

Συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης από το στόμα και τιμές καλπροτεκτίνης κοπράνων στα πολύ χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά

Πολυκάρπου Ε.^{1*}, Ζαχάκη Σ.², Παπαευαγγέλου Β.³, Τσολιά Μ.³, Γαβρίλη Σ.¹, Κυριακού Α.⁴, Κώσταλος Χ.¹, Καφετζής Δ.³

¹ Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών, Γ.Π.Ν. «Αλεξάνδρα», Αθήνα

² Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Αγ. Σοφία», Αθήνα

³ Νοσοκομείο Παίδων «Αγλαΐα Κυριακού», 2η Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Αθήνα

⁴ Τμήμα Διατροφής και Διατολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα

Αλληλογραφία: Πολυκάρπου Ε., 81 Holborn House, Du cane road, London, W12 0TS, UK,
Tel.: 0044 (0)7881900580, fax: 0030 210 6534710.
E-mail: epolycarpou@yahoo.com

Περίληψη

Στόχος: Ο προσδιορισμός της πιθανής επίδρασης της από του στόματος συμπληρωματικής χορήγησης L-αργινίνης στη φλεγμονή του εντέρου, σε πολύ χαμηλού βάρους γέννησης (ΠΧΒΓ) νεογνά, όπως εκτιμάται από τα επίπεδα καλπροτεκτίνης στα κόπρανα.

Σχεδιασμός μελέτης: Στη μελέτη συμμετείχαν 83 ΠΧΒΓ νεογνά με βάρος γέννησης ≤ 1500 g και ηλικία κύησης ≤ 34 εβδομάδες. Σε αυτή τη διπλή τυφλή μελέτη 40 νεογνά έλαβαν από το στόμα καθημερινά συμπληρωματικά L-αργινίνη 1.5mmol/Kg/day μεταξύ της 3ης και 28ης ημέρας ζωής και 43 έλαβαν εικονικό φάρμακο. Δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν κατά τις ημέρες 3, 14 και 28 και η καλπροτεκτίνη μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA.

Αποτελέσματα: Οι τιμές καλπροτεκτίνης κοπράνων μειώθηκαν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου και στις δύο ομάδες ($p=0.032$). Δε βρέθηκε καμία διαφορά στις τιμές καλπροτεκτίνης μεταξύ των νεογνών που έλαβαν συμπλήρωμα αργινίνης και των νεογνών που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Συμπεράσματα: Οι τιμές της καλπροτεκτίνης κοπράνων μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας των ΠΧΒΓ νεογνών, αλλά αυτό δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τη συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης.

Λέξεις κλειδιά: νεκρωτική εντεροκολίτιδα (NEK), μονοξειδίο του αζώτου (NO), καλπροτεκτίνη κοπράνων, L-αργινίνη

Εισαγωγή

Η καλπροτεκτίνη είναι μία πρωτεΐνη 36,5 kDa που δεσμεύει ασβέστιο και ψευδάργυρο και αποτελεί περίπου το 60% του συνόλου των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα του ανθρώπου¹. Η μέτρηση της καλπροτεκτίνης στα κόπρανα έχει αναγνωριστεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης για την ανίχνευση της φλεγμονής του γαστρεντερικού

σωλήνα σε παιδιά και ενήλικες. Μπορεί να είναι ένας χρήσιμος δείκτης της φλεγμονής του γαστρεντερικού βλεννογόνου και ως εκ τούτου, της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε πρόωρα νεογνά^{2, 3, 4}.

Η νεκρωτική εντεροκολίτιδα (NEK) είναι η πιο συχνή επίκτητη νόσος του γαστρεντερικού συστήματος στα πρόωρα νεογνά. Στη NEK το λεπτό (πιο συ-

χνά άπω) και/ή το παχύ έντερο τραυματίζονται, και αναπτύσσεται ενδοτοιχωματικός αέρας. Αυτό μπορεί να εξελιχθεί σε νέκρωση με διάτρηση⁵. Η υψηλή θνησιμότητα και νοσηρότητα από την NEK δεν έχει βελτιωθεί σημαντικά κατά τα τελευταία 40 χρόνια^{5,6}. Αν και έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα ως προς την παθοφυσιολογία της NEK, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Η παθοφυσιολογία της NEK μοιάζει συχνά με τραυματισμό από επαναιμάτωση-ισχαιμία του εντέρου. Ένας σημαντικός ρυθμιστής της αγγειακής ενδοθηλιακής αιμάτωσης είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO), ένας αντιφλεγμονώδης διαμεσολαβητής και αγγειοδιασταλτικό που εμπλέκεται στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου, του εντερικού φραγμού και στη ρύθμιση της αιμάτωσης του εντερικού βλεννογόνου, σε περιπτώσεις φλεγμονής ή τραυματισμού^{7,8}. Η αναστολή της σύνθεσης του NO σε μια ποικιλία ζωικών μοντέλων στα οποία προκαλείται τραυματισμός του εντέρου αυξάνει την έκταση της εντερικής βλάβης^{7,8}. Το NO συντίθεται από το αμινοξύ L-αργινίνη με τη βοήθεια της συνθετάσης του NO (NOS).

Η L-αργινίνη είναι υπό προϋποθέσεις ένα απαραίτητο αμινοξύ, πράγμα που σημαίνει ότι η ενδογε-

νής παραγωγή αργινίνης καλύπτει μεταβολικές απαιτήσεις σε υγιή άτομα σε μη στρεσογόνες καταστάσεις, αλλά γίνεται ένα απαραίτητο αμινοξύ σε συνθήκες αυξημένης ανάγκης, όπως για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη ή την επισκευή των ιστών, ή σε καταβολικές καταστάσεις όπως η σήψη και η αστία⁹. Σε πρόωρα νεογνά, παρατηρείται συχνά υποαργινιναιμία¹⁰, η οποία πιθανόν να προδιαθέτει αυτά τα νεογνά στην ανάπτυξη NEK¹¹⁻¹³. Η σχετική ανεπάρκεια αργινίνης ή η ανωριμότητα της δραστηριότητας της NOS μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή επίπεδα NO στους ιστούς, αγγειοσύσπαση, βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση και μπορεί να προδιαθέσει σε NEK. Τα επίπεδα της αργινίνης στο πλάσμα βρέθηκαν να είναι μειωμένα σε πρόωρα βρέφη με NEK¹⁴⁻¹⁶, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι η λήψη συμπληρωματικά αργινίνης μπορεί να μειώσει την επίπτωση της NEK¹⁷⁻¹⁸.

Σκοπός αυτής της διπλής τυφλής μελέτης ήταν να διαπιστωθεί αν η συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης στα ΠΧΒΓ νεογνά μειώνει τη φλεγμονή του εντέρου, χρησιμοποιώντας σαν δείκτη της φλεγμονής του εντέρου τη συγκέντρωση της καλπροτεκτίνης στα κόπρανα.

Πίνακας 1. Δημογραφικά δεδομένα των νεογνών που λάμβαναν συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης (N=40) και των νεογνών της ομάδας ελέγχου (N=43).

	Ομάδα αργινίνης N=40 (%)	Ομάδα ελέγχου N=43 (%)	Στατιστική σημαντικότητα
Φύλο			
Άρρεν	17 (42.5%)	19 (44.2%)	ns
Θήλυ	23 (57.5%)	24 (55.8%)	ns
Βάρος (g)*	1168 (1095.1, 1242.2)	1127 (1047.1, 1207.6)	ns
Ηλικία κύησης(εβδ)*	29.2 (28.9, 29.4)	28.8 (28.5-29.1)	ns
Μονήρης κύηση	24 (60%)	30 (70%)	ns
Δίδυμη-Τρίδυμη κύηση	16 (40%)	14 (30%)	
Καισαρική τομή	30 (75%)	32 (74.4%)	ns
Φυσιολογικός τοκετός	10 (25%)	11 (25.6%)	
Μητρικό γάλα	7 (17.5%)	5 (11.6%)	ns
Γάλα για πρόωρα	33 (82.5%)	38 (88.4%)	
Argar score			
1min**	7	7	ns
5min**	8	8	ns
IUGR	16 (40%)	14 (32.6%)	ns
Στερεοειδή στη μητέρα	32 (80%)	34 (79.1%)	ns
Χορήγηση αντιβιοτικών στη μητέρα προ τοκετού	14 (35%)	18(42%)	ns

*μέση τιμή (± SD), **διάμεσος, ns: μη στατιστικά σημαντική διαφορά

Πίνακας 2. Επίπτωση των συχνών συμβάντων των πρόωρων νεογνών στις δύο ομάδες.

	Ομάδα αργινίνης N=40 (%)	Ομάδα ελέγχου N=43 (%)	Στατιστική σημαντικότητα
ΣΑΔ	31 (77.5%)	35 (81.4%)	ns
Ανοικτός βοτάλειος πόρος (PDA)	6 (15%)	8 (18.6%)	ns
Ανοικτός βοτάλειος πόρος/ ibuprofen	4 (10%)	7 (16.3%)	ns
Εγκεφαλική αιμορραγία βαθμού III και IV	9 (22.5%)	12 (27.9%)	ns
Τοποθέτηση ομφαλικού καθετήρα	26 (60.5%)	31 (72.1%)	ns
Διάρκεια ομφαλικού καθετήρα*	7 ημ.	5.5 ημ.	ns

*διάμεσος, ΣΑΔ: Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, ns: μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Πίνακας 3. Σύγκριση της επίπτωσης της NEK, θνησιμότητας και νοσηρότητας από τη NEK στις δύο ομάδες.

	Ομάδα αργινίνης N=40 (%)	Ομάδα ελέγχου N=43 (%)	Στατιστική σημαντικότητα
Επίπτωση της NEK (στάδια II και III)	4 (10%)	10 (23.3%)	ns
Επίπτωση της NEK (στάδιο III)	1 (2.5%)	8 (18.6%)	p=0.03
Ηλικία διάγνωσης της NEK* (ημέρες)	17	15	ns
Χειρουργείο για NEK	0 (0%)	2 (4.7%)	ns
Επίπτωση θανάτου από NEK	0 (0%)	4 (9.3%)	p=0.045
Επίπτωση θανάτου από άλλες αιτίες	8 (20%)	8 (18.6%)	ns

*διάμεσος, ns: μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Υλικά και Μέθοδοι

Νεογνά

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 83 ΠΧΒΓ νεογνά με βάρος γέννησης ≤ 1500 g και ηλικίας κύσεως ≤ 34 εβδομάδες, όπως καθορίστηκε από την τελευταία έμμηνο ρύση της μητέρας και κατά Ballard¹⁹, τα οποία γεννήθηκαν διαδοχικά στο Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα» στην Αθήνα, μεταξύ Ιουνίου 2009 και Σεπτεμβρίου 2010. Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν οι μεϊζονες συγγενείς ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι ενδογενείς διαταραχές του μεταβολισμού και η μη συγκατάθεση των γονέων. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου και όλοι οι γονείς υπέγραψαν ενημερωμένη συγκατάθεση.

Πρωτόκολλο μελέτης

Σε αυτή τη διπλή τυφλή μελέτη συμμετείχαν 83 ΠΧΒΓ νεογνά, που τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε από του στόματος συμπληρωματική χορήγηση L-αργινίνης 1,5mmol/kg/ημέρα (261mg/kg) σε υγρή μορφή σε δύο ισόποσες δόσεις με τη σίτιση, από την 3η έως την 28η ημέρα ζωής (N=40, ομάδα αργινίνης), είτε ίσο όγκο εικονικού φαρμάκου (5% γλυκόζη) (N=43, ομάδα ελέγχου).

Η δόση της αργινίνης βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες¹⁸. Κατά τη διάρκεια της μελέτης τα νεογνά παρακολουθούνταν για παρενέργειες, όπως διάρροια, έμετο, χαμηλή πίεση του αίματος και υπογλυκαιμία/υπεργλυκαιμία.

Η εντερική σίτιση άρχισε με 10-25ml/kg/ημέρα από την 1η ημέρα ζωής (ελάχιστη σίτιση) με έναρξη αύξησης την 6η ημέρα ζωής και μετά, με 10-25ml/kg/ημέρα ανάλογα με την ανοχή, μέχρι και 150-180ml/kg/ημέρα. Η παρεντερική σίτιση με αμινοξέα (Vamin 6,5%) άρχισε την 1η ημέρα ζωής με 1,5 g/kg/ημέρα με σταδιακή αύξηση σε 3,5g/kg/ημέρα. Το Vamin 6,5% περιέχει 4.1g L-αργινίνης/1000ml.

Το μητρικό γάλα περιέχει περίπου 54mg L-αργινίνης/100ml²⁰, αν και η πραγματική περιεκτικότητα σε αργινίνη του μητρικού γάλακτος δεν μετρήθηκε. Το μητρικό γάλα ήταν πάντα εμπλουτισμένο (BMF, Nutricia, Ολλανδία) με 2 φακελάκια BMF/100ml. Το BMF περιέχει 24mg L-αργινίνης/100ml. Έτσι, τα νεογνά που τρέφονταν με μητρικό γάλα λάμβαναν συνολικά περίπου 78mg L-αργινίνης/100ml γάλακτος. Τα βρέφη που έλαβαν Almiron για πρόωρα βρέφη (Almiron, Numico, Ολλανδία), λάμβαναν 82.6mg L-αργινίνης/100ml γάλακτος, μια συγκέντρωση στο εύρος της συνιστώμενης συγκέντρωσης αργι-

Πίνακας 4. Ανάπτυξη, πρόσληψη πρωτεΐνης, αργινίνης, υγρών και θερμίδων στις δύο ομάδες τις ημέρες 3, 14 και 28.

	Ημέρα 3		Ημέρα 14		Ημέρα 28	
	Ομάδα αργινίνης	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα αργινίνης	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα αργινίνης	Ομάδα ελέγχου
Βάρος (g)	1115 (1039.5, 1190.3)	1066 (992, 1140.4)	1251 (1167.2, 1335.6)	1197 (1105.1, 1288)	1549 (1430.4, 1666.7)	1458 (1352.1, 1563.7)
Περίμετρος κεφαλής (cm)	26.9 (26.2, 27.5)	26.7 (26.1, 27.2)	27.9 (27.4, 28.5)	27.3 (26.6, 28)	29.7 (28.9, 30.5)	29.3 (28.5, 30.1)
Ολική πρόσληψη υγρών (ml/kg/day)	121	126	171	170	184	176
Εντερική σίτιση (ml/kg/day)	17.1	14.0	85.7	61.5	160.9	139.4
Ουρία (mg/dl)	40	44	41	34	21	21
Ολική πρόσληψη αργινίνης (mg/kg/day)*	409.4	158.3	453.7	219.3	432	171.9
Ολική πρόσληψη αργινίνης (mmol/kg/day)	2.35	0.91	2.6	1.26	2.5	0.99
Ολική πρόσληψη θερμίδων (Kcal/kg/day)	61.6	60.7	111.9	104.3	142	130.4

*Η ομάδα αργινίνης λάμβανε αργινίνη 1.5mmol/kg/ημέρα, όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές (95% CI).

νίνης σε γάλα για πρόωρα νεογνά²¹. Δεν χρησιμοποιήθηκε γάλα τράπεζας γάλακτος.

Κλινικά δεδομένα

Καταγράφηκαν τα δημογραφικά δεδομένα, η πρόσληψη υγρών, η συνολική θερμιδική πρόσληψη, η συνολική πρόσληψη αργινίνης, η συνολική πρόσληψη πρωτεϊνών, το βάρος, το μήκος και η αύξηση της περιμέτρου κεφαλής των νεογνών. Για τη μέτρηση του βάρους σώματος χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική ζυγαριά με ακρίβεια 10 γραμμαρίων, για το μήκος σώματος σταδιόμετρο και μη ελαστική ταινία για τη μέτρηση της περιμέτρου κεφαλής.

Συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης κοπράνων

Δειγματοληψία, προετοιμασία και ανάλυση δειγμάτων

Η συλλογή των κοπράνων έγινε από τις πάνες των νεογνών με αποστειρωμένα πλαστικά κουτάλια και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία την 3η, 14η και 28η ημέρα ζωής. Όλα τα δείγματα κοπράνων αποθηκεύθηκαν στους 4 C και οι συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης μετρήθηκαν μέσα σε 3 ημέρες με Calprotectin ELISA KIT (Bühlmann Laboratories AG), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά, μετά τη συλλογή του δείγματος και μετά από μια σύντομη διαδικασία

εκχύλισης (1g δείγματος κοπράνων: 4,9 ml ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης), το εκχύλισμα αποθηκεύθηκε στους -20 C μέχρι τη μέτρηση της καλπροτεκτίνης. Χρησιμοποιήθηκε αραιώση δείγματος 1:50 για συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης 10-600μg/g, ενώ για τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες των 600 μg/g επαναλάβουμε τις μετρήσεις χρησιμοποιώντας αραιώση 1:150 (30-1800μg/g). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν δύο φορές.

Επίπτωση της NEK κατά τους πρώτους 3 μήνες ζωής – Διάγνωση και ταξινόμηση

Η διάγνωση και η ταξινόμηση έγινε σύμφωνα με τα τροποποιημένα κριτήρια του Bell [22-24]. Οι νεογνολόγοι που ταξινόμησαν τα επεισόδια της NEK, καθώς και ο ακτινολόγος ο οποίος αξιολόγησε τις ακτινογραφίες κοιλίας δεν γνώριζαν την κατανομή των ασθενών στις δύο ομάδες.

Στατιστική ανάλυση

Οι δοκιμάσιες Pearson Chi-square και Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση δημογραφικών και κλινικών δεδομένων μεταξύ των δύο ομάδων (ομάδα αργινίνης vs ομάδα ελέγχου). t-test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των τιμών καλπροτεκτίνης, της περιμέ-

Πίνακας 5. Σύγκριση των τιμών καλπροτεκτίνης στις ημέρες 3, 14 και 28.

	Τιμές καλπροτεκτίνης (µg/g)			Στατιστική σημαντικότητα
	Ημέρα 3	Ημέρα 14	Ημέρα 28	
Ολικός πληθυσμός (N=83)	252.7 (198.7-321.4)	119.4 (88.0-162.2)	133.4 (98.5-180.7)	ns
Ομάδα αργινίνης (N=40)	269.9 (187.5-388.4)	166.8 (109.3-254.6)	112.7 (71.1-178.8)	ns
Ομάδα ελέγχου (N=43)	237.8 (170.7-331.3)	111.0 (71.6-172.0)	126.1 (82.2-193.5)	ns
Μητρικό γάλα (N=12)	235.7 (102.1-544.1)	128.4 (69.0-238.9)	98.4 (45.9-201.0)	ns
Γάλα για πρόωρα (N=71)	255.9 (198.8-329.4)	134.3 (95.1-189.8)	124.1 (88.0-175.0)	ns

Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές (95% CI).

τρου κεφαλής, του μήκους και του βάρους μεταξύ των δύο ομάδων. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5%. Το στατιστικό πακέτο SAS v9.2 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων.

Αποτελέσματα

Μεταξύ Ιουνίου 2009 και Σεπτεμβρίου 2010, 171 νεογνά ≤ 34 εβδομάδων κύησης και $\leq 1,500$ g βάρους γέννησης γεννήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα». Από αυτά, 83 νεογνά έλαβαν μέρος στη μελέτη.

Τα δημογραφικά στοιχεία των νεογνών που έλαβαν συμπληρωματική χορήγηση L-αργινίνης και των νεογνών που έλαβαν εικονικό φάρμακο παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Κανένα νεογνό δεν είχε επίμονη υπογλυκαιμία. Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως διάρροιες, έμετοι, χαμηλή πίεση του αίματος και υπογλυκαιμία/υπεργλυκαιμία στα νεογνά που έλαβαν συμπληρωματικά αργινίνη.

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των συχνών συμβάντων σε πρόωρα νεογνά. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Ο πίνακας 3 παρουσιάζει την επίπτωση της NEK και τη νοσηρότητα και θνησιμότητα που συνδέονται με τη NEK στις δύο ομάδες.

Τα νεογνά και των δύο ομάδων είχαν σημαντική αύξηση στην περιμέτρο κεφαλής, στο μήκος και στο βάρος με το χρόνο ($p < 0,0001$). Η αύξηση του βάρους, του μήκους και της περιμέτρου κεφαλής με την πάροδο του χρόνου ήταν παρόμοια και στις δύο

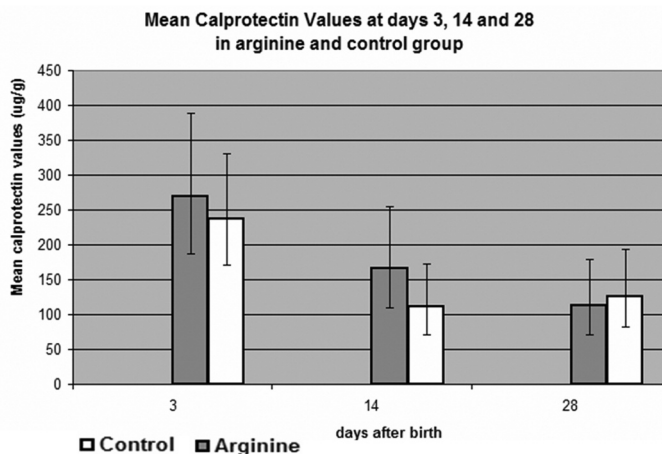
ομάδες ($p = 0,43$ για την αύξηση του σωματικού βάρους και $p = 0,31$ για την ανάπτυξη της περιμέτρου κεφαλής). Οι τιμές παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Οι μέσες τιμές καλπροτεκτίνης την ημέρα 3, 14 και 28 ήταν στην ομάδα αργινίνης 269,9 (187,5-388,4), 166,8 (109,3-254,6) και 112,74 (71,1-178,8) µg/g vs 237,8 (170,7-331,3), 111 (71,6-172) και 126,1 (82,2-193,5) µg/g στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα (Πίνακας 5). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές καλπροτεκτίνης μεταξύ των δύο ομάδων την ημέρα 3, 14 και 28 ($p = 0,60$, $p = 0,18$ και $p = 0,72$, αντίστοιχα). Επιπλέον, συγκρίνοντας τις τιμές καλπροτεκτίνης με την πάροδο του χρόνου μέσα στις ομάδες, διαπιστώσαμε ότι οι τιμές αυτές μειώθηκαν σημαντικά και στις δύο ομάδες ($p = 0,032$). Η μείωση αυτή με τον χρόνο ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες ($p = 0,554$) (εικ. 1).

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην πρόσληψη υγρών ή θερμίδων μεταξύ των νεογνών που έλαβαν αργινίνη και των νεογνών που έλαβαν εικονικό φάρμακο τις ημέρες 3, 14 και 28. Υπάρχει μια σημαντική διαφορά στην πρόσληψη αργινίνης λόγω της συμπληρωματικής χορήγησης αργινίνης.

Συζήτηση

Σε αυτή την τυχαίοποιημένη, διπλή-τυφλή μελέτη, ο στόχος μας ήταν να διαπιστωθεί αν η λήψη συμπληρωμάτων αργινίνης οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές καλπροτεκτίνης που θα σήμαινε ότι τα νεογνά που λαμβάνουν συμπληρωματικά αργινίνη έχουν πιο ήπια φλεγμονώδη αντίδραση στο έντερο. Η αργινίνη χορηγήθηκε αποκλειστικά από το στόμα, θεω-



Εικόνα 1: Σύγκριση των μέσων τιμών καλπροτεκτίνης κοπράνων (µg/g) στις ημέρες 3, 14 και 28 μεταξύ της ομάδας αργινίνης και της ομάδας ελέγχου.

ρώντας ότι η αργινίνη θα μπορούσε να έχει ευεργετική επίδραση τοπικά στον εντερικό βλεννογόνο βοηθώντας στην αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση με την παραγωγή άλλων αμινοξέων και πολυαμινών^{9, 25}.

Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες με από του στόματος λήψη συμπληρωμάτων αργινίνης σε δόση 1.5mmol/kg/ημέρα. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί σημαντικά υψηλότερες δόσεις L-αργινίνης χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στη διαχείριση των διαταραχών του κύκλου της ουρίας^{26, 27}.

Η χρησιμότητα της καλπροτεκτίνης κοπράνων ως δείκτη φλεγμονής του εντέρου παραμένει αμφιλεγόμενη στη νεογνική περίοδο λόγω των υψηλών επιπέδων σε αυτή την ηλικία. Η ανώτερη φυσιολογική τιμή για τους υγιείς ενήλικες και τα παιδιά ηλικίας 4 έως 17 ετών, ανεξαρτήτως φύλου, είναι 50µg/g²⁸. Έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι τα τελειόμηνα και πρόωρα νεογνά έχουν ευρύ φάσμα και υψηλότερες μέσες τιμές καλπροτεκτίνης σε σύγκριση με τους υγιείς ενήλικες²⁹⁻³⁴. Τιμές καλπροτεκτίνης μεγαλύτερες από 363 και 636 µg/g έχουν προταθεί για την ανίχνευση ήπιας ή σοβαρής εντεροπάθειας σε πρόωρα νεογνά, αντίστοιχα³¹. Στη μελέτη μας, βρέθηκε υψηλή μέση τιμή καλπροτεκτίνης την 3η ημέρα ζωής (μηκόνιο -πριν τη συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης) και στις δύο ομάδες. Αυτό συνάδει με προηγούμενες μελέτες μέτρησης καλπροτεκτίνης σε μηκόνιο στα ΠΧΒΓ νεογνά³⁵. Σε συμφωνία πάλι με άλλους^{31,33}, διαπιστώσαμε ότι η καλπροτεκτίνη κοπράνων μειώνεται αυξανόμενης της ηλικίας.

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές καλπροτεκτίνης μεταξύ των δύο ομάδων την

ημέρα 3, 14 και 28. Πιθανόν η καλπροτεκτίνη να μην αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για την πρόωμη διάγνωση της φλεγμονής του εντέρου σε νεογνά ή ότι η συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης στη δόση που χρησιμοποιήθηκε δεν έχει καμία επίδραση στη φλεγμονή του εντέρου. Μελλοντικές μελέτες με διαφορετικές δόσεις αργινίνης και/ή μεγαλύτερη διάρκεια χορήγησης θα μπορούσαν να συμβάλουν στην έρευνα σε αυτό το πεδίο.

Είναι ενδιαφέρον ότι η μέση τιμή καλπροτεκτίνης την 28η ημέρα στα νεογνά που λαμβάνουν συνδυασμό αποκλειστικά μητρικού γάλακτος και συμπληρωματικής χορήγησης αργινίνης σε σύγκριση με τα νεογνά που σιτίζονται με Almiron (με ή χωρίς συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης) καθώς και με τα νεογνά που λαμβάνουν μητρικό γάλα χωρίς λήψη συμπληρωμάτων αργινίνης, είναι χαμηλότερη αλλά όχι σημαντικά (Πίνακας 5). Μπορεί να υπάρχει μια συνεργική προληπτική δράση της αργινίνης με το μητρικό γάλα και θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί εκτενέστερα η παρατήρηση αυτή σε μεγάλο αριθμό νεογνών που λαμβάνουν αποκλειστικά μητρικό γάλα με ή χωρίς τη λήψη συμπληρωμάτων αργινίνης.

Συμπερασματικά, οι τιμές καλπροτεκτίνης κοπράνων μειώνονται αυξανόμενης της ηλικίας σε ΠΧΒΓ νεογνά, αλλά αυτό δεν σχετίζεται με τη συμπληρωματική χορήγηση αργινίνης. Πιθανόν, η αργινίνη να μην έχει επίδραση στη φλεγμονή του εντέρου στη δόση που χρησιμοποιήθηκε είτε η καλπροτεκτίνη κοπράνων δεν είναι αξιόπιστος δείκτης για τα πρώιμα στάδια της φλεγμονής.

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς ευχαριστούν όλους τους γονείς για την προθυμία τους να συμμετάσχουν σε αυτή τη μελέτη και το νοσηλευτικό προσωπικό της Μονάδας Νεογνών του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» για τη βοήθειά τους. Επιπλέον, ευχαριστούμε τον Ν.Π. Πολυκάρπου για την αξιολόγηση των ακτινογραφιών.

Key words: Necrotizing enterocolitis (NEC), Nitric Oxide (NO), faecal calprotectin, L-arginine, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Oral L-arginine supplementation and faecal calprotectin levels in very low birth weight neonates

Polycarpou E.¹, Zachaki S.², Papaevangelou V.³, Tsolia M.³, Gavriili S.¹, Kyriacou A.⁴, Kostalos C.¹, Kafetzis D.³

¹Neonatal Intensive Care Unit, "Alexandra" Hospital, Athens, Greece

²Health Physics & Environmental Health Laboratory, NCSR "Demokritos", Athens, Greece

³2nd Department of Paediatrics, Athens University, Children's Hospital "Aglia Kyriakou", Athens, Greece

⁴Department of Nutrition and Dietetics, Harokopion University, Athens, Greece

Correspondence: 81 Holborn House, Du cane road, London, W12 0TS, UK, tel.: 0044 (0)7881900580, Fax: 0030 210 6534710
E-mail: epolycarpou@yahoo.com

Summary

Objective: To determine the potential effect of oral L-arginine supplementation on intestinal inflammation in very low birth weight (VLBW) neonates, as estimated by faecal calprotectin levels.

Study design: The study enrolled 83 VLBW neonates with birth weight ≤ 1500 g and gestational age ≤ 34 weeks. In this double blind study 40 neonates received daily oral L-arginine supplementation of 1.5mmol/Kg/day between the 3rd and 28th day of life and 43 neonates received placebo. Stool samples were collected on days 3, 14 and 28 and calprotectin was measured by ELISA.

Results: Calprotectin values significantly decreased over time in both groups ($p=0.032$). No difference in faecal calprotectin values was recorded between neonates receiving arginine supplementation and neonates receiving placebo at days 3, 14 and 28.

Conclusions: Faecal calprotectin values decrease with increasing postnatal age in VLBW infants but this is not related to arginine supplementation.

Βιβλιογραφία

1. Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134:1-6.
2. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis. *Lancet* 2003;361:310-1.
3. Vieten D, Cairns P. The role of calprotectin in the diagnosis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Ir Med J* 2005;98:69.
4. Thuijls G, Derikx JP, van Wijck K, Zimmermann LJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, et al. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 2010;251:1174-80.
5. Srinivasan PS, Brandler MD, D'Souza A. Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol* 2008;35:251-72.
6. de Oliveira ND, Miyoshi MH. Advances in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81(1suppl):S16-22.
7. MacKendrick W, Caplan M, Hsueh W. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced injury in the rat. *Pediatr Res* 1993;34:222-8.
8. Cintra AE, Martins JL, Patricio FR, Higa EM, Montero EF. Nitric oxide levels in the intestines of mice submitted to ischemia and reperfusion: L-arginine effects. *Transplant Proc* 2008; 40:830-5.
9. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009;37:153-68.
10. Batshaw ML, Wachtel RC, Thomas GH, Starrett A, Brusilow SW. Arginine-responsive asymptomatic hyperammonemia in the premature infant. *J Pediatr* 1984;105:86-91.
11. He Q, Kong X, Wu G, Ren P, Tang H, Hao F, et al. Metabolomic analysis of the response of growing pigs to dietary L-arginine supplementation. *Amino Acids* 2009;37:199-208.
12. Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem* 2004;15:442-51.
13. Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32:83-91.
14. Zamora SA, Amin HJ, McMillan DD, Kubes P, Fick GH, Bützner JD, et al. Plasma L-arginine concentrations in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1997;131:226-32.

15. Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor AR, Bose CL, et al. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2000;137:785-93.
16. Richir MC, Siroen MP, van Elburg RM, Fetter WP, Quik F, Nijveldt RJ, et al. Low plasma concentrations of arginine and asymmetric dimethylarginine in premature infants with necrotizing enterocolitis. *Br J Nutr* 2007;97:906-11.
17. Neu J. Arginine supplementation and the prevention of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2002;140:389.
18. Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH, Butzner JD, Parsons HG, et al. Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr* 2002;140:425-31.
19. Ballard JL, Novak KK, Driver M. A simplified score for assessment of fetal maturation of newly born infants. *J Pediatr* 1979;95 (5 Pt 1):769-74.
20. Lemons JA, Reyman D, Moye L. Amino acid composition of preterm and term breast milk during early lactation. *Early Hum Dev* 1983;8:323-9.
21. Klein CJ. Nutrient requirements for preterm infant formulas. *J Nutr* 2002;132(6 Suppl 1):1395S-577.
22. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotising enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978;187:1-7.
23. Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:409-32.
24. Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:111-5.
25. Neu J. Arginine supplementation for neonatal necrotizing enterocolitis: are we ready? *Br J Nutr* 2007;97:814-5.
26. Batsha ML. Long term treatment of inborn errors of urea synthesis. In: Kleinberger G, Ferenci P, Riederer P, Thaler H, eds. *Advances in hepatic encephalopathy and urea cycle disease*. Basle (Switzerland):Karger;1984:187-95.
27. Urea Cycle Disorders Conference Group. Consensus statement from a conference for the management of patients with urea cycle disorders. *J Pediatr* 2001;138(1 Suppl):S1-5.
28. Fagerberg UL, Loof L, Merzoug RD, Hansson LO, Finkel Y. Faecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:468-72.
29. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derriex S, Aubert-Jacquin C, Barbot L, et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89:F353-5.
30. Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Paediatr* 2007;96:1531-3.
31. Campeotto F, Baldassarre M, Butel MJ, Viallon V, Nganzali F, Soulaïnes P, et al. Faecal calprotectin: cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48:507-10.
32. Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP. Faecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:107-8.
33. Yang Q, Smith PB, Goldberg RN, Cotten CM. Dynamic change of fecal calprotectin in very low birth weight infants during the first month of life. *Neonatology* 2008;94:267-71.
34. Kapel N, Campeotto F, Kalach N, Baldassarre M, Butel MJ, Dupont C. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:542-7.
35. Laforgia N, Baldassarre ME, Pontrelli G, Indrio F, Altomare MA, Di Bitonto G. Calprotectin levels in meconium. *Acta Paediatr* 2003;92:463-6.