introduction to the structure and function of inflammatory mediators for clinicans." Clinics in Perinatology 1995, 22; 251-

40. Harris, M. C., Costarino, A. T., Sullivan, J. S., Dulkerian, S., McCawley, L., Corcoran, L., Butler, S., Kimpatrick, L.: "Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis." J.Pediatr. 1994, 124; 105 -111.

41. Hatherill, M., Tibby, S. M., Turner, C., Ratnavel, N., Murdoch, I. A.: "Procalcitonin and cytokine levels: Relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock." Crit.Care Med. 2000, 28; 2591-2594.

42. Haziot, A., Hijiya, N., Schultz, K., Zhang, F., Gangloff, S. C., Goyert, S. M.: "CD14 plays no major role in shock induced by Staphylococcus aureus but down-regulates TNFα production." J.Immunol. 1999, 162; 4801-4805.

43. Heird, W. C., Jensen, C. L., Gomez, M. R.: "Practical aspects of achieving positive energy balance in low birth weight infants." J.Pediatr. 1992, 120; S120-128.

44. Hiki, N., Berger, D., Prigl, C., Boelke, E., Wiedeck, H.: "Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents and inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients

with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Infect.Immun. 1998, 66; 1135-1141.

45. Ingalls, R. R., Heine, H., Lien, E., Yoshimura, A., Golenblock, D.: "Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors." Infect.Dis.Clin.N.Amer. 1999, 13; 341-353.

46. Iwaszko-Krawczuk, W., Alifier, M.: "Martwicze zapalenie jelit." w: Neonatologia wyd. 1 pod red. Szczapa, J. PZWL, Warszawa 2000, 317-323.

47. Jaeschke, R., Cook, D., Guyatt, G.: "Evidence based medicine (EBM) czyli praktyka medyczna oparta na wiarygodnych i aktualnych publikacjach (POWAP)." wyd. 1, Medycyna Praktyczna Kraków 1999,

48. Jakóbisiak, M.: "Immunologia." wyd. 1, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2000,

49. Jedrzejczak, W. W., Podolak-Dawidziak, M.: "Cytokiny. Zastosowanie kliniczne." wyd. 1, Volumed s.c. Wrocław 1997,

50. Johnson, R. B.: "Host defencse against infection in the newborn." Biol.Neonate 1996, 69; 165-212.

51. Jones, C. A., Cayabyab, R. G., Kwong, K. Y., Stotts, C., Wong, B., Hamdan, H., Minoo, P., deLemos, R. A.: "Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns." Pediatr.Res. 1996, 39; 966-975.

52. Jurges, E. S., Henderson, D. C.: "Inflammatory and immunological markers in preterm infants: correlation with disease." Clin.Exp.Immunol. 1996, 105; 551-

53. Kadhim, H., Tabarki, B., Verellen, G., De Prez, C. , Rona, A. M., Sebire, G.: "Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia." Neurology 2001, 56; 1278-1284.

54. Kantar, M., Kultursay, N., Kutukculer, N., Akisu, M., Cetingul, N., Caglayan, S.: "Plasma concentrations of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in septic and healthy preterms." Eur.J.Pediatr. 2000, 159; 156-157.

55. Kinney, J. S., Eiden, J. J.: "Enteric infectious disease in neonates." Clinics in Perinatology 1994, 21; 317-333.

56. Koster, M., Henneke, P., Bauer, K., Lamping, N., Schumann, R., Versmold, H.: "Low levels of LPS-binding protein (LBP) and high levels of interleukin-8 in preterm neonates with sepsis." 22nd International Congress of Peditrics 1998,

57. Kreutz, M., Ackerman, U., Hauschildt, S., Krause, S. W., Riedel, D., Bessler, W., Andreesen, R.: "A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and Staphyloccocus aureus in human monocytes." Immunology 1997, 92; 396-401.

58. Kuster, H., Weiss, M., Willeitner, A. E., Detlefsen, S., Jeremias, I., Zbojan, J.: "Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation." Lancet 1998, 352; 1271-1277.

59. Kwinta, P., Mitkowska, Z., Pietrzyk, J. J., Czarnowieska, A.: "Czynniki ryzyka bakteriemii gronkowcowej u noworodków z masą ciała poniżej 1500g." Postępy w Neonatologii 1996, supl. II; 98-104.

60. LaGamma, E. F., Browne, L. E.: "Feeding practices for infants weighing less than 1500g at birth and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis." Clinics in Perinatology 1994, 21; 271-301.

61. Lamping, N., Dettmer, R., Schroder, N. W., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R.: "LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or Gram negative bacteria." J.Clin.Invest. 1998, 101; 2065-2071.

62. Lau, C., Sheena, H. R., Shulman, R. J., Schanler, R. J.: "Oral feeding in low birth weight infants." J.Pediatr. 1997, 130; 561-569.

63. Lauterbach, R.: "Pentoksyfilina (PTXF) w leczeniu posocznicy u noworodków." Klinika Pediatryczna 1995, 3; 51-55.

64. Lauterbach, R.: "Postępowanie w posocznicy bakteryjnej u noworodka." w: Rekomendacje postępowań w medycynie perinatalnej wyd. 2 pod red. Gadzinowski, J., Bręborowicz, G. H. OWN PAN, Poznań 2000, 31-36.

65. Lauterbach, R.: "Wstrząs." w: Neonatologia wyd. 1 pod red. Szczapa, J. PZWL, Warszawa 2000, 143-157.

66. Lauterbach, R.: "ABC zakażeń u noworodka." wyd. 1, Medycyna Praktyczna Kraków 2001,

67. Lauterbach, R., Pawlik, D., Kowalczyk, D., Ksycinski, W., Helwich, E., Zembala, M.: "Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: a placebo-controlled, double-blind trial." Crit Care Med. 1999, 27; 807-814 .

68. Lehrnbecher, T., Schrod, L., Karus, D., Roos, T., Martius, J., von Stockhausen, H.-B.: "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in coed blood in the diagnosis of early onset sepsis." Acta Paediatr. 1995, 84; 806-808.

69. Levin, J., Tomasulo, P., Oser, R.: "Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor." J.Lab.Clin.Med. 1970, 75; 903-911.

70. Li, Y. H., Brauner, A., Jonsson, B., van, d. P., I, Soder, O., Holst, M., Jensen, J. S., Lagercrantz, H., Tullus, K.: "Ureaplasma urealyticum-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages." Pediatr.Res. 2000, 48; 114 -119.

71. Lienicke, U., Docke, W. D., Stevens, P. A., Wauer, R. R.: "Decreased tumor necrosis factor alpha production in premature infants developing bronchopulmonary dysplasia." ESPR Annual Metting, Helsinki 2001,

72. Lucas, A., Morley, R., Cole, T. J., Gore, S. M., Lucas, P. J., Crowle, P., Pearse, P., Boon, A. J., Powell, R.: "Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months." Lancet 1990, 335; 1477-1481.

73. Lucas, A., Morley, R., Cole, T. J., Lister, G., Leeson-Payne, C.: "Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm." Lancet 1992, 339; 261-264.

74. Lynn, W. A.: "Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis." J.Antimicrobial Chemotherapy 1998, 41; 71-80.

75. Mannick, E., Udall, J. N.: "Neonatal gastrointestinal mucosal immunity." Clinics in Perinatology 1996, 23; 287-303.

76. McColm, J. R., Stenson, B. J., Biermasz, N., McIntosh, N.: "Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants." Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed 2000, 82; F156-F159.

77. McKendrick, W.: "Increase in plasma platelet - activating factor levels in enterally fed preterm infants." Biol.Neonate 1992, 64; 89-95.

78. McKeown, R. E., Mrasch, D., Amarnath, U., Garrison, C. Z., Addy, C. L.: "Role of delayed feeding and of feeding increments in necrotizing enterocolitis." J.Pediatr. 1992, 121; 764-770.

79. Meadow, W., Rudloff, S.: "Inflammatory mediators and neonatal sepsis." Clinics in Perinatology 1995, 22; 519-536.

80. Meetz, W., Valentine, C., McGuigan, J. E.: "Gastrointestinal priming prior to full enteral nutrition in very low birth wieght infants." JPGN 1992, 15 ; 163-170.

81. Mehr, S., Doyle, L.: "Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis." Lancet 1999, 353; 1798-1799.

82. Messer, J., Eyer, D., Donato, L., Gallati, H., Matis, J., Simeoni, U.: "Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection." J.Pediatr. 1996, 129; 574-580.

83. Millar, M. R.: "Enterobacteriaceae and neonatal necrotising enterocolitis." Arch.Dis.Child. 1992, 67; 53-

84. Mitkowska, Z., Kwinta, P., Kruczek, P., Pietrzyk, J. J., Czarnowieska, A.: "Wpływ żywienia enteralnego na występowanie późnej posocznicy Gram ujemnej u noworodków z niską masą urodzeniową." Postępy w Neonatologii 1997, 8; 100-107.

85. Mitkowska, Z., Kwinta, P., Kruczek, P., Pietrzyk, J. J., Czarnowieska, A.: "Wyniki leczenia i czynniki ryzyka uogólnionych zakażeń u noworodków na Oddziale Intensywnej Terapii Noworodka I Kliniki Chorób Dzieci." Swiat Leków 1997, 3; 61-69.

86. Mitkowska, Z., Kwinta, P., Pietrzyk, J. J., Czarnowieska, A.: "Risk factors of septic shock in newborns with Gram negative sepsis." XII International Congress of Pediatrics 1998, P113-

87. Miura, E.: "A Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial of Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor Administration to Preterm Infants With the Clinical Diagnosis of Early-Onset Sepsis." Pediatrics 2001, 107; 30-35.

88. Monneret, G., Labaune, J. M., Isaac, C., Bienvenu, F., Putet, G., Bienvenu, J.: "Procalcitonin and C-rective protein levels in neonatal infections." Acta Paediatr. 1997, 86; 209-212.

89. Moro, M. L.: "Risk factors for nosocomial sepsis in newborn intensive and intermediate care units." Eur.J.Pediatr. 1996, 155; 315-

90. Neu, J., Koldovsky, O.: "Nutrient absorption in the preterm neonate." Clinics in Perinatology 1996, 23; 229-235.

91. Newell, S. J.: "Enteral feeding of the micropremie." Clinics in Perinatology 2000, 27; 221-234.

92. Ng, P. C., Cheng, S. G., Chui, K. M., Wong, M. Y., Wong, W., Wong, R. P. O.: "Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants." Arch.Dis.Child. 1997, 77; F221-F227.

93. Nylen, E. S., Whang, K. T., Snider, R. H.: "Mortality is increased by procalcitonin and decrease by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis." Crit.Care Med. 1998, 26; 1001-1006.

94. Onal, E. E., Kitapci, F., Dilmen, U., Adam, B.: "Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis." Lancet 1999, 353; 239-240.

95. Opal, S. M., Yu, R. L.: "Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock." Drugs 1998, 55; 497-508.

96. Oygur, N., Sonmez, O., Saka, O., Yegin, O.: "Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy." Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed 1998, 79; F190-F193.

97. Panero, A., Pacifico, L., Rossi, N., Mancuso, G., Stegagno, M., Chiesa, C.: "Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection." Pediatr.Infect.Dis.J. 1997, 16; 370-375.

98. Pereira, G. R.: "Nutritional care of the extremely premature infant." Clinics in Perinatology 1995, 22; 61-75.

99. Perez, E. M., Weisman, L. E.: "Novel approaches to the prevention and therapy of neonatal bacterial sepsis." Clinics in Perinatology 1997, 24; 213-229.

100. Philip, A. G.: "Postnatal infection: Epidemiology, diagnosis and management." Biol. Neonate 1996, 69; 175-177.

101. Pietrzyk, J. J.: "Posocznica i wstrząs septyczny u dzieci." Med.Prakt. 1998, 5 supl.; 10-16.

102. Redel, C. A., Shulman, R. J.: "Controversies in the composition of infant formulas." Ped.Clin.North Amer. 1994, 41; 909-

103. Romagnoli, C., Frezza, S., Cingolani, A., De Luca, A., Puopolo, M., De Carolis, M. P., Vento, G., Antinori, A., Tortorolo, G.: "Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis." Eur.J.Pediatr. 2001, 160; 345-350.

104. Saliba, E., Henrot, A.: "Inflammatory mediators and neonatal brain damage ." Biol.Neonate 2001, 79; 224-227.

105. Salomao, R., Rigato, O., Pignatari, A. C., Freundenberg, M. A., Galanos, C.: "Bloodstream infections: epidemiology, patophysiology and therapeutic perspectives ." Infection 1999, 27 ; 1-11.

106. Scheifele, D., Olsen, E., Fussell, S., Pendray, M.: "Spontaneus endotoxinemia in premature infants: correlations with oral feeding and bowel dysfunction." JPGN 1985, 4; 67-74.

107. Schindler, R., Mancilla-Ramirez, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S., Dinarello, C. A.: "Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1. and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF." Blood 1990, 75; 40-47.

108. Schutt, C.: "Molecules in focus: CD14." IJBCB 1999, 31; 545-549.

109. Sehgal, S.: "Necrotizng Enterocolitis." CSMC NICU Teaching Files 1997,

110. Silveira, R. C., Procianoy, R. S.: "Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis." Acta Paediatr. 1999, 88; 647-650.

111. Sirota, L., Shacham, D., Punsky, I., Bessler, H.: "Ibuprofen affects pro- and anti-inflammatory cytokine production by mononuclear cells of preterm newborns." Biol.Neonate 2001, 79; 103-108.

112. Sirota, L., Straussberg, R., Gurary, N., Aloni, D., Bessler, H.: "Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells." Eur.J.Pediatr. 1999, 158; 910-913.

113. Spear, M. L., Stefano, J. L., Fawcett, P., Proujansky, R.: "Soluble interleukin-2 receptor as a predictor of neonatal sepsis." J.Pediatr. 1995, 126; 982-985.

114. Sulivan, J. S., Kilpatrick, L., Costarino, A. T., Lee, S. C., Harris, M. C.: "Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis." J.Pediatr. 1992, 120; 510-515.

115. Tadeusiewicz, R., Izworski, A., Majewski, J.: "Biometria." wyd. 1, Wydawnictwo AGH Kraków 1993,

116. The Merck Mannual: Merck and Co. Inc. New York 1997,

117. Thomson, A., Stern, C., West, C., Scopes, J.: "Spontaneous endotoxinemia and onset of oral feeding in 80 preterm neonates." Prog.Clin.Biol.Res. 1988, 272; 273-282.

118. Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F.: "Shock and tissue injury induced by recombinatnt human cachectin." Science 1986, 234; 470-

119. Van Dissel, J. T., Van Langevelde, P., Westendorp, R. G.: "Anti-inflammatory cytokin profile and mortality in febrile patients." Lancet 1998, 351; 950-953.

120. Wilson, D. C., Cairns, P., Halliday, H. L., Reid, M., McClure, G., Dodge, J. A. : "Randomised controlled trial of an agressive nutritional regimen in sick very low birthweight infants." Arch.Dis.Child. 1997, 77; F4-F11.

Biblioteka CM UJ w Krakowie