

University of Groningen

## The pathophysiology of necrotizing enterocolitis in preterm infants

Heida, Fardou Hadewych

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Heida, F. H. (2016). *The pathophysiology of necrotizing enterocolitis in preterm infants: New insights in the interaction between the gut and its microbiota*. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# DUTCH SUMMARY

(SAMENVATTING IN HET NEDERLANDS)

Necrotiserende enterocolitis (NEC) is een zeer ernstige en levensbedreigende gastrointestinale ziekte, die gekenmerkt wordt door ernstige inflammatie en necrose van de darm. NEC is de meest voorkomende acute gastrointestinale aandoening op de neonatale intensive care unit (NICU). De meest prematuur- en/of dysmatuur geboren neonaten lopen het grootste risico op het ontwikkelen van NEC. NEC kan een ernstig beloop hebben met een mortaliteit van 20-30% oplopend tot 50% bij chirurgisch behandelde kinderen. Ook als een kind NEC overleeft, gaat de ziekte gepaard met een hoge morbiditeit, zoals neurologische ontwikkelingsstoornissen (motorisch en cognitief) en/of het korte darmsyndroom. Ondanks de ernst van de ziekte en decennia van onderzoek is de onderliggende multifactoriële pathofysiologie nog niet geheel opgehelderd. Om deze reden zijn de behandelingsmogelijkheden voornamelijk gericht op het behandelen van symptomen en het voorkomen van progressie van de ziekte. Als eerste wordt enterale voeding gestaakt en wordt er gestart met antibiotica in combinatie met het stabiliseren van de vitale functies. In het geval van een darmperforatie of als een kind niet opknapt ondanks maximale conservatieve behandeling kan een chirurgische interventie geïndiceerd zijn. Een exploratieve laparotomie zal dan uitgevoerd worden waarin het necrotische darmweefsel geresecteerd wordt met daarna het aanleggen van een (tijdelijk) stoma dan wel een primaire anastomose indien mogelijk geacht door de chirurg.

Het verkrijgen van meer inzicht in de onderliggende pathofysiologie van NEC zal mogelijk leiden tot meer preventieve en/of therapeutische strategieën. Op het moment zijn er drie factoren waarvan gedacht wordt dat ze een sleutelrol spelen in de pathofysiologie van NEC. Deze drie factoren zijn allen gerelateerd aan prematuriteit: 1) de intestinale barrière functie, 2) de intestinale circulatie en perfusie, 3) het intestinale microbioom. Onze doelstelling was om het inzicht in de rol van deze drie factoren in relatie tot de pathofysiologie van NEC te vergroten.

In **hoofdstuk 2** hebben we retrospectief de epidemiologie, klinische presentatie, behandelstrategieën en ziekte uitkomsten van NEC in drie grote academische centra in Nederland geanalyseerd tussen 2005-2013. De rationale voor de studies in dit proefschrift worden benadrukt door de geobserveerde toegenomen incidentie van NEC in het laatste decennium.

De Nederlandse richtlijnen voor actieve behandeling voor prematuur geboren kinderen is in 2006 veranderd van 26+0 naar 25+0 weken gestatieduur, en vervolgens in 2010 naar 24+0 weken gestatieduur. Het totaal aantal kinderen geboren bij een

gestatieduur van 24- en 25 weken nam toe van 1,7% naar 3,4% van het totaal aantal kinderen opgenomen op de NICU na de verandering van deze richtlijn. De incidentie van NEC nam toe, van 2,1% naar 3,5%, voornamelijk in de groep kinderen geboren bij een geboortegewicht <1500 gram. We suggereren dat de verhoogde incidentie van NEC gerelateerd is aan de toename van kinderen geboren bij een gestatieduur van 24- en 25 weken na de verandering van de richtlijn voor actieve behandeling bij prematuur geboren kinderen. Het percentage van chirurgische interventies ten gevolge van NEC nam af gedurende het laatste decennium, terwijl de 30-dagen mortaliteit niet significant veranderde.

In het volgende deel van deze samenvatting zullen de belangrijkste onderzoeksbevindingen uit **sectie 2** van dit proefschrift besproken worden. We gaan deze bespreking van de bevindingen kort vooraf met een introductie over de gebruikte technieken voor de uitvoering van de beschreven studies in sectie 2, dat wil zeggen: het meten van intestinale schade via '**intestinal fatty acid-binding protein**' (**I-FABP**), het meten van weefsel perfusie via '**near infrared spectroscopy**', '**16S rRNA sequencing**' om het intestinale microbioom te identificeren, en **fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)** om de bacteriële invasie en bacteriële soorten te identificeren.

**I-FABPs** zijn cytoplasmatische eiwitten. Secretie van I-FABPs vindt plaats op de top van de darmvilli van de enterocyten in de darm. I-FABPs zijn belangrijk in het vet-metabolisme van de cellen. Voor NEC kunnen ze worden gebruikt als een maat voor enterocyt schade. Wanneer er sprake is van enterocyt schade worden I-FABPs uitgescheiden in de circulatie en vervolgens via de nieren uit het lichaam. Verschillende studies laten zien dat I-FABP metingen in urine en plasma geschikt zijn als marker voor NEC ontwikkeling en NEC progressie. In hoofdstuk 4,5 en 6 gebruiken we I-FABP in het plasma als marker voor enterocyt schade.

**NIRS** is een techniek waarmee het mogelijk is om de doorbloeding van het onderliggende weefsel te schatten doordat NIRS onderscheid maakt tussen het zuurstof gebonden hemoglobine en het zuurstofvrije hemoglobine. De ratio tussen het zuurstof gebonden hemoglobine en het totale hemoglobine bepaalt het regionale weefsel zuurstofgehalte ( $rSO_2$ ). Wanneer tegelijkertijd de transcutane arteriële zuurstofsaturatie ( $SpO_2$ ) wordt gemeten, kan de fractionele weefsel zuurstofextractie (FTOE: maat voor weefseldoorbloeding) berekend worden met behulp van de volgende formule:  $FTOE = (SpO_2 - rSO_2)/SpO_2$ . In het huidige proefschrift (hoofdstuk 4) hebben we gebruik gemaakt van splanchnische (lever en intestinaal)- en cerebrale FTOE waarden.

Via **16S rRNA sequencing** kunnen we de bacteriële compositie identificeren, het zogenoemde microbiom. 16S rRNA genen zijn alleen aanwezig in de cellen van bacteriën. De 16S rRNA genen worden via 16S rRNA sequencing in kaart gebracht. Doordat de 16S rRNA genen verschillen per bacterie worden ze gebruikt om verschillende bacteriën te kunnen identificeren. In het huidige proefschrift gebruikten we 16S rRNA sequencing (hoofdstuk 7) om een NEC-geassocieerd microbiom in kaart te brengen.

**FISH** is een cytogenetische techniek dat fluorescente probes gebruikt om micro-organismen te visualiseren en te identificeren op weefsels. FISH maakt gebruik van oligonucleotide probes die de sequence van het genetische materiaal bevat gelijk aan de sequence of het bacteriële RNA. Vervolgens wordt het weefsel met de hierop aangebrachte probe gelabeld met fluorochromes, wat de micro-organismen onder de fluorescentie microscoop aan zal kleuren. In hoofdstuk 8 van dit proefschrift gebruikten we FISH om bacteriën in de darmwand te detecteren in darmweefsel van kinderen die een darmresectie in verband met NEC ondergingen in vergelijking met controle darmweefsel.

In sectie 2 van dit proefschrift zoomden we in op de onderliggende pathofysiologie van NEC. In **hoofdstuk 3** onderzochten we de ontwikkeling van (immuun competente) Paneth cellen in de ontwikkeling van de darm. Paneth cellen zijn belangrijke cellen in het immuun systeem en gelokaliseerd in de villi van de darm. Paneth cellen zijn de zogenaamde ‘immunologische bewakers’ van de crypten doordat ze de crypten beschermen tegen schadelijke bacteriën door middel van het uitscheiden van defensines.

We maakten gebruik van darmweefsel afkomstig van autopsie materiaal van fetussen en kinderen zonder darmafwijkingen, variërend van een zwangerschapsduur tussen de negen en 40 weken. Het aantal Paneth cellen nam significant toe wanneer kinderen de a terme leeftijd bereikten (zwangerschapsduur >37 weken). Het aantal immuun competente Paneth cellen (‘human defensin-5’ producerende Paneth cellen) nam significant toe vanaf 29 weken gestatieduur. De toename van immune competente Paneth cellen vanaf 29 weken gestatieduur lijkt overeen te komen met de piekincidentie van NEC op een postmenstruele leeftijd van 29-33 weken, wat doet vermoeden dat Paneth cellen een rol spelen in de pathofysiologie van NEC.

In **hoofdstuk 4** laten we een ‘proof of concept’ zien dat FTOE (als een maat voor een verminderde perfusie) en I-FABP waarden (als een marker voor enterocyt schade) gebruikt kunnen worden om het onderliggende pathofysiologische beloop van NEC te onthullen. Onze resultaten laten zien dat gedurende de eerste uren van NEC ontwikkeling cerebrale en splanchnische FTOE waarden sterk

gecorrleerd zijn met I-FABP. Bij NEC progressie zagen we specifieke patronen voor een ongecompliceerde NEC (succesvolle conservatieve behandeling) versus gecompliceerde NEC (chirurgie, overlijden). We zagen dat de initiële intestinale FTOE waarden hoger waren in de kinderen met een gecompliceerde NEC, suggestief voor een gecompromitteerde intestinale circulatie. Bij kinderen met een ongecompliceerde NEC waren de FTOE waarden aanvankelijk lager (wat suggereert dat de darmcirculatie op dat moment niet gecompromitteerd was) en stegen de FTOE waarden gedurende de eerste 24-36 uur. In beide groepen daalden de I-FABP waarden na gemiddeld 24 uur, wat verklaard kan worden door of dat er sprake was van weefselherstel in het geval van ongecompliceerde NEC of dat er sprake was van afwezigheid van veneuze terugvloed van de necrotische darm dan wel complete destructie van de mucosa in het geval van gecompliceerde NEC. De combinatie van hoge FTOE waarden en dalende I-FABP waarden na 24 uur suggereert progressie van intestinale ischemie. Al met al geeft de studie een 'proof of concept' dat de combinatie van NIRS metingen en I-FABP waarden inzicht kan geven in de onderliggende pathofysiologische gebeurtenissen gedurende NEC, resulterend in progressie dan wel herstel van intestinale ischemie.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we of de concentratie I-FABP in plasma geassocieerd was met de lengte van darmnecrose bij chirurgisch behandelde NEC patiënten. In deze studie vonden we inderdaad dat de hoogte van I-FABP levels sterk correleerde met de lengte van darmnecrose. De significante correlatie tussen I-FABP elevatie en lengte van intestinale resectie benadrukt de potentiële klinische significantie van I-FABP als marker voor risico inschatting bij kinderen met NEC. Onze bevindingen ondersteunen het gebruik van I-FABP als een marker voor enterocyt schade.

De doelstelling van **hoofdstuk 6** was om inzicht te creëren in de persisterende vraag of bloedstroominfecties NEC induceren of dat bloedstroominfecties secundair voorkomen door verlies aan intestinale barrière functie gedurende NEC. We onderzochten de relatie tussen het voorkomen van bloedbaaninfecties tijdens vroege NEC (24u voor en 24u na start van NEC symptomen) en de pro-inflammatoire response (Interleukine-8), respectievelijk het verlies van de intestinale barrière functie (I-FABP). We observeerden een relatief laag aantal bloedbaaninfecties tijdens de beginfase van NEC (26%). Daarnaast was er geen relatie tussen de aanwezigheid van een bloedbaaninfectie en de pro-inflammatoire respons dan wel het verlies van intestinale barrière functie. Deze bevindingen suggereren dat bloedbaaninfecties niet het ontstaan van NEC induceren.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we of de compositie van het intestinale microbiom in prematuren met een hoog-risico op NEC geassocieerd was met de ontwikkeling van NEC. We maakten gebruik van '16S rRNA sequencing' technieken waarmee we de bacteriële compositie in de ontlasting van prematuren met een hoog-risico op NEC in kaart brachten. De meest belangrijke bevinding in dit hoofdstuk is dat we een associatie vonden tussen *C. perfringens* en *B. dorei* in het meconium en de latere ontwikkeling van NEC. Deze bevinding suggereert dat factoren gedurende de eerste levensdagen, tijdens de bevalling of zelfs voor de geboorte, de compositie van het microbiom kunnen beïnvloeden. Een vroegtijdige (binnen 24u postpartum) start van enterale voeding, voornamelijk in de vorm van moedermelk, ging gepaard met een grotere hoeveelheid lactaat producerende bacteriën in post-meconium monsters. Lactaat producerende bacteriën bleken overigens geassocieerd met een verminderde incidentie van NEC. Deze bevindingen bevestigen de hypothese dat enterale voeding, voornamelijk in de vorm van moedermelk, belangrijk is om de darm te beschermen tegen de ontwikkeling van NEC. Vroegtijdige voeding met moedermelk stimuleert de kolonisatie van lactaat producerende bacteriën in extreem prematuur geboren kinderen op dezelfde manier als moedermelk normaal gesproken de kolonisatie van bifidobacteriën stimuleert in de a term geboren kinderen.

In **hoofdstuk 8** verplaatsten we onze aandacht van het intestinale microbiom voorafgaand aan NEC naar de bacteriële kolonisatie gedurende NEC. We onderzochten de of er sprake was van darmwandinvasie in darmweefsel van kinderen met NEC in vergelijking met controle darmweefsel. Door middel van FISH konden we de soort bacterie en de mogelijke bacteriële invasie beoordelen. In het geval van NEC vonden we in het merendeel bacteriële invasie in de darmwand (51%) in de meest ernstig aangedane darm monsters. In de minst aangedane NEC monsters zagen we bacteriële darmwandinvasie in 37%. In controle weefsel was dit 16%. *Enterobacteriaceae* domineerden in de NEC monsters. Het was verassend dat we enkel in sporadische gevallen *C. perfringens*, een NEC-geassocieerde bacterie, hebben geïdentificeerd. Onze hypothese luidt dat door inflammatie oxidatieve stress wordt geïnduceerd door reactieve zuurstofverbindingen, resulterende in een omgeving waarin *C. perfringens* niet kan overleven. *Enterobacteriaceae* kunnen overleven in zowel een aerobe als een anaerobe omgeving (bijvoorbeeld als oorzaak van oxidatieve stress). Gedurende NEC, waarbij er sprake is van inflammatie, ischemie en necrose van de darm, kunnen *Enterobacteriaceae* goed overleven.

**Concluderend** geeft dit proefschrift nieuwe inzichten in de rol van de intestinale barrière functie, de intestinale perfusie en het intestinale microbiom in the pathofysiologie van NEC. Onze hypothese voor de pathofysiologie van NEC is als volgt: veranderingen in het intestinale microbiom kunnen zich al presenteren vanaf het meconium. Wanneer dit microbiom onder andere bestaat uit NEC-geassocieerde bacteriën (*C. perfringens* en *B. dorei*) gaan pro-inflammatoire mediators zich amplificeren. De amplificatie van pro-inflammatoire mediators zullen vervolgens oxidatieve stress veroorzaken. Oxidatieve stress beschadigt, via vrije radicalen, de omliggende cellen en DNA. Wanneer het kind meer bloot wordt gesteld aan prenatale stressoren, zoals hypoxie en hypoperfusie, zal de pro-inflammatoire respons nog verder toenemen en daarmee ook de oxidatieve stress. Deze pro-inflammatoire respons versterkt vasoconstrictie binnen de intestinale circulatie wat zich uit in een verminderde intestinale perfusie. Deze verminderde intestinale perfusie kan leiden tot ischemie, een verdere beschadiging van de intestinale barrière functie en irreversibele necrose van de darm. Bij progressie van NEC zal de intestinale perfusie verder verslechteren en de de intestinale barrière functie zal verder verminderen ten gevolge van enterocyt schade. Vervolgens zullen *Enterobacteriaceae* in de inflammatoire en necrotische darm koloniseren resulterende in versterking van de inflammatoire respons.

De onderliggende pathofysiologie van NEC blijft deels onvolledig begrepen. Het huidige proefschrift geeft enkele nieuwe inzichten in de onderliggende pathofysiologie van NEC, waarbij de gevonden associaties causaliteit suggereren maar dat is nog niet bewezen. De bevindingen van het huidige proefschrift zullen bevestigd moeten worden door grote multicenter studies. Deze onderzoeken zullen vervolgens gevolgd moeten worden door doelgerichte antibiotica- en probiotica trials, met als doel de ontwikkeling van preventieve en therapeutische strategieën tegen ontwikkeling en progressie van NEC.



