

Jelitowa bariera immunologiczna

Nancy A. Louis, MD,*
Patricia W. Lin, MD*

Doktorzy Louis i Lin deklarują brak jakichkolwiek powiązań finansowych dotyczących niniejszego artykułu. Artykuł nie omawia produktu/urządzenia dostępnego na rynku, niedopuszczonego do stosowania ani będącego przedmiotem badań.

Cele: Po przeczytaniu tego artykułu czytelnik powinien umieć:

1. Opisać anatomiczne i biochemiczne mechanizmy obronne jelitowej bariery immunologicznej.
2. Wyjaśnić, w jaki sposób nabłonek rozpoznaje bakterie i na nie reaguje.
3. Scharakteryzować, w jaki sposób bakterie komensalne korzystnie wpływają na jelito człowieka.
4. Opisać, na czym polega niedojrzałość rozwojowa bariery jelitowej u noworodka urodzonego przedwcześnie.
5. Wiedzieć, w jaki sposób praktyka kliniczna może wpłynąć na optymalizację czynności jelitowej bariery immunologicznej.

STRESZCZENIE

Dojrzały nabłonek jelitowy obarczony jest wyjątkowymi zadaniami fizjologicznymi jako największy obszar wzajemnego oddziaływania ustroju gospodarza ze środowiskiem zewnętrznym. Jelito w pierwszym rzędzie musi pracować jako narząd trawienia i wchłaniania pokarmów, chroniąc się jednocześnie przed nieprzebraną florą jelitową, całym szeregiem różnych antygenów pokarmowych oraz stresem fizykochemicznym wywoływanym przez produkty trawienia i metabolizmu bakterii. Z tego względu nabłonek jelitowy musi być przepuszczalny dla płynów i składników odżywczych, ale jednocześnie pozostawać nieprzepuszczalny dla potencjalnie uszkadzających substancji chemicznych i patogenów. Jelito musi również odróżniać drobnoustroje komensalne, których wzrostowi powinno sprzyjać, od jelitowych drobnoustrojów chorobotwórczych, których namnażanie powinno zostać zahamowane lub które muszą być wyeliminowane. Pojedyncza warstwa komórek tworzących nabłonek jelitowy ma kluczowe znaczenie w utrzymaniu tej dynamicznej bariery. Rozwijające się jelito noworodka staje wobec dodatkowego poważnego wyzwania, jakim jest pomyślnie przeprowadzenie procesu przejścia z etapu jałowego narządu pozbawionego produktów metabolizmu bakteryjnego i trawienia pokarmów do fazy w pełni ukształtowanego „bioreaktora”, jakim jest jelito osoby dorosłej. W niniejszym przeglądzie przedstawiono wyjątkowe cechy anatomiczne bariery jelitowej oraz elementy składowe wrodzonej odporności ustroju gospodarza wykształcone przez tę dynamicznie funkcjonującą tkankę.

Wrodzone jelitowe mechanizmy immunologiczne

Nabłonek

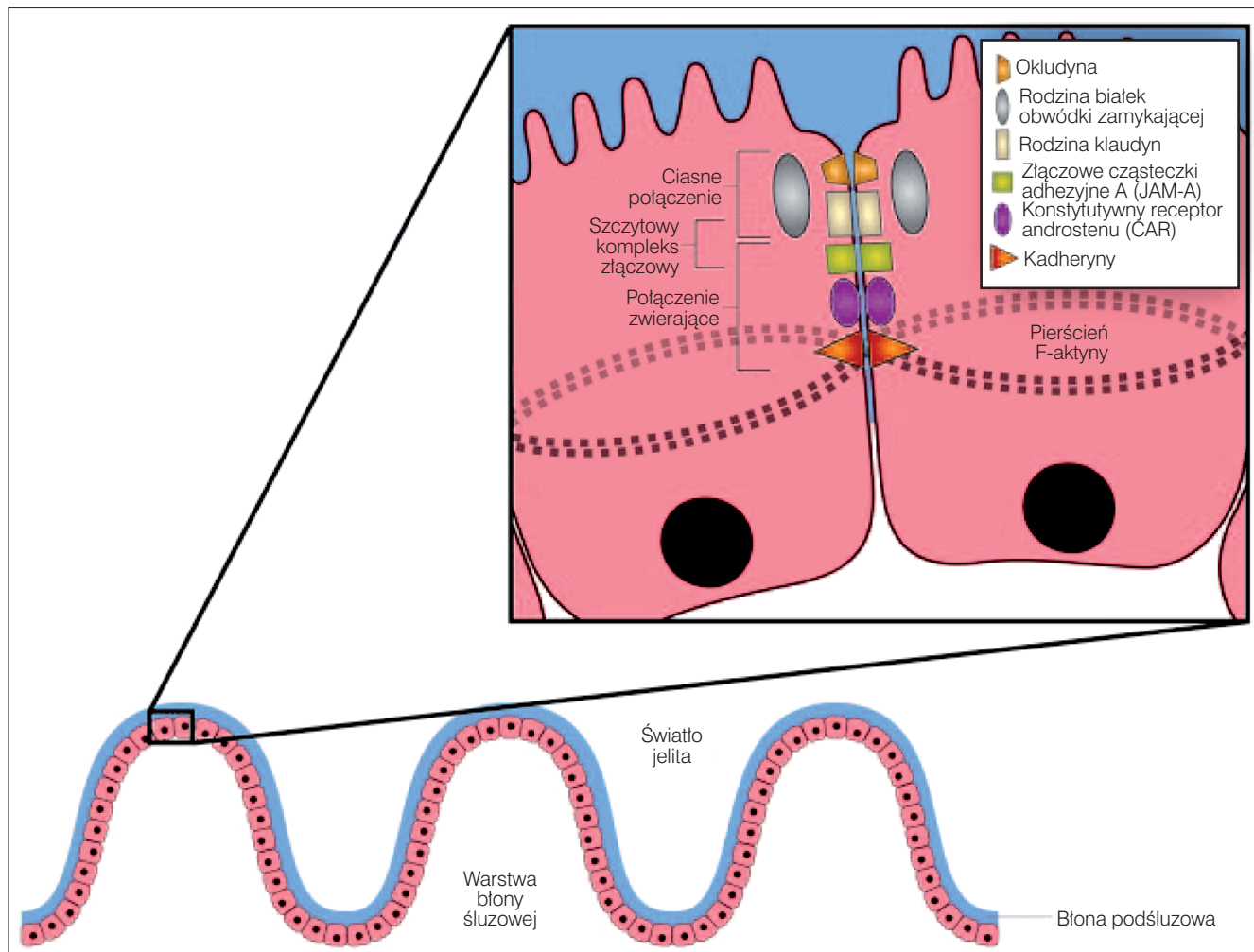
Nabłonek jelitowy reguluje transport jonów i składników odżywczych oraz dwukierunkowy przepływ płynów.¹ Powierzchnia błony śluzowej od strony światła jelita pozostaje w symbiotycznej relacji eukariotyczno-prokariotycznej z różnorodnym ekosystemem o liczebności $\times 10^{11}$ komórek/ml, który tworzy prawidłową florę jelitową. Te bakterie komensalne wpływają korzystnie na ustrój gospodarza, metabolizując witaminy i rozkładając kwasy żółciowe, a przy okazji wzrastając w bogatym w substancje odżywcze beztlenowym środowisku światła jelita, utrzymującym stałą temperaturę.² Kluczowe znaczenie dla właściwego strukturalnego rozwoju nabłonka jelitowego oraz czynności bariery jelitowej ma również interakcja między florą jelitową a ustrojem gospodarza. Po drugiej, czyli podśluzówkowej stronie nabłonka, będącej już wnętrzem ustroju gospodarza, występuje niezmiernie czuły układ biologiczny gotowy do odpowiedzi na wnikaające bakterie oraz produkty ich metabolizmu.

Jednowarstwowy nabłonek walcowaty oddziela ustrój gospodarza od światła jelita (ryc. 1). Około 200 metrów kwadratowych nabłonka ukształtowane jest w formie rozbudowanych wpukleń (krypt) i wypustek (kosmków). U podstawy krypt znajdują się komórki macierzyste, które mnożą się i różnicują do enterocytów, a następnie migrują ku szczytom kosmków, aby ostatecznie ulec

*Department of Pediatrics,
Division of Neonatal-Perinatal
Medicine, Emory University School
of Medicine, Atlanta Ga.

Skróty:

AJC	– szczytowy kompleks złączowy
EGF	– nabłonkowy czynnik wzrostu
IRF	– czynnik regulujący wydzielanie interferonu
LPS	– lipopolisacharyd
MAPK	– kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MAMP	– wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom
NEC	– martwicze zapalenie jelit
NF- κ -B	– czynnik jądrowy κ B
PRR	– receptory rozpoznające wzorce
PGN	– peptydoglikan
TLR	– receptory toll-podobne



RYCINA 1. Bariera anatomiczna utworzona przez nabłonek jelitowy. Pojedyncza warstwa nabłonka oddziela światło jelita od błony podśluzowej. Zlokalizowane przyszczytowo szczytowe kompleksy złączowe (apical junctional complex, AJC) chronią ustrój gospodarza, regulując przepływ międzykomórkowy. Kompleksy są utworzone przez ciasne połączenia oraz połączenia zwierające. Główne białka wchodzące w skład szczytowych kompleksów złączowych przedstawiono na rycinie.

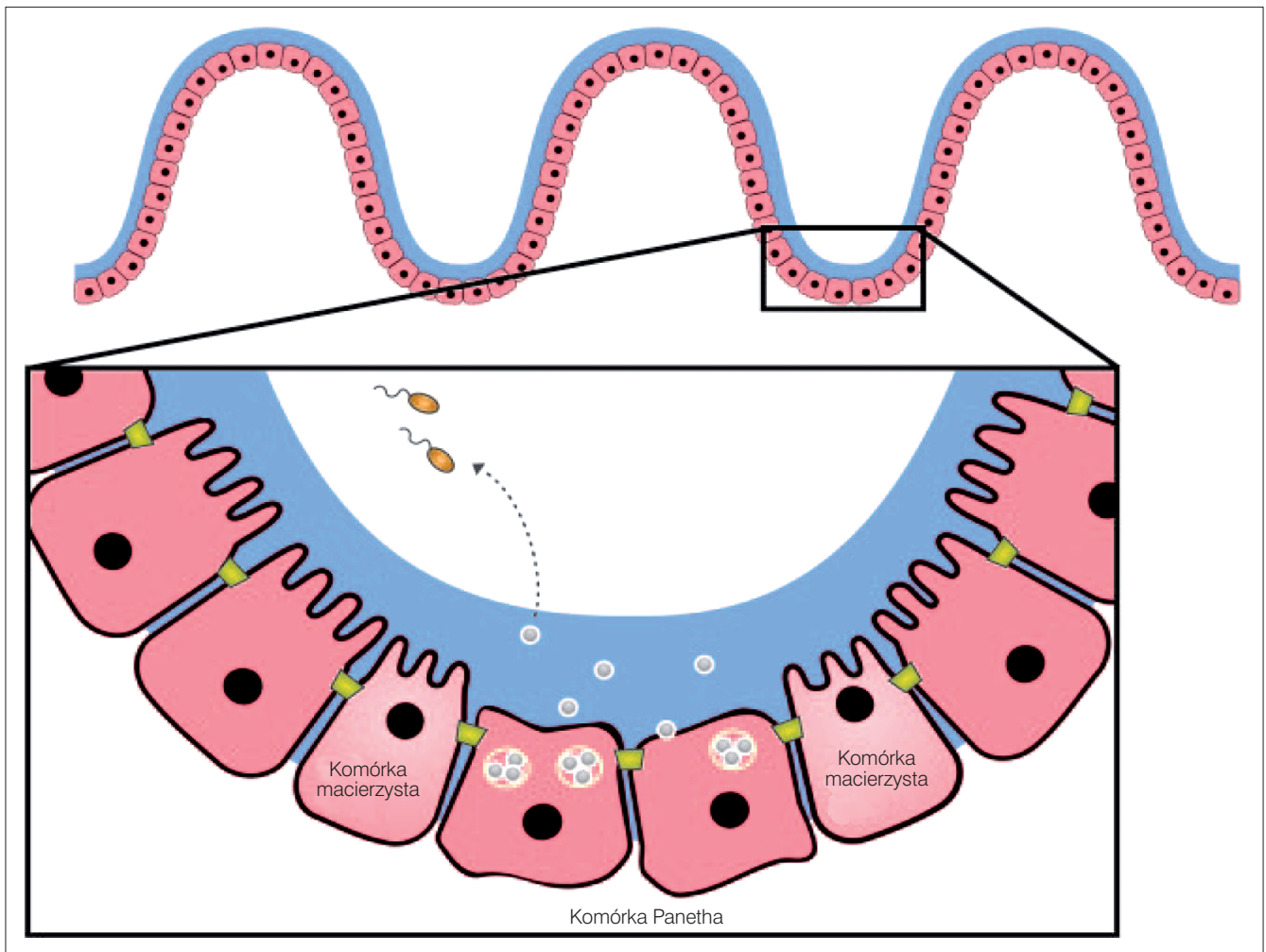
złuszczeniu do światła jelita w wyniku zjawiska zwanego anoikis (fizjologiczna postać apoptozy). Cały ten proces prowadzi do całkowitej wymiany komórek nabłonka co 5 dni.³ Tym samym niezwykła zdolność jelita do proliferacji i samoregeneracji stanowi jedną z form jelitowej obrony w przypadku uszkodzenia nabłonka.

Jednowarstwowy nabłonek jelitowy jest również fizycznie przystosowany do odseparowania i ochrony ustroju przed egzogennymi czynnikami stresogennymi. Mucyny, składające się z różnych kompleksów glikoprotein, są wydzielane przez wyspecjalizowane enterocyty (komórki kubkowe) i tworzą grubą warstwę ochronną na powierzchni błony śluzowej jelita.

Ta warstwa śluzu utrudnia bezpośrednie wiązanie się drobnoustrojów z nabłonkiem, powoduje agregację przylegających do niego bakterii oraz sprzyja ich usuwaniu przez zmniejszenie sił koniecznych do oderwania bakterii od nabłonka przez strumień treści pokarmowej przechodzącej

przez jelito. Mucyny zawierają także swoiste domeny wiążące białka, które wychwytyują i działają stabilizująco na kluczowe czynniki troficzne i naprawcze (np. nabłonkowy czynnik wzrostu [epidermal growth factor, EGF] oraz jelitowy czynnik [peptyd] trójlistny) na powierzchni nabłonka, mając tym samym potencjalny udział w jego odbudowie.^{4,5}

Integralność nabłonka podlega dalszej regulacji przy udziale przyszczytowych połączeń międzykomórkowych składających się z białek błonowych oraz kotwiczących cytoszkieletu, które wchodzą we wzajemne interakcje, tworząc tzw. połączenia ciasne oraz zwierające. Razem te struktury wchodzą w skład szczytowych kompleksów złączowych (apical junction complex, AJC) (ryc. 1). Głównymi białkami tworzącymi te kompleksy są: okludyna, kładyny, złączowe cząsteczki przylegania, receptory dla adenowirusów i wirusów Coxsackie oraz E-kadheryna. Szczytowe kompleksy złączowe są powiązane z cytoszkieletem cytoplazmy, tworząc pierścień F-aktynowy.



RYCINA 2. Komórki Panetha krypt jelitowych regulują wrodzone mechanizmy obronne jelit przez wydzielanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które z kolei kontrolują liczebność populacji drobnoustrojów i chronią sąsiadujące komórki macierzyste.

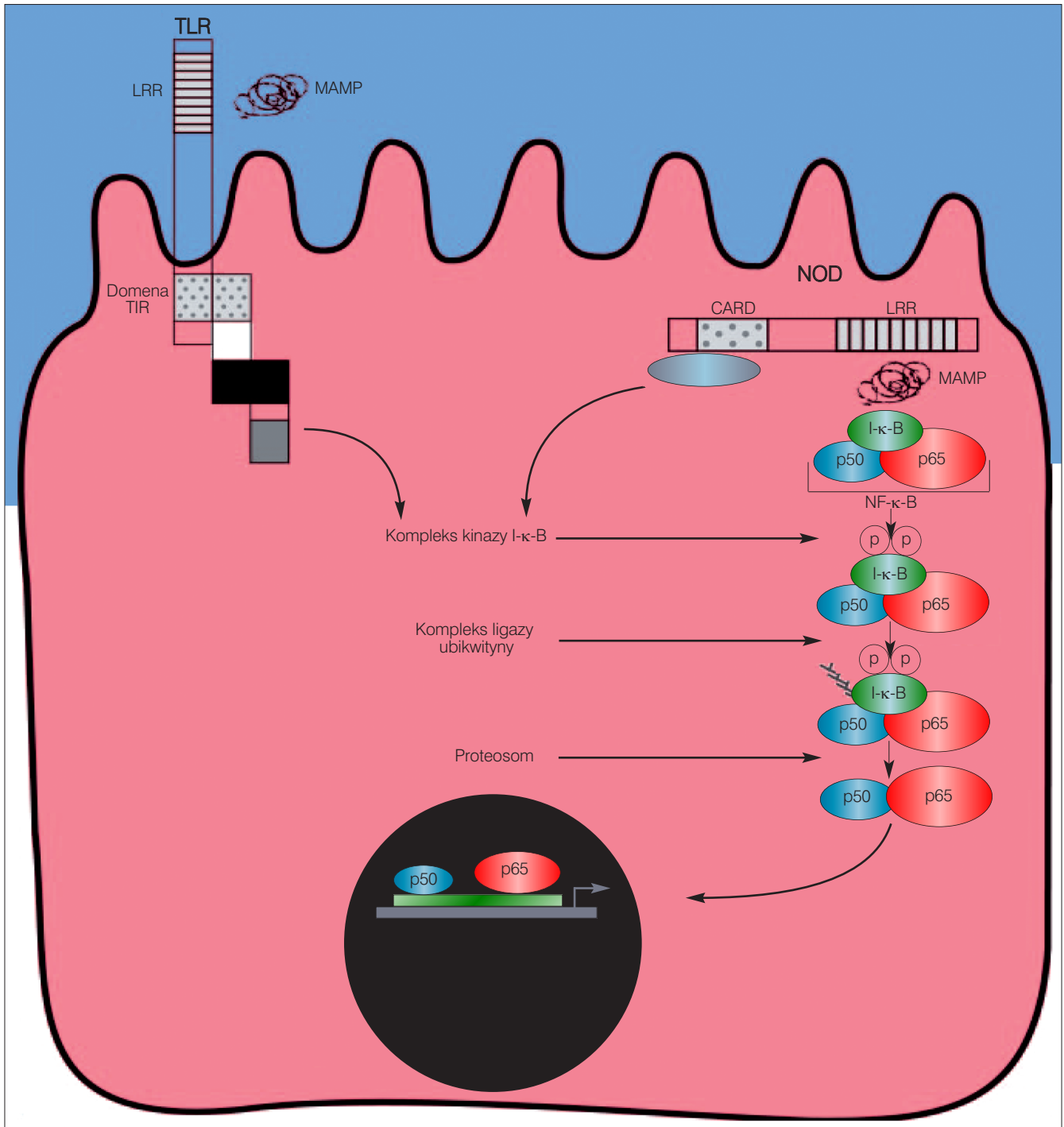
Te kompleksy łączą ze sobą komórki nabłonka jelitowego i regulują przepływ nawet małych cząsteczek i jonów między komórkami.⁶ Szczytowe kompleksy złączowe i ich połączenia z cytoszkieletem są strukturami dynamicznymi, podlegającymi regulacji przez sygnały fizjologiczne i patologiczne. Oprócz regulacji czynności bariery jelitowej białka AJC odgrywają ważną rolę w proliferacji i różnicowaniu komórek nabłonkowych.

Komórki nabłonkowe regulują również przepuszczalność nabłonka dla jonów i innych małych cząsteczek przez zmianę ekspresji selektywnych błonowych kanałów jonowych i porów. Enterocyty kontrolują wydzielanie jonów chlorkowych i wody przez kanały błonowe, czego wynikiem jest biegunka wydzielnicza, będąca innym mechanizmem obronnym, który może posłużyć do wypłukania niepożądanych drobnoustrojów chorobotwórczych lub toksyn ze światła jelita. Tym samym dojrzały nabłonek jest doskonale przystosowany do zapobiegania zakażeniu,

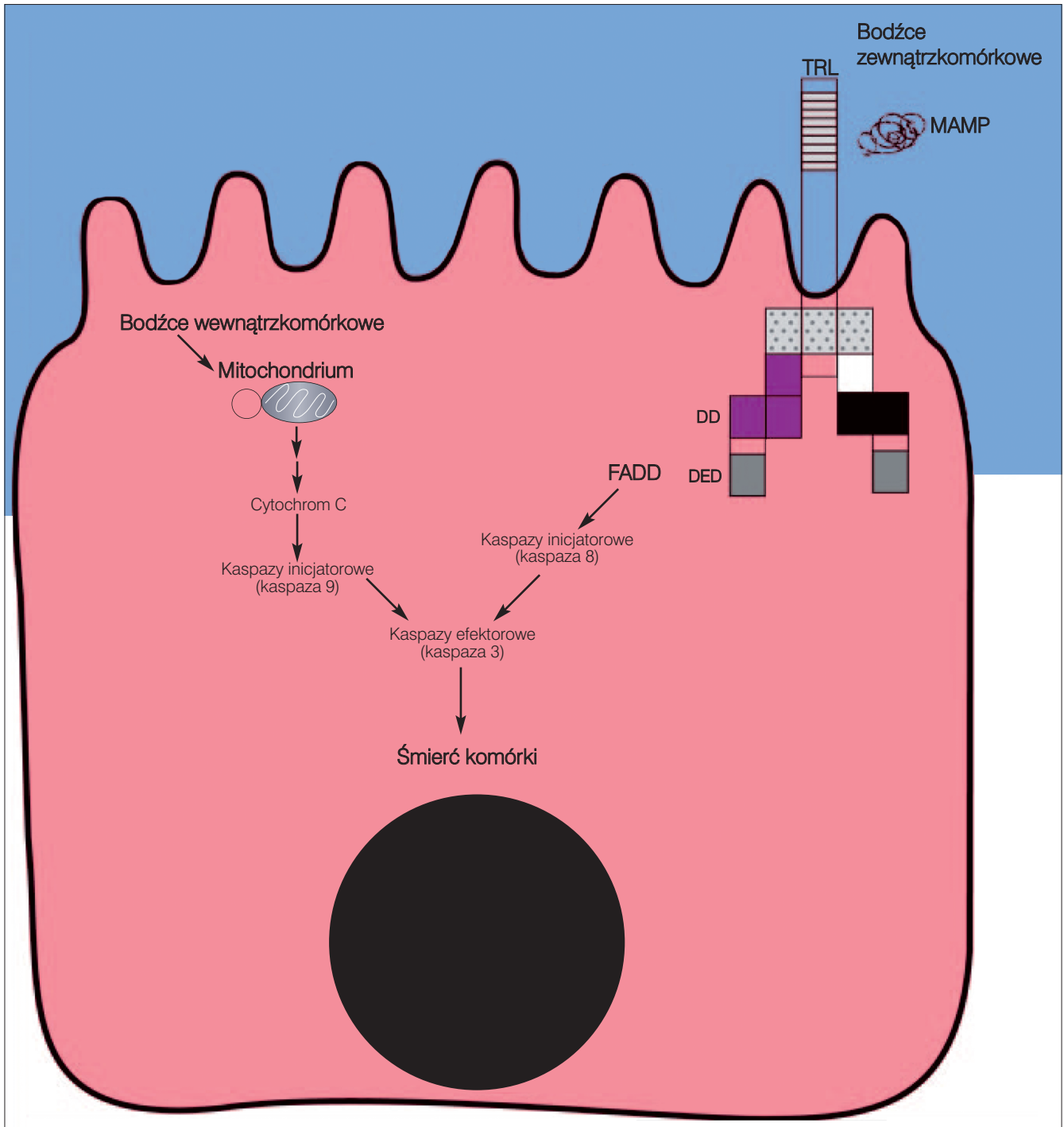
a także utrzymania lub przywrócenia czynności bariery jelitowej w odpowiedzi na atak od strony światła jelita.⁷

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Jelito ma także dobrze rozwinięte biochemiczne mechanizmy obronne w postaci substancji wydzielanych zarówno przez enterocyty uczestniczące w procesach wchłaniania, jak i komórki Panetha. Te drugie są wyspecjalizowanymi enterocytami wydzielniczymi, strategicznie zlokalizowanymi na dnie krypt jelita cienkiego, gdzie mogą kontrolować populację drobnoustrojów i ochraniać sąsiadujące komórki macierzyste (ryc. 2). Komórki Panetha wydzielają lizozym, fosfolipazę A₂ oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Te ostatnie dzielą się na dwie główne rodziny: defensyny (α i β) oraz katelicydyny.^{8,9} Te małe peptydy kationowe odkryto początkowo w ludzkich granulocytach obojętnochłonnych, w których odgrywają kluczową rolę w procesie niezależnego od tlenu zabijania drobnoustrojów.⁸

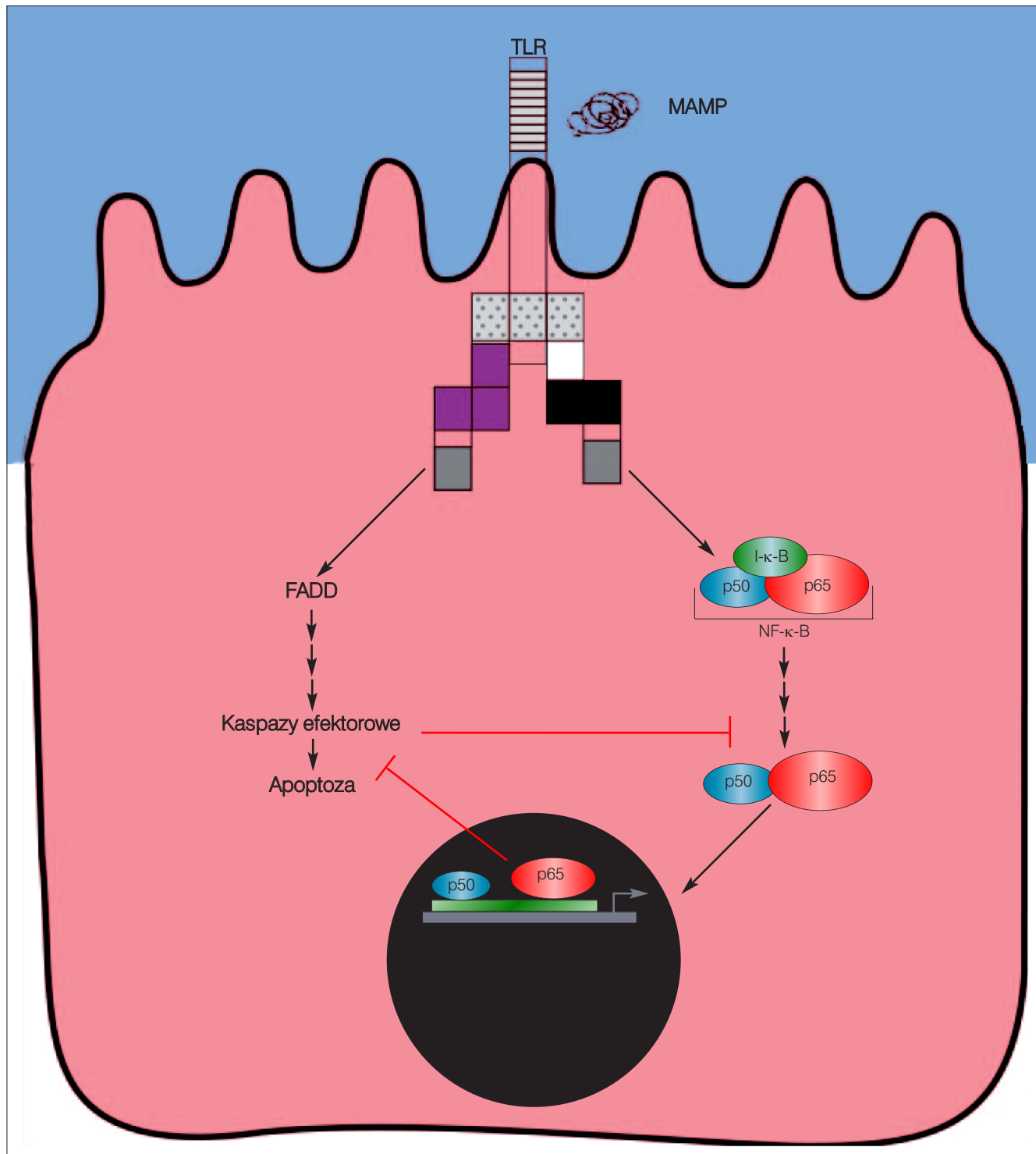


RYCINA 3. Szlak aktywujący czynnik jądrowy B (nuclear factor kappa B, NF-κ-B) jako przykład sygnalizacji cytoplazmatycznej w komórkach nabłonka jelitowego w odpowiedzi na wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom (microbial-associated molecular pattern, MAMP). NF-κ-B związany jest z jego inhibitorem (inhibitor B, I-κ-B), co sprawia, że jest nieaktywny w cytoplazmie. Liczne substancje sygnałowe pochodzące od drobnoustrojów (MAMP) mogą się wiązać z przezłonowymi receptorami toll-podobnymi (toll-like receptors, TLR) lub wewnątrzcytoplazmatycznymi białkami stanowiącymi domeny oligomeryzacyjne wiążące nukleotydy (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) i przekazywać sygnały przez pośrednie cytoplazmatyczne substancje sygnałowe w celu aktywacji kinazy I-κB. Ten kompleks powoduje fosforylację I-κB, który następnie podlega ubikwitynizacji i degradacji. Fosforylację oznaczono literą P, zaś ubikwitynizację przedstawiono w formie rąbka. Rozpad I-κ-B uwalnia NF-κ-B, który wnika do jądra komórkowego, gdzie łączy się z określonymi sekwencjami DNA i pobudza transkrypcję genów prozapalnych i przeciwapoptycznych. LRR – powtórzenia bogate w leucynę (leucine-rich repeats), NOD – domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy, CARD – domena rekrutująca i aktywująca kaspazę (caspase activating and recruiting domain),



RYCINA 4. Szlaki aktywacji apoptozy. W szlaku zewnątrzpochodnym wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom (MAMP) również przez pobudzenie receptorów inicjują apoptozę drogą aktywacji kaspazy 8. W szlaku wewnątrzpochodnym stres komórkowy aktywuje apoptozę przez uwalnianie z mitochondriów cytochromu c i następującą w wyniku tego aktywację kaspazy 9.

DD – domena śmierci (death domain), FADD – domena śmierci zależna od Fas (Fas-associated death domain), DED – domena efektorowa śmierci (death effector domain)



RYCINA 5. Równowaga między aktywnością szlaków prozapalnych i proapoptotycznych. Wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom (MAMP) aktywują równocześnie sygnalizację prozapalną i proapoptotyczną. Oba szlaki regulują nawzajem swoją aktywność przez czynniki kontrolujące, działające na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Zdrowie ustroju gospodarza zależy od delikatnej równowagi między aktywnością tych dwóch szlaków. Wpływ aktywujący zaznaczono strzałkami, natomiast hamujący – czerwonymi liniami.

Działanie przeciwdrobnoustrojowe peptydów jest wynikiem ich zdolności do wnikania w błony komórkowe szerokiej gamy komórek prokariotycznych, w tym bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów, pierwotniaków, krętków i wirusów otoczkowych. Po wnikięciu w błonę komórkową tworzą pory, które umożliwiają przepływ anionów przez błonę, prowadząc do jej depolaryzacji i zabicia drobnoustroju.¹⁰

Defensyny i katelicyny są klasami strukturalnie wysoce konserwatywnych cząsteczek wytwarzanych przez komórki wydzielnicze i fagocytarne. Katelicyny (LL-37/hCAP-18) (LL-37 jest propeptydem, a hCAP-18 peptydem właściwym – przyp. tłum.) są małymi, prostymi, wydłużonymi peptydami występującymi na dnie krypt okrężnicy, natomiast defensyny wykazują szersze rozpowszechnienie w tkankach i tworzą złożoną strukturę β fałdową przy udziale sześciu reszt cysteinowych powiązanych mostkami dwusiarczkowymi. Zarówno w komórkach wydzielniczych, jak i fagocytarnych defensyny α magazynowane są w ziarnistościach w postaci prekursorowej i wymagają późniejszej aktywacji przez potranslacyjne rozszczepienie. W jelicie komórki Panetha wydzielają defensyny α (ludzka defensyna HD5 i HD6) w odpowiedzi na bodźce cholinergiczne lub pod wpływem drobnoustrojów, przyczyniając się do utrzymania względnie jałowego i chronionego środowiska w obrębie krypt jelitowych. Komórki nabłonka jelitowego wydzielają przede wszystkim defensyny β (hBD1, 2 i 3) wykazujące swoistą dystrybucję tkankową zmieniającą się na przebiegu jelita, zależnie od ich rodzaju.¹⁰

Wyniki badań *in vitro* wskazują, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą mieć zarówno pośredni (przez wyzwalenie odpowiedzi ustroju), jak i bezpośredni (przez zabijanie drobnoustrojów) wpływ na mechanizmy obronne gospodarza.¹¹ Katelicyny i defensyny mogą wykazywać działania prozapalne przez aktywację procesu uwalniania chemokin, co powoduje chemotaksję i różnicowanie komórek układu immunologicznego. Defensyny uwolnione do krypty jelitowej mogą pobudzać wydzielanie jonów chlorkowych z pobliskich enterocytów w celu wypłukania drobnoustrojów chorobotwórczych i toksyn z otoczenia wrażliwych komórek macierzystych. W przyszłych badaniach konieczne będzie scharakteryzowanie roli tych dodatkowych, pobudzanych przez defensyny i katelicyny, zjawisk modulujących czynność układu immunologicznego w warunkach *in vivo*.

Odpowiedź zapalna

Odpowiedź zapalna jest ważnym niewrodzonym mechanizmem obronnym, który aktywuje się wtedy, gdy potencjalnie uszkodzające bodźce przełamują barierę nabłonka jelitowego. Kiedy ustrój gospodarza odbierze sygnały o uszkodzeniu tkanek lub przeniknięciu potencjalnie chorobotwórczych drobnoustrojów, następuje aktywacja dołądnie zaprogramowanej i regulowanej odpowiedzi zapalnej, powodującej rekrutację krwinek białych, które mają wesprzeć mechanizmy obronne. Proces zapalny mo-

gą zapoczątkować liczne sygnały egzogenne i endogenne, pobudzające miejscowe uwolnienie rozpuszczalnych mediatorów zapalnych oraz substancji chemotaktycznych, które zwiększają przepuszczalność naczyń i przyciągają komórki zapalne. Prowadzi to do rozwoju zmian histopatologicznych w postaci obrzęku i nacieku leukocytarne-go, obserwowanych w tkankach zmienionych zapalnie.

Monitorowanie przez nabłonek drobnoustrojów chorobotwórczych.

Szlaki, przez które przebiega nadzór mikrobiologiczny i odpowiedź skierowana przeciwko drobnoustrojom, są dobrze ustalone.¹² Niemal wszystkie organizmy wielokomórkowe wykształciły liczne receptory rozpoznające wzorce (pattern recognition receptor, PRR), które rozpoznają i są aktywowane pod wpływem molekularnych wzorców towarzyszących drobnoustrojom (microbial-associated molecule pattern, MAMP), co w konsekwencji prowadzi do aktywacji dalszych etapów szlaku sygnałowego. Wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom są biochemicznymi motywami, ograniczonymi do danego drobnoustroju, który określa.¹³ Zawierają one kwasy nukleinowe (DNA bogaty w sekwencje CpG [cytozyna-fosforan-guanina], dwuniciowy RNA), niemodyfikowane polipeptydy (flagellina) oraz złożone związki wielkocząsteczkowe, takie jak lipopolisacharydy (LPS), peptydoglikany (PGN) i lipoproteiny. Można identyfikować określone klasy drobnoustrojów, rozpoznając towarzyszące im wzorce molekularne. Na przykład genomy wirusowe kodują dwuniciowy RNA, ściany komórkowe bakterii Gram-ujemnych zawierają lipopolisacharydy, zaś w Gram-dodatnich występuje peptydoglikan.

Receptory rozpoznające wzorce występują w komórkach eukariotycznych, które swoście wchodzi w interakcje z jednym lub wieloma MAMP. U ssaków najbardziej znanymi, rozpoznającymi wzorce są receptory toll-podobne (toll-like receptor, TLR). Ludzki genom zawiera przynajmniej 10 znanych receptorów tego rodzaju. Intensywnie prowadzone badania naukowe powodują częste rewizje wiedzy na temat wspomnianych receptorów i ich liganów.¹⁴ Receptory toll-podobne są przezblonowe i zawierają dwa wysoce konserwatywne motywy strukturalne. We fragmencie zewnątrzkomórkowym występuje domena zawierająca powtórzenia bogate w leucynę, a jego zadaniem jest rozpoznawanie i wiązanie MAMP. Fragment wewnątrzkomórkowy zwany domeną TIR (toll/IL-1R/plant resistance) wchodzi w interakcje z przetwarzającymi sygnały białkami cytoplazmatycznymi i je aktywuje.¹⁵

Co istotne, drobnoustroje komensalne również zawierają MAMP. Muszą zatem istnieć mechanizmy odróżniające aktywację receptorów rozpoznających wzorce w odpowiedzi na drobnoustroje chorobotwórcze od aktywacji wywołanej przez mikroflorę komensalną. Strategiczna lokalizacja PRR za barierą nabłonkową zapobiega ich aktywacji przez drobnoustroje nieinwazyjne, a bakterie chorobotwórcze można w prosty sposób odróżnić od komensalnych na podstawie ich zdolności do inwazji i dostępu do tych swoistych PRR. Na przykład receptory toll-podobne 5 (TLR5)

zlokalizowane są wzdłuż podstawno-bocznej powierzchni błony komórkowej, poniżej ciasnych połączeń międzykomórkowych, gdzie są chronione przed działaniem zawartości światła jelita, pod warunkiem, że nie doszło do naruszenia integralności komórek. Mają zatem służyć do monitorowania zaburzeń kontaktu komórka-komórka.¹⁶

Dystrybucja niektórych PRR ogranicza się do błon wakuoli wewnątrzkomórkowych, w których mogą monitorować potencjalnie niebezpieczny materiał pobrany przy udziale komórkowej endocytozy lub pinocytozy.¹⁷ Przetwarzanie (transdukcja) sygnału w cytoplazmie także może podlegać kontroli w celu regulacji niewłaściwych sygnałów wysyłanych przez TLR.¹⁸ Chorobotwórcze bakterie jelitowe (*Shigella*, *Listeria*) oraz wirusy, których cykl życiowy ma w swoim przebiegu fazę wewnątrzkomórkową, mogą być wykrywane przez przedstawicieli rodziny domen oligomeryzacyjnych wiążących nukleotydy (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD). Są to cytoplazmatyczne PRR, które mogą wykrywać rozpuszczalne MAMP pochodzące z dokonujących inwazji bakterii, które nie zostały wykryte przez receptory powierzchniowe.¹⁹ Jak z tego wynika, komórki eukariotyczne wykształciły swoiste mechanizmy mające za zadanie wykrywanie śladów pozostawionych przez organizmy prokariotyczne.

Reakcja nabłonka na drobnoustroje. Wiązanie się receptorów rozpoznających wzorce z ich wzorcami molekularnymi towarzyszącymi drobnoustrojom prowadzi do aktywacji cytoplazmatycznych szlaków sygnałowych. Zalicza się do nich klasyczny szlak Rel/czynnik jądrowy κ B (NF- κ -B), kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (mitogen-activated protein kinase, MAPK) oraz czynnika regulującego wydzielanie interferonu (interferon regulatory factor, IRF).¹¹ Wszystkie trzy szlaki podlegają regulacji przy udziale kilku cytoplazmatycznych białkowych produktów pośrednich, które przekazują sygnały potranslacyjne przez ściśle kontrolowane procesy tworzenia wiązań kowalencyjnych (fosforylacja i ubikwitynizacja), które z kolei powodują aktywację i translokację jądrową określonych czynników transkrypcyjnych (ryc. 3). Swoiście podczas początkowych zdarzeń związanych z percepcją bakterii przez komórki nabłonkowe w ciągu kilku minut następuje aktywacja NF- κ -B, kinazy białkowej aktywowanej mitogenami oraz czynnika regulującego wydzielanie interferonu 3, co prowadzi do jądrowej translokacji czynników transkrypcyjnych oraz transkrypcyjnej aktywacji bardzo wielu cząstek efektorowych. W prowadzonych na szeroką skalę badaniach profili ekspresji ujawniono indukcję ekspresji enzymów odpowiadających za dalsze etapy ścieżki sygnałowej odgrywających ważną rolę w zabijaniu bakterii oraz gojeniu ran, jak również peptydów przeciwbakteryjnych, cytokin, cząsteczek przylegania, przekaźników chemotaksji i białek przeciwapoptotycznych.^{11,20}

Większość genów kodujących substancje efektorowe odpowiedzi zapalnej zawiera sekwencje promotorowe swoiste dla wiązania NF- κ -B,²¹ a całość odpowiedzi zapalnej

można podzielić na wczesną i późną. Kluczowe geny pośredniczące we wczesnej odpowiedzi zapalnej również podlegają regulacji transkrypcyjnej przy udziale białek cJun i CREB/ATF (cyclic AMP response element binding protein/activating transcription factor), które są kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi w szlaku sygnałowym kinazy białkowej aktywowanej mitogenami. Do elementów składowych tej odpowiedzi należy zwrotne pobudzenie ekspresji genów dla chemokin swoistych dla granulocytów obojętnochłonnych oraz cząstek adhezyjnych swoistych dla krwinek białych, co prowadzi do rekrutacji i nagromadzenia komórek zapalnych oraz powstania klasycznych zmian histologicznych ostrego zapalenia. W przeciwieństwie do tego w późnej odpowiedzi zapalnej uczestniczą geny bardziej jednolicie regulowane przez szlaki kontrolujące wydzielanie interferonu przy udziale elementów promotorowych swoistych dla czynnika regulującego wydzielanie interferonu. Podczas tej późniejszej fazy zapalenia wytwarzane są dodatkowe chemokiny, czynniki wzrostowe oraz cząstki adhezyjne, co prowadzi do rekrutacji monocytów i komórek fagocytarnych i w rezultacie do dalszego rozwoju nacieku zapalnego i tworzenia ziarniniaków. Ostatecznie za fagocytującymi granulocytami obojętnochłonnymi podążają czasami makrofagi immunoregulatorowe oraz immunokompetentne limfocyty, powodujące ustąpienie działania bodźca zapalnego i wytworzenie odporności adaptacyjnej.²²

Równowaga między zapaleniem a apoptozą

Czynniki chorobotwórcze i inne stresogenne równocześnie aktywują zarówno wrodzone szlaki prozapalne (np. NF- κ -B), powodując komórkową reakcję zapalną, jak i szlaki proapoptotyczne, które razem współdziałają w celu wyeliminowania zakażonych lub nieodwracalnie uszkodzonych komórek. Apoptoza lub inaczej programowa śmierć komórki jest wrodzonym mechanizmem, przy udziale którego mogą być eliminowane poszczególne uszkodzone komórki, przy zachowaniu komórek do nich przylegających.²³ Podobnie jak zapalenie, apoptoza jest ściśle regulowana przez kilka przekaźników sygnałowych (ryc. 4). Kaspazy efektorowe (swoiste proteazy cysteinowo-asparaginianowe) pozostają w postaci nieaktywnego zymogenu do momentu przetworzenia przy udziale potencjalizującej kaskady kaspaz inicjujących, działających na wcześniejsze etapy szlaku sygnałowego. Wspomniane proteazy powodują ograniczonego stopnia proteolizę komórkowych białek strukturalnych i regulatorowych, co prowadzi do rozpadu komórki bez szkodliwego wpływu na otaczające tkanki.²³

Do aktywacji kaspaz może dochodzić przy udziale kilku różnych mechanizmów (ryc. 4). W przypadku szlaku zewnątrzpo pochodnego zewnątrzkomórkowe wiązanie liganu prowadzi do aktywacji kompleksów receptorów śmierci, które pośredniczą w łączeniu białek zawierających motyw „domeny śmierci” z wtórnymi białkami adaptorowymi zawierającymi zarówno domeny śmierci, jak również

„domeny efektorowe śmierci”.²⁴ Dochodzi tym samym do utworzenia kompleksu białek efektorowych apoptozy i ostatecznej aktywacji inicjującej kaspazy 8, która z kolei aktywuje następne kaspazy efektorowe (np. kaspazę 3). Receptory toll-podobne i NOD także mogą aktywować zewnątrzpochodny szlak apoptozy.^{25,26} Alternatywnie, w szlaku wewnątrzpochodnym cały szereg komórkowych czynników stresogennych (zaburzenia metaboliczne, uszkodzenie DNA, niedobór czynników wzrostowych/hormonów) może zaburzyć równowagę istniejącą między pro- i przeciwapoptocznymi składnikami rodziny białek Bcl-2, co sprzyja tworzeniu „porów” mitochondrialnych i w następstwie tego dochodzi do wycieku mitochondrialnego cytochromu c do cytozolu.²⁷ Cytoplazmatyczny cytochrom c służy jako jądro tworzenia kompleksu rusztowań określanego mianem apoptosomu, który aktywuje inicjującą kaspazę 9 i dalsze kaspazy efektorowe. Zatem komórki odbierające bodziec potencjalnie uszkadzający, czy to mikrobiologiczny, czy to fizyczny (np. niedotlenienie), rutynowo aktywują równocześnie szlaki prozapalne i proapoptocyczne.

Obecnie wiemy, że aktywacja NF- κ -B stanowi dla odmiany szlak prowadzący do przeżycia komórki. Opierając się na modelu myszy genetycznie modyfikowanych, wykazano, że ten czynnik spełnia kluczową rolę w kontrolowaniu apoptozy przez zwrotne pobudzenie ekspresji genów kodujących przeciwapoptocyczne białka efektorowe, a tym samym w zapobieganiu aktywacji kaspaz i blokowaniu sygnałów apoptocycznych w kluczowych miejscach kontroli tego procesu (ryc. 5). To pozwala na postępowanie kaskady zapalnej przy braku apoptozy. Efektory apoptozy mogą również regulować przebieg procesu zapalnego przez udział w kontrolowanym przez kaspazy procesie degradacji pośrednich produktów szlaków sygnałowych procesu zapalnego. Apoptoza może być wartościowym mechanizmem obronnym ustroju gospodarza dzięki umożliwieniu zakażonej lub poddanej stresowi komórce samozniszczenia bez jej rozpadu, a w konsekwencji eliminacji czynnika stresogennego lub drobnoustroju dokonującego inwazji komórki bez jednoczesnego indukowania wtórnego zapalenia.^{11,20}

Wprawdzie zapalenie jest podstawowym mechanizmem obronnym skierowanym przeciwko drobnoustrojom jelitowym, jednak aktywacja granulocytów obojętnochłonnych i uwalnianie substancji utleniających oraz proteaz uszkadza sąsiednie komórki i tkanki. Wynikiem tego może być zaburzenie integralności nabłonka oraz niepotrzebny dostęp dla drobnoustrojów, które w normalnych warunkach nie przeniknęłyby przez barierę nabłonkową. Wobec naruszenia ciągłości tej bariery błona podśluzowa zostaje narażona na ekspozycję na inne szkodliwe składniki treści jelitowej, co prowadzi do rozwoju zjawiska błędnego koła, w którym stale zachodzi aktywacja czynników prozapalnych i uszkodzenie tkanek. Bez prawidłowej odpowiedzi zapalnej jelito jest podatne na przerost flory bakteryjnej i potencjalnie niekontrolowany przebieg apoptozy, co rów-

nież zagraża integralności nabłonka. Zdrowie jelita i całego ustroju gospodarza zależy zatem w dużym stopniu od zachowania tej dynamicznej równowagi między pobudzaniem i wygaszaniem odpowiedzi zapalnej (ryc. 5). Zbyt nasilony proces zapalny może spowodować zbyt duże uszkodzenie otaczających tkanek, ale za słaby może prowadzić do nadmiernej aktywacji szlaków autodestrukcji (apoptozy). I jedna, i druga sytuacja może być przyczyną nieodwracalnych uszkodzeń w ustroju gospodarza. Ponieważ te szlaki są kluczowe dla przeżycia komórek, lekarze klinicyści muszą zachować ostrożność przy podejmowaniu decyzji o zastosowaniu leków przeciwzapalnych w kontekście stresu komórkowego.

Niedojrzałość rozwojowa bariery jelitowej u noworodka

Dojrzały nabłonek jelitowy wykształcił się, aby zrównoważyć wyspecjalizowane czynności związane z odżywianiem oraz funkcje bariery ochronnej. Przed rozwijającym się jelitem stoi jednak wyjątkowe wyzwanie, wynikające ze zmieniających się potrzeb żywieniowych występujących w okresie charakteryzującym się ogromnym tempem wzrastania, gdy siłą rzeczy musi podlegać adaptacji będącej odpowiedzią na szybko zmieniającą się bakteryjną florę jelitową. Jelito wcześniaka prawdopodobnie poddawane jest jeszcze większym wyzwaniom wynikającym z konfrontacji ze stresem związanym z kolonizacją bakteryjną w momencie, gdy zarówno bariera jelitowa, jak i odpowiedź immunologiczna są niedojrzałe. Jak się wydaje, tego rodzaju niedojrzałość powoduje zakłócenie delikatnej równowagi między procesami zapalenia i apoptozy, co sprzyja niekontrolowanemu rozwojowi zapalenia i uszkodzeniu tkanek w postaci martwiczego zapalenia jelit (necrotizing enterocolitis, NEC).

Struktura bariery nabłonkowej jelita pierwotnego rozwija się do końca pierwszego trymestru ciąży.²⁸ Enterocyty i komórki kubkowe pojawiają się do 8 tygodnia ciąży, zaś układ architektoniczny nabłonka jelitowego organizuje się w krypty i kosmki do 12 tygodnia. Ciasne połączenia można stwierdzić w 10 tygodniu ciąży, a jelito płodowe może rzekomo regulować ich organizację.²⁹ Obwody regulujące zdolności wydzielnicze i absorpcyjne błony śluzowej jelit nie są jednak w pełni rozwinięte. Te układy wymagają obecności czynników wzrostowych i troficznych w płynie owodniowym, aby doszło do zapoczątkowania procesu ich dojrzewania między 26 tygodniem ciąży a porodem o czasie.³⁰

Podobnie ochronna czynność wydzielnicza jelita płodu występuje już we wczesnej fazie ciąży i podlega procesowi dojrzewania przez cały jej okres. Ekspresja genów dla mucyny pojawia się do 6,5 tygodnia ciąży, ale jej charakter i dystrybucja nie odzwierciedlają przed 23-27 tygodniem obrazu ekspresji typowego dla dorosłych.³¹ Komórki Panetha pojawiają się do 12 tygodnia ciąży i zaczynają wytwarzać defensyny w 13 tygodniu, a lizozym w 20.^{28,32} Liczba komórek Panetha oraz ekspresja defensyn α nie są

jednak w pełni rozwinięte w jelitach wcześniaków urodzonych w 24 tygodniu ciąży. Ponadto, chociaż w preparatach operacyjnych stwierdza się, iż martwicze zapalenie jelit indukuje zwiększenie liczby komórek Panetha i transkryptów defensyn α , to rzeczywista liczba tych ostatnich mierzona w komórkach Panetha nadal jest niedostateczna.³³ Ostatecznie kluczowe znaczenie ma też wzrost jelita na długość, który zachodzi w największym stopniu podczas drugiego trymestru ciąży, ale trwa do 3-4 roku życia.³⁴

Jak wcześniej wspomniano, jałowe jelito płodu jest *in utero* dziewicze dla MAMP. W ciągu kilku dni po urodzeniu jelito noworodka zostaje poddane działaniu wielu MAMP w miarę zasiedlania jego światła przez florę bakteryjną. Co więcej, jej skład stale się zmienia i ewoluuje w ciągu pierwszego roku życia.³⁵ Zatem dojrzewanie receptorów rozpoznających MAMP prawdopodobnie również podlega regulacji podczas rozwoju jelita. Wyniki wstępnych badań wskazują, że PRR TLR2 i TLR4 podlegają ekspresji w podstawno-bocznych odcinkach płodowych krypt jelitowych już w 20 tygodniu ciąży.³⁶

Łatwo wysunąć hipotezę, że niedojrzałość rozwojowa ekspresji lub czynności tych receptorów może prowadzić do zmian w jelitowej barierze immunologicznej i rozwoju NEC. Rzeczywiście, wyniki ostatnich badań wskazują, że lipopolisacharydowy TLR4 może odgrywać kluczową rolę w patogenezie tego zapalenia. Co więcej, wyniki badań *in vitro* wykazują, że odpowiedź niedojrzałych komórek nabłonka jelitowego po stymulacji może być niewłaściwa i powodować nadmierną reakcję zapalną (mierzoną wydzielaniem klasycznej cytokiny prozapalnej, jaką jest interleukina 8).³⁷ Chociaż znaczenie tej nadmiernej odpowiedzi zapalnej w procesie rozwoju jelita pozostaje niejasne, prawdopodobnie niekontrolowany proces zapalny może przyczynić się również do niekontrolowanego uszkodzenia tkanek w NEC.

Niewłaściwa regulacja apoptozy może także odgrywać rolę w powstawaniu chorób w niedojrzałym jelicie. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań sugerują, że nieprawidłowo przebiegająca apoptoza może w rzeczywistości być zdarzeniem inicjującym wystąpienie NEC.³⁸ Można z przekonaniem stwierdzić, że wczesne zmniejszenie nasilenia sygnałów zapalnych w okresie rozwojowym może predysponować jelito wcześniaka do nadwrażliwości na apoptozę. Nieodpowiednio przebiegający proces apoptozy mógłby następnie powodować przerwanie bariery jelitowej, umożliwiając tym samym dostęp treści jelitowej do wrażliwej warstwy podśluzowej i pobudzanie odpowiedzi zapalnej. Pozostaje do ustalenia, jaki te zaburzenia mają udział w regulacji procesu zapalnego i odpowiedzi apoptotycznej. Wydaje się, że w tym wypadku znaczenie mają oba zjawiska, przy czym – być może – każde z nich dominuje w określonych etapach patogenezy NEC. Wobec braku postępu w zapobieganiu porodom przedwczesnym kluczową rolę w ochronie tych najmłodszych pacjentów może odegrać lepsze zrozumienie sposobów zachowania jelitowej bariery immunologicznej.

Zagadnienia kliniczne dotyczące optymalizacji czynności bariery jelitowej u noworodków

Dieta i sposób odżywiania

W wielu badaniach wykazano wpływ czynników pochodzących ze światła jelita na jego rozwój. Połykanie płynu owodniowego rozpoczyna się w 16 tygodniu ciąży i dostarcza kluczowych mediatorów, takich jak nabłonkowy czynnik wzrostu oraz poliaminy, które stymulują różnicowanie i wzrost jelita.^{28,39} Po urodzeniu kluczową rolę odgrywają hormony i czynniki wzrostowe zawarte w mleku kobiecym, które stymulują wzrost nabłonka jelitowego⁴⁰ oraz dojrzewanie jelitowej odpowiedzi immunologicznej.⁴¹ Ponadto mleko kobiece zawiera przeciwciała, cytokiny, komórki układu odpornościowego, oligosacharydy i inne czynniki chroniące niedojrzałe jelito przed uszkodzeniem przez korygowanie niedoborów związanych z rozwojem jelita (dostarczanie wydzielniczej immunoglobuliny A i lizozymu), poprawę czynności bariery jelitowej, ograniczanie zapalenia oraz sprzyjanie kolonizacji jelita przez prawidłową florę komensalną.⁴² Niedożywienie może upośledzać wytwarzanie mucyny i innych czynników mających kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu bariery jelitowej.⁴³

Oczywiste i teoretyczne korzyści płynące z żywienia dojelitowego, szczególnie mlekiem kobiecym, często stawiają neonatologów w trudnej sytuacji wymagającej rozważenia korzyści wynikających z rozpoczęcia żywienia wobec ryzyka wywołania stresu w jelicie pacjenta, które i tak jest już niestabilne. U noworodków urodzonych przedwcześnie żywienie troficzne zwiększa uwalnianie hormonów przewodu pokarmowego i nasila aktywność enzymów trawiennych, zwiększając przy tym przepływ krwi w jelitach i ich perystaltykę. Ten połączony wpływ wczesnego żywienia troficznego objawia się klinicznie jako poprawa tolerancji karmienia i wzrastania. Co więcej, wyniki badań klinicznych wykazały, że u wcześniaków, które otrzymały wczesne żywienie troficzne, nie występowało zwiększone ryzyko rozwoju martwiczego zapalenia jelit,^{34,44} a czas pobytu w szpitalu był krótszy, przy mniejszej zapadalności na posocznicę. Ponieważ karmienie mlekiem kobiecym jest optymalnym sposobem żywienia w większości sytuacji, należy zachęcać do wprowadzania wczesnego żywienia troficznego.

Równowaga elektrolitowa

Wspomaganie optymalnej czynności jelitowej bariery immunologicznej można również osiągnąć dzięki starannemu utrzymywaniu równowagi wodno-elektrolitowej. Tworzenie komórek Panetha oraz uwalnianie defensyn nie jest w pełni rozwinięte w jelicie noworodków urodzonych o czasie, zaś antybiotyki o szerokim zakresie działania mogą jeszcze bardziej hamować ekspresję defensyn.⁴⁵ Wprawdzie ostatnie osiągnięcia farmakologii budzą nadzieję na dostęp w przyszłości do egzogennych defensyn,⁴⁶ to obecnie czynione wysiłki ograniczają się do optymalizacji endogennego wytwarzania tych kluczowych cząstek.

Liczne dowody naukowe wskazują, że właściwie utrzymywana homeostaza elektrolitów może pomóc w pobudzeniu wytwarzania defensyn.⁴⁷ Na modelach mysich wykazano, że wydzielanie tych związków przez komórki Panetha zależy od aktywności kanału potasowego zależnego od jonów wapnia, co wskazuje na znaczenie homeostazy tych dwóch rodzajów jonów. Wyniki dalszych badań wykazały, że myszy niepozbawione genu kluczowego dla transportu jonów chlorkowych przez błonowego regulatora przewodnictwa w mukowiscydozie (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) nie są w stanie uwalniać defensyn z komórek Panetha, co powoduje przerost jelitowej flory bakteryjnej. Dlatego odpowiednio zachowana równowaga jonów chlorkowych również wydaje się odgrywać ważną rolę we wrodzonych mechanizmach obronnych.

Bakterie komensalne

W rozwoju jelita kluczową rolę odgrywają również bakterie komensalne. W badaniach prowadzonych na myszach w warunkach braku jakichkolwiek drobnoustrojów wykazano, że bakterie komensalne indukują geny odpowiedzialne za czynność bariery jelitowej, trawienie, metabolizm ksenobiotyków, angiogenezę oraz czynność układu immunologicznego. Co więcej, jelita myszy hodowanych w jałowych warunkach mają hipoplastyczne kosmki, które odbudowują się po rekolonizacji bakteriami komensalnymi. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że prawidłowa flora jelitowa może regulować przeżycie komórek nabłonkowych oraz pobudzać ich proliferację. Bakterie komensalne mogą też regulować homeostazę jelit, hamując bezpośrednio szlaki związane z procesem zapalnym i sprzyjąc zachowaniu homeostazy ustroju gospodarza, kompetycyjnie eliminując drobnoustroje chorobotwórcze.^{11,20}

Wprawdzie już sam przedwczesny poród prowadzi do kolonizacji bakteryjnej niedojrzałego jelita w niewłaściwym okienku rozwojowym, jednak zaburzenie procesu kolonizacji na skutek działania antybiotyków może doprowadzić do zmniejszenia liczebności flory bakteryjnej w ujęciu globalnym albo do kolonizacji drobnoustrojami nietypowymi, które z dużo mniejszym prawdopodobieństwem sprzyjają zdrowiu i rozwojowi jelit. Opóźniona lub niewłaściwa kolonizacja jelit u noworodków może powodować upośledzenie prawidłowego hamowania procesu zapalnego, które występuje dzięki prawidłowej florze komensalnej. To z kolei może prowadzić do nadmiernej odpowiedzi zapalnej na nietypową florę, która doskonale rozwija się w obecności antybiotyków. W badaniach naukowych udokumentowano nieprawidłową kolonizację dwunastnicy przez *Enterobacteriaceae* u noworodków z bardzo małą masą urodzeniową ciała oraz wykazano, że wczesna nieprawidłowa kolonizacja stolca przez *Clostridium perfringens* korelowała z przebyciem NEC w przyszłości.^{48,49}

Trwające badania naukowe koncentrują się na korzyściach i ryzyku podawania bakterii komensalnych i ich metabolitów w celu pobudzenia naturalnych mechani-

zmów obronnych w jelitach noworodków urodzonych przedwcześnie. Zanim jednak dowiemy się więcej na temat bezpieczeństwa i sposobów działania tych środków u wcześniaków, najłatwiejszą metodą sprzyjania wzrostowi pomocnych bakterii komensalnych może być ograniczenie stosowania antybiotyków.

Probiotyki, prebiotyki i postbiotyki

Probiotyki są „żywymi drobnoustrojami, które po spożyciu w odpowiedniej liczbie przynoszą korzyści zdrowotne wykraczające poza zakres oddziaływania podstawowego żywienia”.⁵⁰ Wstępne wyniki prób klinicznych wskazują, że probiotyki mogą zapobiegać NEC.⁵¹ Istnieją jednak obawy dotyczące ryzyka wywołania posocznicy przez te drobnoustroje, ze względu na stan upośledzonej odporności u dzieci w tej grupie wiekowej. Dalsze badania mające na celu poznanie podstaw wpływu probiotycznego na organizm wcześniaków mogą pomóc w ustaleniu, czy możliwe są alternatywne strategie zapobiegawcze, w których nie wykorzystuje się żywych drobnoustrojów.

Prebiotyki są suplementami diety (mucyny lub długołańcuchowe węglowodany) niepodlegającymi trawieniu, które poprawiają stan zdrowia jelit przez stymulację wzrostu korzystnie działających bakterii komensalnych.⁵² Metabolizm prebiotyków przy udziale bakterii bytujących w świetle jelita powoduje wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, które hamują wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych, zapewniają odżywianie enterocytów, poprawiają wchłanianie soli mineralnych i zmniejszają nasilenie zaparcia. Prebiotyki mogą też regulować odpowiedź immunologiczną i usprawniać usuwanie toksyn. Mimo tych obiecujących działań podawanie prebiotyków wiąże się jednak z występowaniem gazów, wzdęciami brzucha oraz biegunką.⁵² Chociaż te działania są odwracalne u starszych osób po zaprzestaniu leczenia, potencjalny szkodliwy wpływ rozdęcia jelit, łącznie z ryzykiem zaburzeń odżywienia będących konsekwencją biegunki, budzą szczególnie niepokój u wcześniaków.

Inną możliwą do zastosowania strategią terapeutyczną jest bezpośrednie podawanie postbiotyków, czyli metabolitów bakterii. Kwas masłowy jest czterowęglowym krótkołańcuchowym kwasem tłuszczowym będącym produktem ubocznym katabolizmu niestrawionych węglowodanów złożonych osiagających okrężnicę, zachodzącego przy udziale bakterii komensalnych. Maślan jest głównym źródłem energii dla enterocytów jelita grubego i odgrywa ważną rolę we wzroście i różnicowaniu jelita, hamowaniu procesów zapalnych oraz w apoptozie.^{11,53} Podawanie maślanu wykazuje pewną skuteczność w ograniczaniu ciężkości przebiegu chorób zapalnych jelit u ludzi.⁵⁴

Na koniec należy dodać, że w niedawno przeprowadzonych badaniach wykazano, że niektóre produkty bakteryjne mogą indukować odpowiedź ochronną, w której pośredniczą TRL, mającą kluczowe znaczenie w utrzymaniu jelita w stanie zdrowia.^{55,56} Zatem niektóre korzystne działania bakterii probiotycznych nie wymagają obecności

żywych bakterii. Można je naśladować, podając izolowane wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom dojrzałego jelita. Do ustalenia pozostaje jednak, czy nabłonek noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie, odpowiada na wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom pochodzące z prawidłowej flory w ten sam sposób i w takim samym stopniu jak dojrzały nabłonek. Obecnie poddaje się badaniom bezpieczeństwo stosowania nieżywych ligandów TLR oraz produktów metabolizmu bakterii. Konieczne są dalsze badania w celu uzyskania jasnego obrazu przebiegu rozwoju systemu odporności wrodzonej, zanim będziemy mogli w pełni zrozumieć, w jaki sposób w warunkach klinicznych można bezpiecznie wykorzystać probiotyki i farmakologiczne modulatory procesu zapalnego.

Artykuł ukazał się oryginalnie w NeoReviews, Vol. 10, No. 4, April 2009, p. e180: The Intestinal Immune Barrier, wydawanym przez American Academy of Pediatrics (AAP). Polska wersja publikowana przez Medical Tribune Polska. AAP i Medical Tribune Polska nie ponoszą odpowiedzialności za nieścisłości lub błędy w treści artykułu, w tym wynikające z tłumaczenia z angielskiego na polski. Ponadto AAP i Medical Tribune Polska nie popierają stosowania ani nie ręką (bezpośrednio lub pośrednio) za jakość ani skuteczność jakichkolwiek produktów lub usług zawartych w publikowanych materiałach reklamowych. Reklamodawca nie ma wpływu na treść publikowanego artykułu.

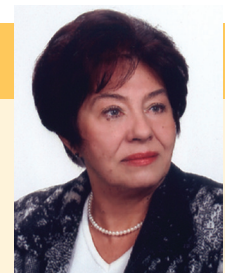
Piśmiennictwo

- Madara JL. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture: pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol.* 1990;137:1273–1281
- Xu J, Gordon GI. Inaugural article: honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10452–10459
- Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res.* 2005;306:357–363
- Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci.* 2001;6:D1321–D1357
- Louis NA, Hamilton KE, Canny G, Shekels LL, Ho SB, Colgan SP. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *J Cell Biochem.* 2006;99:1616–1627
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:G851–G857
- Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 1999;277:C351–C358
- Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol.* 2003;38:717–726
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:710–720
- Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007;19:70–83
- Lin PW, Neish AS. Innate immunity and epithelial biology: special considerations in the neonatal gut. In: Neu J, ed. *Gastroenterology and Nutrition: Neonatal Questions and Controversies.* Philadelphia, Pa: Saunders; 2008:51–72
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, et al. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature.* 2002;415:977–983
- Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. In: Beutler B, Watner H, eds. *Toll-like Receptor Family Members and Their Ligands.* New York, NY: Springer Verlag; 2001:81–92
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335–376
- O'Neill LAJ. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. In: Beutler B, Wagner H, eds. *Toll-like Receptor Family Members and Their Ligands.* New York, NY: Springer Verlag; 2003:47–62
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression *J Immunol.* 2001;167:1882–1885
- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med.* 2002;195:559–570
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:446–458
- Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:371–382
- Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009;136:65–80
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;9:899–909
- Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 1997;65:630–635
- Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003;17:2481–2495
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305:626–629
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, et al. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science.* 1998;279:1954–1958
- Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002;3:221–227
- Collier-Hyams LS, Neish AS. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:1339–1348
- Rumbo M, Schiffrin EJ. Ontogeny of intestinal epithelium immune functions: developmental and environmental regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:1288–1296
- Polak-Charcon S, Shoham J, Ben-Shaul Y. Tight junctions in epithelial cells of human fetal hindgut, normal colon, and colon adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65:53–62
- Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1999; 23 (5 suppl): S3–S6
- Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, et al. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut.* 1998;43:519–524
- Mallow EB, Harris A, Salzman N, et al. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *J Biol Chem.* 1996; 271:4038–4045
- Salzman NH, Polin RA, Harris MC, et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 1998;44:20–26
- Newell SJ. Enteral feeding of the micropremie. *Clin Perinatol.* 2000; 27:221–234
- Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5:e177
- Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res.* 2001;49:589–593
- Claud EC, Lu L, Anton PM, Savidge T, Walker WA, Cheravil BJ. Developmentally regulated IkappaB expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:7404–7408
- Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2004; 55: 622–629
- Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev.* 2000;80:1633–1667

- 40 Cummins AG, Thompson FM. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut*. 2002;51:748–754
- 41 Conroy ME, Walker WA. Intestinal immune health. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008;62:111–125
- 42 Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J Nutr*. 2000;130(2S suppl):426S–431S
- 43 Neu J, Chen M, Beierle E. Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis? *Semin Pediatr Surg*. 2005;14:137–144
- 44 McClure RJ. Trophic feeding of the preterm infant. *Acta Paediatr Suppl*. 2001;90:19–21
- 45 Schumann A, Nutten S, Donnicola D, et al. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics*. 2005;23:235–245
- 46 Chen H, Xu Z, Peng L, et al. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides*. 2006;27:931–940
- 47 Ouellette AJ. Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27:133–146
- 48 Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, Puntis JW. Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4539–4547
- 49 de la Cochetiere MF, Pilgouet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche JP, Roze JC. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. *Pediatr Res*. 2004;56:366–370
- 50 Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium „The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:675–683
- 51 Alfaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;1:CD005496
- 52 Ouwehand AC, Derrien M, de Vox W, Tiihonen K, Rautonen N. Probiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16:212–217
- 53 Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:104–119
- 54 Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7:563–567
- 55 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229–241
- 56 Strober W. Epithelial cells pay a toll for protection. *Nat Med*. 2004;10:898–900

Komentarz

Prof. dr hab. n. med. Krystyna Wąsowska-Królikowska
Klinika Alergologii i Gastroenterologii Dziecięcej UM w Łodzi



Jelito w organizmie człowieka, traktowane w powszechnym rozumieniu jako narząd zapewniający niezbędne dla życia procesy trawienia i wchłaniania pokarmów, pełni równocześnie doniosłą i unikalną rolę bariery ochronnej. Te złożone zadania zapewnia nabłonek jelitowy, dynamicznie funkcjonująca tkanka, która obejmuje największą powierzchnię wzajemnego oddziaływania ustroju ze środowiskiem zewnętrznym.

Dzięki skomplikowanym i coraz lepiej poznanym mechanizmom bariera jelitowa stanowi skuteczną ochronę przed antygenami pokarmowymi, florą jelitową oraz produktami trawienia i metabolizmu bakterii. Pełną jej wydolność zapewnia dojrzały nabłonek jelitowy, który kształtuje się pod wpływem flory bakteryjnej zasiedlającej przewód pokarmowy i składników dostarczanych z pożywieniem.¹

Autorzy przeglądowego artykułu szczegółowo omawiają morfologiczne, biochemiczne i immunologiczne mechanizmy obronne nabłonka jelitowego, korzystny wpływ bakterii komensalnych, a także skupiają się na niedojrzałości bariery ochronnej noworodków, ze szczególnym podkreśleniem negatywnych odrębności w tym zakresie u wcześniaków. Przedstawiona tu syntetyczna i przekrojowa wiedza jest niezbędna i przydatna w praktyce klinicznej.

Barierę anatomiczną stanowi jednowarstwowy nabłonek pokrywający kosmki i krypty jelitowe. Mechanizmy obronne i biochemiczną regulację przepuszczalności zapewniają szczytowe kompleksy złączowe, peptydy przeciwdrobnoustrojowe wydzielane przez komórki Panetha oraz kompleksy glikoprotein obecnych w mucynie komórek kubkowych.

Po stronie podśluzówkowej nabłonka rozlokowany jest bogaty układ immunologiczny GALT (gut associated lymphoid tissue). W rozwoju systemu GALT doniosłą rolę odgrywają bakterie jelitowe zasiedlające przewód pokarmowy. W artykule wyjaśniono regulację wrodzonych mechanizmów obronnych w odpowiedzi na wzorce molekularne towarzyszące drobnoustrojom (MAMP). Receptory rozmieszczone w nabłonku jelitowym rozpoznają wzorce drobnoustrojów i odróżniają bakterie komensalne od patogenów, kształtując charakter odpowiedzi immunologicznej. Jej rodzaj i nasilenie ma podstawowe znaczenie w inicjowaniu procesów zapewniających integralność bariery jelitowej, tzn. reakcji zapalnej i apoptozy. Należy pamiętać, że odpowiedź zapalna jest ważnym mechanizmem obronnym prowokowanym przez bodźce przełamujące barierę jelitową, zaś apoptoza umożliwia eliminowanie nieodwracalnie uszkodzonych enterocytów, zastępowanych nowymi

w toku intensywnej regeneracji nabłonka jelitowego (całkowita wymiana puli enterocytów w ciągu 5 dni).

Niedojrzałość bariery ochronnej i odpowiedzi immunologicznej u wcześniaków, w tym również receptorów rozpoznających wzorce bakteryjne, może powodować nie zrównoważoną odpowiedź prozapalną i proapoptyczną na stymulację składowymi nieprawidłowej flory jelitowej, wyzwalając mechanizmy patogenetyczne martwiczego zapalenia jelit (NEC).^{2,3} Intensywne dojrzewanie nabłonka jelitowego dokonuje się bowiem od 26 tygodnia do końca donoszonej ciąży, a w ekosystemie bakteryjnym przewodu pokarmowego u noworodków urodzonych przedwcześnie dominują patogeny. Dane z piśmiennictwa wskazują, że ryzyko NEC u wcześniaków wzrasta 6-10-krotnie.⁴

Znajomość powyżej zasygnalizowanych faktów nasuwa w sposób naturalny pytanie: czy znane są czynniki optymalizujące po urodzeniu dojrzewanie bariery ochronnej przewodu pokarmowego, zwłaszcza u wcześniaków? Komentowany artykuł przeglądowy dostarcza przydatnych praktycznie wskazówek w tym zakresie.

Istotny element ryzyka stanowi niedożywienie, wykazano natomiast ewidentne korzyści z właściwie dobranego pod względem jakościowym i ilościowym żywienia troficznego, które powinno być wprowadzane odpowiednio wcześniej.

Najwłaściwszym pokarmem po urodzeniu jest mleko matki. Pokarm kobiecy zawiera hormony, czynniki wzrostowe, polimeryczną IgA, makrofagi, lizozym, antyoksydanty oraz oligosacharydy. Obecne w mleku prebiotyki funkcjonują jako analogi receptorów, przeciwdziałając zasiedlaniu jelita potencjalnymi patogenami. Wykazano, że właściwości pokarmu kobiecego, przez modulowanie kolonizacji jelita i wspomaganie wrodzonej obrony immunologicznej, zmniejszają ryzyko rozwoju NEC u wcześniaków.⁵

W sztucznym żywieniu należy wykorzystywać mieszanki o składzie przystosowanym dla wcześniaków, ponieważ skrócony czas trwania ciąży ogranicza wydolność procesów trawienia po urodzeniu. Składniki niestrawione (kazeina) mogą być chemoatraktantem dla granulocytów obojętnochłonnych, które zapoczątkowują proces zapalny z udziałem licznych mediatorów, w tym również PAF (czynnik aktywujący płytki krwi). Wzrost stężenia PAF wykazano u niemowląt z martwiczym zapaleniem jelit. Szczególnie duże ryzyko dotyczy noworodków

przedwcześnie urodzonych, u których aktywność acetylohydrolazy, enzymu odpowiedzialnego za degradację PAF, jest zmniejszona.⁶

Podkreślono również doniosłą rolę bakterii komensalnych w rozwoju jelita i indukowaniu genów odpowiedzialnych za czynność bariery jelitowej, rozwój morfologiczny nabłonka jelitowego, pobudzanie polifekcji enterocytów, procesy trawienia i funkcjonowanie układu immunologicznego.

U noworodków przedwcześnie urodzonych kolonizacja niedojrzałego jelita odbywa się w „niewłaściwym okienku rozwojowym” i z łatwością może być zaburzona przez różnorodne czynniki. Podstawowe negatywne znaczenie ma antybiotykoterapia, stąd ograniczenie stosowania antybiotyków u wcześniaków stwarza realną możliwość obniżenia ryzyka rozwoju NEC.

Podniesiono także doniosłą rolę racjonalnego stosowania probiotyków i prebiotyków oraz wskazano na perspektywę wykorzystywania produktów metabolizmu bakteryjnego, tzw. farmakologicznych modulatorów procesu zapalnego (kwas masłowy), całkowicie pozbawionych ryzyka zakażenia, zwłaszcza u wcześniaków.

Poszerzona wiedza na temat funkcjonowania jelitowej bariery immunologicznej pozwala w praktyce klinicznej pozytywnie wpływać na dojrzewanie nabłonka jelitowego i obniżyć ryzyko występowania NEC w okresie niemowlęcym. Podstawowe znaczenie ma karmienie pokarmem kobiecym, wczesne wdrażanie żywienia enteralnego, ograniczenie antybiotykoterapii i wzbogacanie komensalnej flory jelitowej.

Piśmiennictwo

- 1 Zmelonek A i wsp. Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodków oraz jej znaczenie w kontekście rozwoju neonatologii. *Studia Medyczne Akademii Świętokrzyskiej*, tom 4. Kielce 2006.
- 2 Zielonek A i wsp. Ocena kolonizacji bakteriami patogennymi przewodu pokarmowego noworodków przedwcześnie urodzonych, hospitalizowanych w Klinice Neonatologii CMUJ. *Przegląd Lekarski*. 2004;61:66.
- 3 Clark DA i wsp. Intraluminal pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1990;117:S64-S67.
- 4 Claud E i wsp. Hypothesis; inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal*. 2001;15:1398-1403.
- 5 Lucas A i wsp. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1999;336:1519-1523.
- 6 Harris MC i wsp. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1994;124:105-111.