



Некротизирующий энтероколит у недоношенных детей: состояние кишечного барьера, особенности метаболизма витамина D и их генетическая регуляция

Лошкова Е. В.^{1,2}, Прудникова В. К.¹, Рафикова Ю. С.¹, Ким Л. В.¹, Люлька Т. С.¹, Желев В. А.¹, Саприна Т. В.¹, Боженко Е. А.¹, Кондратьева Е. И.^{2,4}, Одинаева Н. Д.², Янкина Г. Н.¹, Хавкин А. И.^{2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050, Россия

² Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области, Большая Серпуховская, 62, Москва, 115093, Россия

³ Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н. И. Пирогова, ул. Островитянова, дом 1, г. Москва, 117997, Россия

⁴ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова», ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522, Россия

Для цитирования: Лошкова Е. В., Прудникова В. К., Рафикова Ю. С., Ким Л. В., Люлька Т. С., Желев В. А., Саприна Т. В., Боженко Е. А., Кондратьева Е. И., Одинаева Н. Д., Янкина Г. Н., Хавкин А. И. Некротизирующий энтероколит у недоношенных детей: состояние кишечного барьера, особенности метаболизма витамина D и их генетическая регуляция. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;202(6): 61–75. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-202-6-61-75

✉ Для переписки:

Лошкова

Елена

Владимировна

loshkova.ev@ssmu.ru

Лошкова Елена Владимировна, к.м.н., доцент кафедры госпитальной педиатрии, кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета

Рафикова Юлия Сергеевна, к.м.н., доцент кафедры госпитальной педиатрии

Саприна Татьяна Владимировна, заведующий эндокринологической клиникой, д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии с курсом клинической фармакологии

Прудникова Валерия Константиновна, студент 6 курса педиатрического факультета, член научного студенческого кружка по неонатологии на базе кафедры госпитальной педиатрии

Ким Леонид Владимирович, аспирант и лаборант кафедры госпитальной педиатрии

Люлька Татьяна Сергеевна, студент 6 курса педиатрического факультета, член научного студенческого кружка по неонатологии на базе кафедры госпитальной педиатрии

Желев Виктор Александрович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной педиатрии

Боженко Екатерина Александровна, студент 6 курса педиатрического факультета, член научного студенческого кружка по неонатологии на базе кафедры госпитальной педиатрии

Кондратьева Елена Ивановна, д.м.н., профессор, заместитель директора; руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы

Одинаева Нуринисо Джумаевна, д.м.н., профессор, директор

Янкина Галина Николаевна, д.м.н., профессор кафедры госпитальной педиатрии

Хавкин Анатолий Ильич, д.м.н., профессор, руководитель Московского областного центра детской гастроэнтерологии, гепатологии и абдоминальной хирургии, главный научный сотрудник отдела педиатрии; главный научный сотрудник отдела гастроэнтерологии НИКИ педиатрии им. Ю. Е. Вельтищева

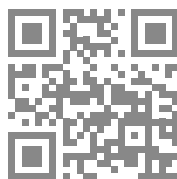
Резюме

Приоритетом национальной политики в области здравоохранения является сохранение жизни и высокого уровня качества жизни каждого недоношенного. В клиническом фокусе находятся дети, рожденные с ЭНМТ. Среди этой категории детей НЭК вносит основной вклад в структуру младенческой летальности.

На основе анализа литературы авторы делают вывод — исследование клеточных маркеров, характеризующих различную глубину повреждения энтероцитов, позволяет: оценить вероятность развития НЭК у младенцев с ЭНМТ; провести раннюю диагностику НЭК; исключить НЭК у новорожденных со сходными симптомами; прогнозировать течение НЭК; предложить и обосновать персонализированные подходы к коррекции низкой обеспеченности 25(OH)D; проанализировать влияние генов-кандидатов на реализацию НЭК, его исходов и метаболизма 25(OH)D.

Для оценки повреждения на уровне энтероцита авторами для литературного анализа выбрана кишечная фракция белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP). Для определения глубины повреждения межклеточных контактов кишечника — экспрессия трансмембранных (клаудин-2, клаудин-3, клаудин-4, окклюдин) и цитоплазматических (зонулин) белков плотных контактов. Анализ результатов исследований по экспрессии фекального кальпротектина, липокалина-2 (LCN2) и эозинофильного нейротоксина, показывающих активность локального воспаления, проведен с целью оценки как риска реализации НЭК, так и его течения. Повреждение кишечника связано с нарушением метаболизма 25(OH)D, а метаболическое заболевание костей у недоношенных, реализовавших повреждение кишечного барьера вплоть до НЭК, регистрируется в десятки раз чаще на этапе выхаживания в ОРИТН. Огромным количеством исследований

EDN: HEUCHZ



показано снижение выживаемости, повышение риска тяжелых осложнений на фоне низкой обеспеченности 25(OH)D в популяции недоношенных. Авторы анализируют взаимосвязь обеспеченности 25(OH)D с учетом влияния экзогенных и эндогенных факторов с характером повреждения стенки кишечника и реализацией НЭК, и делают акцент на существующие профилактические и лечебные подходы к назначению различных доз витамина D у недоношенных с НЭК.

Ключевые слова: некротизирующий энтероколит, недоношенность, I-FABP, клаудины, окклюдин, зонулин, кальпротектин, липокалин-2, эозинофильный нейротоксин, 25(OH)D

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-202-6-61-75>

Necrotizing enterocolitis in preterm infants: state of the intestinal barrier, features of vitamin D metabolism and their regulation

E.V. Loshkova^{1,2}, V.K. Prudnikova¹, Yu.S. Rafikova¹, L.V. Kim¹, T.S. Lyulka¹, V.A. Zhelev¹, T.V. Saprina¹, E.A. Bozhenko¹, E.I. Kondratyeva^{2,4}, N.D. Odinaeva², G.N. Yankina¹, A.I. Khavkin^{2,3}

¹ Siberian State Medical University, build. 2, Moskovsky Trakt, Tomsk, 634050, Russia

² Research Clinical Institute of Childhood of the Ministry of Health of the Moscow Region, build. 62, Bolshaya Serpukhovskaya, Moscow, 115093, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, build. 1, Ostrovitianov str., Moscow, 117997, Russia

⁴ Medical Genetic Research Center named after Academician N.P. Bochkova, build.1, st. Moskvorechye, Moscow, 115522, Russia

For citation: Loshkova E.V., Prudnikova V.K., Rafikova Yu.S., Kim L.V., Lyulka T.S., Zhelev V.A., Saprina T.V., Bozhenko E.A., Kondratyeva E.I., Odinaeva N.D., Yankina G.N., Khavkin A.I. Necrotizing enterocolitis in preterm infants: state of the intestinal barrier, features of vitamin D metabolism and their regulation. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;202(6): 61–75. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-202-6-61-75

✉ **Corresponding author:**

Elena V Loshkova
loshkova@rambler.ru

Elena V. Loshkova, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Hospital Pediatrics; Senior Researcher at the Department of Hereditary and Metabolic Diseases; ORCID: 0000-0002-3043-8674

Yulia S. Rafikova, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0002-3281-803 X

Tatyana V. Saprina, Head of the Endocrinological Clinic, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Faculty Therapy with a Course in Clinical Pharmacology; Chief Freelance Pediatric Endocrinologist of the Department; ORCID: 0000-0001-9011-8720

Valeria K. Prudnikova, 6th year student of the Faculty of Pediatrics, member of the scientific student circle in neonatology at the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0003-0339-2030

Leonid V. Kim, post-graduate student and laboratory assistant of the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0001-6638-7875

Tatyana S. Lyulka, 6th year student of the Faculty of Pediatrics, member of the scientific student circle in neonatology at the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0003-2048-1852

Viktor A. Zhelev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0002-2133-665X

Ekaterina A. Bozhenko, 6th year student of the Faculty of Pediatrics, member of the scientific student circle in neonatology at the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0001-9949-4562

Elena I. Kondratyeva, MD, PhD, DSci (Med), Professor, Head of the Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Head of the Department of Genetics of Respiratory System Diseases; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Nuriniso D. Odinaeva — MD, PhD, DSci, Professor, Director; ORCID: 0000-0001-5214-8072

Galina N. Yankina, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Hospital Pediatrics; ORCID: 0000-0001-5792-2012

Anatoly I. Khavkin, MD, PhD, DSci (Med), Professor, Head of the Moscow Regional Center for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Abdominal Surgery, Chief Researcher of the Pediatrics Department; ORCID: 0000-0001-7308-7280

Summary

The priority of the national health policy is to preserve the life and a high level of quality of life for every premature baby. The clinical focus is on children born with ELBW. Among this category of children, NEC makes the main contribution to the structure of infant mortality.

Based on the analysis of the literature, the authors conclude that the study of cell markers that characterize different depths of damage to enterocytes allows: to assess the likelihood of developing NEC in infants with ELMT; conduct early diagnosis

of NEC; rule out NEC in neonates with similar symptoms; predict the course of NEC; propose and substantiate personalized approaches to correcting the low supply of 25(OH)D; to analyze the influence of candidate genes on the implementation of NEC, its outcomes, and 25(OH)D metabolism.

To assess damage at the level of the enterocyte, the authors selected the intestinal fraction of fatty acid binding protein (I-FABP) for literature analysis. To determine the depth of damage to intercellular junctions of the intestine — the expression of transmembrane (claudin-2, claudin-3, claudin-4, occludin) and cytoplasmic (zonulin) tight junction proteins. Analysis of the results of studies on the expression of fecal calprotectin, lipocalin-2 (LCN2) and eosinophilic neurotoxin, showing the activity of local inflammation, was carried out in order to assess both the risk of NEC and its course. Intestinal damage is associated with impaired 25(OH)D metabolism, and metabolic bone disease in preterm infants with damage to the intestinal barrier up to NEC is recorded ten times more often at the stage of nursing in the NICU. A huge number of studies have shown a decrease in survival, an increase in the risk of severe complications against the background of a low supply of 25(OH)D in the preterm population. The authors analyze the relationship between 25(OH)D availability, taking into account the influence of exogenous and endogenous factors, the nature of damage to the intestinal wall and the implementation of NEC, and focus on the existing preventive and therapeutic approaches to prescribing various doses of vitamin D in preterm infants with NEC.

Keywords: necrotizing enterocolitis, prematurity, I-FABP, claudins, occludin, zonulin, calprotectin, lipocalin-2, eosinophilic neurotoxin, 25(OH)D

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Актуальность

По данным мировой статистики каждая 10-я беременность заканчивается преждевременными родами. В России этот показатель составляет 5–6%, около 1% детей рождаются с массой менее 1000 граммов (ЭНМТ, экстремально низкая масса тела). Технологии выхаживания недоношенных детей ежегодно совершенствуются, однако заболеваемость некротизирующим энтероколитом (НЭК) продолжает оставаться стабильно высокой, внося значимый негативный вклад в структуру младенческой смертности в РФ. На сегодня это наиболее частая патология ЖКТ у недоношенных новорожденных [1]. По данным зарубежных авторов, НЭК встречается с частотой 2,4 на 1000 новорожденных, что составляет 2,1% среди всех детей, поступающих в неонатологические отделения интенсивной терапии, по сообщениям отечественных авторов – с частотой 4%. Летальность может достигать от 20 до 70% [2].

Сложные патофизиологические механизмы, лежащие в основе НЭК, и крайняя затруднительность ранней, доклинической диагностики НЭК диктуют

необходимость продолжения анализа литературы с целью поиска и уточнения механизмов повреждения стенки кишечника у недоношенных новорожденных детей с помощью перспективных маркеров, имеющих высокую диагностическую ценность и/или играющих значимую патогенетическую роль.

НЭК характеризуется разрушением слизистого слоя и трансмуральным некрозом кишечной стенки, поэтому необходимо искать и внедрять в практику тесты, которые отразят это разрушение до того, как оно проявит себя клинически и/или станет видимым на рентгеновском снимке [3–6]. Особо важно, с учетом специфики обсуждаемой категории пациентов – недоношенные новорожденные, уделять внимание поиску и оценке диагностической значимости неинвазивных маркеров повреждения кишечника, которые можно оценивать в амниотической жидкости, копрофильтратах, что позволяет избежать дополнительной кровопотери и не увеличивать число гемотрансфузий, несмотря на проведение ежедневного мониторинга.

Кишечный барьер как сложная функциональная система: физиологические и патогенетические аспекты

Состояние кишечного барьера является одним из важнейших факторов, который определяет последующее течение адаптации у новорожденного ребенка. В зависимости от проницаемости стенки кишечника, вида питания, инфекционных агентов и в целом состояния новорожденного, могут развиваться те, или иные патологические процессы, несущие непосредственную угрозу жизни ребенка [4, 5]. Для недоношенных детей с экстремальной (ЭНМТ) и очень (ОНМТ) низкой массой тела характерна морфофункциональная незрелость кишечного барьера, на которую наслаивается микробная колонизация, гипоксия и как результат ишемия стенки кишки, метаболические

нарушения – ацидоз, алкалоз различного характера, усугубляющие эпителиальную проницаемость и инициирующие дальнейший каскад событий, приводящих к реализации НЭК [2–6].

Сам же кишечный барьер, представляет собой комплексную систему, осуществляющую высоко-селективную защиту внутренней среды от чужеродных агентов [4–6]. Представлена она иммунным и неиммунным компонентами. Иммунный компонент включает в себя GALT-систему (ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань). Она состоит из скоплений лимфоидных фолликулов (пейеровы бляшки, солитарные фолликулы), располагающихся на всем протяжении кишечника

в его слизистом и подслизистом слоях, внутриэпителиальных лимфоцитов, плазматических клеток и Т-клеток собственного слоя слизистой оболочки и брыжеечных лимфатических узлов [4–9].

Неиммунный компонент, представляет собой механический барьер, в виде эпителиальных клеток с плотными соединениями, белками плотных соединений, комменсальной микробиотой, клетками энтеральной нервной системы и синтезом лизоцима, пропердина, муцина, пепсина, соляной кислоты, протеолитических панкреатических ферментов, секрецией желчи, перистальтикой кишечника, печеночным барьером [3–9].

Существует еще один компонент, это кишечно-сосудистый барьер, который образуют сосудистые эндотелиальные клетки, кишечные глиальные клетки и перициты [3].

Главными объектами для изучения в настоящий момент являются белки плотных контактов и их функции [7–9]. Комплексы белков плотных связей формируют апикальную часть латеральной мембраны между двумя клетками, что обеспечивает механический каркас и позволяет проникать в это пространство только мелким молекулам, весом до 500 Да, а также исключает проникновение бактерий и антигенных белков [3]. Сами же комплексы построены в виде мостиков между соседними клетками, состоящими из трансмембранных связывающих белков (зонулин, клаудины, окклюдин, цингулин, молекулы адгезии и другие). Именно от этих белков зависит прочность механического каркаса и проницаемость стенки кишечника [3–9].

Зонулин – белок, по структуре схожий с холерным вибрионом. Синтезируется он в основном в печени и способен изменять проницаемость кишечной стенки. Происходит это посредством активации связанных с ZO-1 протеином актиновых элементов эпителиальных клеток, вследствие чего межклеточные контакты расширяются, и проницаемость кишечного эпителия увеличивается. Помимо этого, зонулин способен активировать эпидермальный фактор роста через протеиназо-активируемые рецепторы типа 2, расположенные на базолатеральной и апикальной поверхностях эпителиальных клеток [8].

Клаудины – основные мембранные белки, которые способны напрямую изменять проницаемость кишечного барьера под влиянием различных стимулов. В организме человека описано 26 видов этих белков, все они локализуются в разных органах и системах. В одних органах преобладают одни типы клаудинов, в других другие. В эпителии желудочно-кишечного тракта в основном представлены клаудины 1, 2, 12, 15 [3, 8, 9]. Эти белки взаимодействуют с клаудинами соседних или прилегающих клеток через гомо-, гетеро-, цис- и транс-контакты. Такого рода взаимодействие обеспечивает избирательность кишечного барьера. Например, одни типы клаудинов служат для поддержания целостности барьера и практически непроницаемы, клаудины 10a и 17 проницаемы для анионов, 10b для катионов, 2 и 15 для катионов и воды [10].

Окклюдин – еще один белок плотных контактов, является интегральным. Наряду с клаудинами

является основным белком плотных контактов эпителиальных клеток [4].

Цингулин – белок, расположенный в апикальных областях клеток. Данный компонент является плохо изученным, но известно то, что белок может функционально взаимодействовать с цитоскелетом эпителиальных клеток, изменяя просвет межклеточных контактов [10]. В проницаемости участвуют и мембранные белки. К таким относятся ZO-1, ZO-2, ZO-3 или зональные окклюдины. Эти белки осуществляют связь между мембранными белками и актиновыми нитями клеток [9, 10, 11].

Кроме того, в процессах регуляции проницаемости кишечника играют роль и внутриклеточные белки. Например, белок 2, содержащий нуклеотид-связывающий домен олигомеризации (NOD 2), главным образом, белок обеспечивает непроницаемость для пептидогликанов бактерий и стимулирует развитие местной иммунной реакции. Другой внутриклеточный белок – белок, связанный с аутофагией 16-подобный (ATG16L1), он участвует в синтезе лизосом, осуществляющих аутофагию вторгшихся патогенов [12].

Неоспорима роль белков и рецепторов иммунной системы, с помощью которых осуществляется непроницаемость кишечной стенки для большинства видов патогенов. Активируя основные пути врожденного или приобретенного иммунного ответа, эти структуры обеспечивают освобождение организма от чужеродных агентов [13, 14]. К ним относятся:

- толл-подобные рецепторы (TLR4, MD2) – распознают структуру патогенов и активируют врожденные иммунные реакции [13],
- фактор активации тромбоцитов (PAF) – является мощным провоспалительным фосфолипидом [14],
- единый рецептор иммуноглобулина и толл-интерлейкина 1 (SIGIRR) – блокирует чрезмерную активацию TLR и тормозит воспалительный процесс для возвращения к нормальной проницаемости кишечника [13],
- маннозосвязывающий лектин (MBL) – важный фактор врожденного иммунитета, он распознает углеводные фрагменты патогенов и вызывает их уничтожение с помощью системы комплемента [15],
- ядерный фактор-карра В (NFKB) – основной транскрипционный фактор, регулирующий выработку сразу нескольких генов провоспалительных белков [15],
- провоспалительные цитокины [13, 15].

И наконец, белки, со стороны третьего компонента – кишечно-сосудистого барьера [4–6]:

- сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) – отвечает за сосудистую проницаемость [16],
- эндотелиальная NO-синтаза – путем выработки оксида азота, регулирует кровоток и целостность в слизистой оболочке кишечника [17],
- гепарин-связывающий эпидермальный фактор – усиливает кишечный кровоток, снижает апоптоз клеток, стимулирует миграцию и пролиферацию энтероцитов [17].

Таким образом, представления о кишечном барьере на сегодняшний день характеризуются

множеством функционально-значимых молекул и сложной системой регуляции [16].

Некротизирующий энтероколит: перспективные биомаркеры повреждения кишечного барьера

Некротизирующий энтероколит (НЭК) является смертельным заболеванием, при котором современные диагностические инструменты недостаточны для доклинического выявления и предотвращения НЭК, а ранние прогностические биомаркеры могут быть полезны для выявления детей с высоким риском развития НЭК – этот тезис констатируют исследователи во всем мире [17, 18]. Однако существуют сложности поиска диагностических маркеров, которые часто заключаются в ограниченной численности выборки, в частности, Hoffsten A, и соавторы обследовали

11 новорожденных с НЭК и исследовали у них 189 воспалительных, онкологических и сосудистых протеомных биомаркеров. Но несмотря на огромное количество маркеров достоверной разницы между 11 детьми с НЭК и 29 детьми без НЭК не было получено [17].

В последние годы особое внимание уделяется исследованию проницаемости кишечной стенки и ее роли в формировании НЭК. И основными объектами для изучения в настоящий момент являются метаболические продукты жизнедеятельности энтероцитов.

Маркеры повреждения энтероцита

В качестве первого объекта авторский коллектив сфокусировался на анализе литературы в рамках изучения I-FABP (fatty acid binding protein), белка, который экспрессируется в зрелых эпителиальных клетках слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, участвуя в абсорбции, внутриклеточном транспорте и метаболизме пищевых жирных кислот и их эфиров ацил-КоА в тонком кишечнике). Продукция I-FABP регулируется геном *FABP2* миссенс-вариация (Ala54Thr; rs1799883) которого

тесно связана с изменением метаболизма липидов и углеводов, на настоящий момент *FABP2* является широко изученным геном-кандидатом, связанным с метаболическими нарушениями, включая ожирение, диабет и метаболический синдром, однако неясно, влияет ли полиморфизм Ala54Thr на повышение уровня I-FABP в биологических жидкостях у недоношенных новорожденных с НЭК и данных в отечественной и зарубежной литературе, посвященных обозначенной тематике не обнаружено [6, 8–11].

Маркеры повреждения межклеточных контактов

Вторым объектом изучения проницаемости кишечной стенки являются белки плотных контактов: трансмембранные (клаудин-2, клаудин-3, клаудин-4, окклюдин) и цитоплазматические (зонулин) [9–14].

Именно от этих белков зависит прочность механического каркаса и проницаемость стенки кишечника [12, 13], что является, безусловно, одним из важных механизмов формирования НЭК и степени его тяжести. Особую роль в формировании НЭК имеет и генетическая регуляция проницаемости

кишечной стенки. Показано, что распространенность НЭК зависит от этнической принадлежности, близнецовый метод в исследованиях подтвердил роль генетических полиморфизмов в формировании НЭК. В литературе продемонстрировано, что у детей с НЭК экспрессия генов клаудина-4 ($p=0,05$), зонулина (ZO-1) ($p=0,05$), окклюдина ($p=0,007$) и цингулина ($p=0,007$) была значительно снижена, помимо этого они установили, что степень снижения коррелирует с тяжестью заболевания [19].

Маркеры локального нейтрофильного воспаления

Третьим объектом изучения явились маркеры воспаления на уровне кишечника. Исследование уровня фекального кальпротектина позволяет оценить активность локального нейтрофильного воспаления в кишечнике широко и успешно используется прежде всего для диагностики и оценки эффективности базисной противовоспалительной терапии при воспалительных заболеваниях кишечника (язвенный колит и болезнь Крона), а также имеет вспомогательное значение для диагностики и дифференциальной диагностики ишемии кишечника, аллергической гастроэнтеропатии. Кальпротектин характеризует прежде всего местную (топическую на уровне кишечника) активность нейтрофильного воспаления. Во многих работах было показано, что уровень фекального кальпротектина выше у недоношенных детей, хотя стойких корреляционных взаимосвязей с гестационным возрастом (ГВ) в ряде исследований получено не было [20, 33].

Очень ценными с научной и клинической точки зрения являются данные о нарастании концентрации фекального кальпротектина за 10 суток до манифестации НЭК среди недоношенных новорожденных детей. Именно эти данные необходимо подтверждать дальнейшими исследованиями, поскольку на их основе и будет построен алгоритм ранней доклинической диагностики и дифференциальной диагностики среди недоношенных детей [21].

Другой сходный маркер, оценивающий активность нейтрофильного воспаления – липокалин-2 (LCN2), высокая диагностическая значимость которого была вначале продемонстрирована для острого повреждения почек [22].

LCN2 также известный как липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиной, является антимикробной молекулой, активность которой в клетках кишечника повышается при провоспалительных состояниях. В настоящее

время его диагностическая ценность показана при воспалительных заболеваниях кишечника среди взрослых. Причем активность LCN2 коррелировала с активностью кальпротектина [22].

Относительно недавно рабочая группа под руководством Tremblay E сообщила, что LCN2 является ключевым маркером, связанным с образцами подвздошной кишки младенцев с НЭК [23].

Крайне важно, что высвобождение LCN2 в стуле недоношенных детей было относительно

сопоставимо с высвобождением кальпротектина, повышаясь задолго до постановки диагноза НЭК, что представляет собой потенциальный новый надежный маркер для этого состояния. В одном из недавних исследований Thibault MP и соавт, результаты которого опубликованы в январе этого года показана высокая диагностическая ценность определения кальпротектина и липокалина в кале, на доклиническом этапе – за 7 суток до появления признаков НЭК [23].

Маркеры локального эозинофильного воспаления

Четвертым объектом исследования явилось изучение активности эозинофильного воспаления при НЭК, что заслуживает особого внимания ввиду высокой частоты пищевой непереносимости у данной категории детей и сложностями выбора питательного субстрата, расширения объема энтерального питания, поэтому авторский коллектив предполагает, что использование фекального эозинофильного нейротоксина может стать перспективным направлением поиска биомаркеров повреждения кишечника [24, 25]. В 2021 году Lu Y и соавт, рассказали в своей статье о рецидивирующих симптомах НЭК у недоношенного ребенка. В этой статье описывался клинический случай, в котором у пациента, после выздоровления были отмечены повторяющиеся эпизоды стула с кровью, возникающие обычно после кормления обогащенным грудным молоком и смесью, содержащую белки коровьего

молока. У коллег возникли подозрения на рецидивирующие симптомы НЭК, однако ребенок был относительно здоров и не проявлял болезненности в животе. Последовательные анализы крови показали нормальный уровень С-реактивного белка и повышение уровня эозинофилов. А после перевода ребенка на гидролизованную смесь, описанные выше симптомы полностью прекратились. Так был выявлен в дополнение к НЭК, FPIES-синдром (синдром энтероколита, индуцированного пищевыми белками) [25].

Таким образом, выявление непереносимости некоторых пищевых белков при НЭК у новорожденных, позволит правильно организовать энтеральное питание младенцам, избежать усугубление болезни, основываясь не на методе проб и ошибок, а на значении конкретного показателя эозинофильного воспаления.

Клиническая и диагностическая значимость биологических маркеров повреждения кишечника

Диагностика НЭК представляет собой сложную задачу во всем мире, поскольку диагноз в реальной клинической практике до сих пор основывается на клинических и рентгенологических характеристиках, определенных четыре десятилетия назад [26, 27]. Младенцы с ЭНМТ наиболее подвержены риску развития НЭК и раннее выявление НЭК до появления клинических проявлений обеспечит период, позволяющий проводить целенаправленные вмешательства, такие как лечение антибиотиками, введение донорского молока [26,27].

Однако в большинстве исследований у недоношенных детей было проведено тестирование биомаркеров в исследуемых образцах уже во время постановки диагноза НЭК, т.е. после манифестации клинических проявлений, что не позволяет проводить раннюю доклиническую диагностику и не позволяет судить о доклинической диагностической ценности исследуемых биомаркеров повреждения кишечника [28–30]. В недавнем метаанализе, включавшем более 600 новорожденных, в 10 из 13 исследований сообщалось о повышенных уровнях кальпротектина среди младенцев с диагнозом НЭК, но его значение как маркера раннего скрининга остается неопределенным. [30].

Высокая диагностическая ценность была продемонстрирована для I-FABP в качестве доклини-

ческого маркера, увеличение его экспрессии было зарегистрировано за сутки до манифестации клинических проявлений [31]. Также была показана ценность I-FABP для прогнозирования тяжести течения заболевания в первые 6 часов подозрения на НЭК [32].

В целом, основные направления исследований сосредоточены на идентификации неинвазивных маркеров поражения кишечника на доклинической стадии [33]. Кроме того, крупный пул научных исследований сосредоточен на поиске и разработке потенциально полезных методов лечения, которые можно было бы использовать для предотвращения НЭК, сосредоточив внимание на подавлении воспалительных сигнальных путей, путем назначения пробиотиков, грудного молока, в том числе донорского, а также на идентификации молекул, которые могут ускорить созревание кишечника, оказывая антиоксидантное и стимулирующее воздействие на незрелую слизистую оболочку кишечника недоношенного ребенка [32–35].

Таким образом, усилия, предпринятые за последние пять лет для характеристики специфических биомаркеров, улучшающих диагностические возможности при НЭК, привели к выявлению нескольких потенциальных кандидатов для постановки диагноза и дифференциации НЭК от других подобных патологических состояний.

Повреждение кишечного барьера и метаболизм витамина D

Повреждение кишечного барьера и манифестация НЭК напрямую связаны с нарушением метаболизма 25(OH)D [36]. Как известно, синдром мальабсорбции свойственен всем детям с ЭНМТ и ОНМТ и реализуется на фоне морфофункциональной незрелости желудочно-кишечного тракта, повреждения кишечного барьера на фоне множественной коморбидности патологических состояний при недоношенности, что в свою очередь еще более усугубляет дефицит различных нутриентов, в том числе, витамина D. В свою очередь ремоделирование костной ткани, метаболическое заболевание костей, прежде всего переломы трубчатых костей, у недоношенных детей, реализовавших повреждение кишечного барьера и НЭК, регистрируется в десятки раз чаще на этапе выхаживания в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) и неонатальных стационарах [37–38].

Огромным количеством клинических исследований показано снижение выживаемости, повышение риска тяжелых осложнений на фоне низкой обеспеченности 25(OH)D в популяции недоношенных детей [39–41]. Известно, что метаболиты витамина D: 25(OH)D и 1,25(OH)2D3 действуют на клетки не прямо, а опосредованно, через специфические рецепторы, которые имеются во многих органах-мишенях, включая кишечник. Большая часть клеток относится к клеткам иммунной системы, например, Th17-хелперы, активность которых подавляет витамин D, снижая воспалительную реакцию тканей.

Другие клетки, витамин D, наоборот стимулирует, к таким относятся Т-супрессоры.

Помимо регуляции клеточной дифференцировки, витамин D способен регулировать оптимальное соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ингибирует интерлейкин 12, фактор некроза опухоли и увеличивает продукцию интерлейкина 10 и других цитокинов). Кроме того, витамин D способен повышать экспрессию NOD2 в эпителиальных клетках кишечника [42, 43].

И, наконец, генетические варианты гена рецептора витамина D способны оказывать влияние на изменение проницаемости кишечного барьера. В 2020 году было обследовано 122 недоношенных новорожденных и показали, что частота НЭК у новорожденных была в 2 раза выше среди носителей генотипа CC ApaI VDR (OR = 2,129 (1,169–3,912), $p < 0,05$) [44]. Kosik K. и соавт. показали, что носительство мутантного генотипа GG полиморфизма BsmI гена VDR повышает тяжесть повреждения кишечного барьера ($p = 0,006$) [45].

Вышеописанное свидетельствует об актуальности изучения обеспеченности 25(OH)D недоношенных новорожденных, анализа взаимосвязи уровня 25(OH)D с характером повреждения стенки кишечника и реализацией НЭК, определения факторов риска их развития и обоснования персонализированного подхода к назначению профилактических и лечебных доз витамина D у недоношенных новорожденных с НЭК.

Обеспеченность витамином D в перинатальном периоде

Как известно, дефицит витамина D у матери обуславливает дефицит его и у ребенка. A. Merewood и соавт. было проведено масштабное исследование уровня 25(OH)D в плазме крови у матери и пуповинной крови ребенка. Всего было обследовано 459 пар мать-младенец. Результаты оказались следующими: средний уровень 25(OH)D у новорожденных составил 17,2 нг/мл (CI: 16,0–18,8); средний уровень материнского 25(OH)D составил 24,8 нг/мл (CI: 23,2–25,8). В целом, 58,0% младенцев и 35,8% матерей имели дефицит витамина D (25(OH)D < 20 нг/мл); 38,0% младенцев и 23,1% матерей имели тяжелый дефицит (25(OH)D < 15 нг/мл). Факторы риска дефицита витамина D у младенцев включали дефицит у матери (OR: 5,28), роды в зимнее время года (OR: 3,86), черную расу (OR: 3,36) и ИМТ матери ≥ 35 (OR: 2,78) [46].

В другом крупном исследовании (2021 год), ученые Z. Chen и соавт. провели определение уровня 25(OH)D у здоровых детей в возрасте после года (24–72 месяца) таким образом, анализируя как меняется концентрация вещества с течением времени. В возрасте 24–36 месяцев средний уровень витамина составил 29.44 ± 7.30 нг/мл; 36–48 месяцев 28.49 ± 7.13 нг/мл; 48–60 месяцев 25.38 ± 6.68 нг/мл; 60–72 месяцев 23.30 ± 7.29 нг/мл. Эти данные позволяют предположить, что исходный уровень 25(OH)D имеет тенденцию к снижению с возрастом, и если у здоровых детей уровень значительно понижается,

то что же тогда происходит у детей с уже имеющимся дефицитом [47].

Очень интересное и крупное по своему масштабу и критериям исследование было проведено в 2015 году Heather H. Burris и соавт. Там ученые брали самые разные характеристики: сезон, в котором родился ребенок, возраст матери, раса, сроки гестации (табл. 1). Они обнаружили, что среди младенцев, родившихся до 32 недели беременности, вероятность уровня 25(OH)D < 20 нг/мл была выше (OR 2,2, 95% CI 1,1, – 4,3). Средний уровень 25(OH)D в плазме пуповины был ниже, если младенцы родились зимой или весной, а также если их матери были негроидной расы, молодыми (до 30 лет). Также они отметили, что у младенцев, родившихся зимой или весной, уровень 25(OH)D < 20 нг/мл встречался более чем в два раза чаще, чем у младенцев, родившихся летом, а у темнокожих младенцев уровень 25(OH)D ниже 20 нг/мл встречался в шесть раз чаще, чем у белых [48].

Для синтеза витамина D необходимы ультрафиолетовые лучи, до недавнего времени широко было распространено мнение о низкой частоте нарушений обеспеченности 25(OH)D в странах с высокой продолжительностью солнечного сияния. Однако, на сегодняшний день, огромное количество исследований демонстрирует противоположную ситуацию, а в ряде случаев обращает на себя внимание не только глобальность низкой обеспеченности, но и глубина

Таблица 1
Клинико-социальные ассоциации с обеспеченностью 25(OH)D [48]

Признак	Число	Средний уровень 25(OH)D ((ng/ml))
Все субъекты	471 детей	34,0
По времени года		
Рожденные весной	85 детей	30,4
Рожденные летом	155 детей	38,3
Рожденные осенью	130 детей	36,3
Рожденные зимой	104 ребенка	27,7
Расовые различия		
Белая раса	269	37,2
Черная раса	61	25,3
Латиноамериканцы	75	33,8
Азиаты	54	29,9
Другие	7	29,9
Возраст матери		
Меньше 20 лет	13	23
От 20 до 30 лет	115	30,0
От 30 до 40 лет	299	35,8
Старше 40	41	35,5
Срок гестации		
Меньше 32 недель	71	31,7
32–37 недели	108	36,5
Более 37 недель	292	33,6

Таблица 2
Ассоциации между уровнем 25(OH)D при рождении и заболеваниями у младенцев с очень низкой массой тела при рождении [50]

Признак	Все 188 новорожденных	25(OH)D <10 ng/mL (n=83)	25(OH)D, 10–30 ng/mL (n=67)	25(OH)D >20 ng/mL (n=38)	P value
Срок госпитализации (в днях)	55.1±39.8	65.1±51.3	49.8±28.1	42.3±18.1	0.005
Летальный исход	18 (9.6%)	6 (7.2%)	6 (9.0%)	6 (15.8%)	0.324
РДС	133 (70.7%)	72 (86.7%)	45 (67.2%)	16 (42.1%)	<0.001
БЛД	55 (29.3%)	38 (45.8%)	14 (20.9%)	3 (7.9%)	<0.001
Пневмоторакс	10 (5.3%)	8 (9.6%)	2 (3.0%)	0 (0.0%)	0.051
Легочное кровотечение	11 (5.9%)	7 (8.4%)	2 (3.0%)	2 (5.3%)	0.363
Открытый артериальный проток	91 (48.4%)	44 (53.0%)	29 (43.3%)	18 (47.4%)	0.490
Ретинопатия	40 (21.3%)	27 (32.5%)	11 (16.4%)	2 (5.3%)	0.001
НЭК	39 (20.7%)	17 (20.5%)	17(25.4%)	5 (13.2%)	0.141
Сепсис	29 (15.4%)	17 (20.5%)	9 (13.4%)	3 (7.9%)	0.175
Перивентрикулярная лейкомаляция	3 (1.6%)	2 (2.4%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)	>0.999
Внутрижелудочковое кровоизлияние (III и IV степени)	34 (18.1%)	6 (7.2%)	4 (6.0%)	2 (5.3%)	>0.999

существующего дисметаболизма витамина D. Так исследование, проведенное среди младенцев Южной Африки, Jabulani R. Ncaiyana и соавт., в котором определили уровень 25(OH)D у 744 младенцев в возрасте от 6 до 10 недель жизни показало, что распространенность дефицита витамина D составила 81% (95% CI 78–83). Рождение зимой и грудное вскармливание были самыми сильными предикторами более низкого уровня концентрации 25(OH)D в сыворотке крови. По сравнению с детьми, не находящимися на грудном вскармливании, дети, находящиеся на грудном вскармливании, имели более высокий риск дефицита витамина D (OR, 1,96; 95% CI, 1,04–3,67), а кормление грудью более одного месяца было связано с большей вероятностью дефицита витамина D (OR, 5,40; 95% CI, 2,37–12,32) и более низкой концентрацией витамина D (–16,22 нмоль/л; 95% CI, –21,06, –11,39) [49].

Приведены и исследования, касающиеся преждевременных родов, недоношенности, рождения детей с низкой и экстремально низкой массой тела,

они все без исключения имели в своем статусе дефицит витамина D. Исследование, проведенное в Южной Корее в период с 2013 по 2017 год, показало ассоциацию дефицита витамина D у детей с очень низкой массой тела при рождении (средний гестационный возраст 28,4±3,0 недели, средний вес 1104,7±298,1 г) и различными заболеваниями периода новорожденности (табл. 2). Ian Kim и соавт., установили, что средний уровень 25(OH)D 13,4 ± 9,3 нг/мл, частота дефицита витамина D (<20 нг/мл) составила 79,8%, а 44,1% недоношенных младенцев имели тяжелый дефицит витамина D (<10 нг/мл). Их анализ показал, что низкий уровень 25(OH)D в сыворотке крови (<20 нг/мл) был фактором риска респираторного дистресс-синдром (OR, 4,32; p=0,010) и бронхолегочной дисплазии (OR, 4,11; p=0,035). Помимо заболеваний легких, дефицит витамина D, по мнению авторов, может быть фактором риска некротизирующего энтероколита, открытого артериального протока, сепсиса и летального исхода [50].

Генетическая регуляция функционального состояния кишечного барьера

Роль генетики в регуляции проницаемости кишечного барьера и как следствие в развитии воспалительных заболеваний кишечника начала изучаться относительно недавно, обусловлено это изначально эпидемиологическими данными [51]. Ученые проводили масштабное эпидемиологическое исследование распространенности НЭК среди недоношенных новорожденных разных стран, и обнаружили, что риск развития НЭК широко варьировал в зависимости от этнической принадлежности, реже встречаясь в Японии, Швейцарии и Австрии, и чаще поражая недоношенных детей в Северной Америке, Великобритании и Ирландии [52]. Хотя эти различия могут быть обусловлены различиями в уходе за новорожденными, исследования, проведенные в США, также продемонстрировали различия в риске в зависимости от расы, причем у афроамериканских младенцев риск развития НЭК выше. Исследования близнецов, также продемонстрировали, что более 50% развитие НЭК обусловлено генетическими и общими факторами окружающей среды [53].

Эти исследования и стали причиной изучения полиморфизмов различных генов и их роли в развитии воспалительных заболеваний кишечника. Ученые в Израиле в период с 2011 по 2015 год исследовали образцы тканей кишечника 12 детей с помощью иммуногистохимического анализа и количественной экспрессии генов. Все дети были поделены на 2 группы – группа контроля (причиной оперативного вмешательства был не НЭК) и группа детей, прооперированных по поводу НЭК. Средний гестационный возраст для группы контроля составил $35,8 \pm 1,6$ недель, для группы НЭК $27,8 \pm 1,6$ недель. Средняя масса тела при рождении для контрольной группы – 2468 ± 433 грамм, для группы НЭК – 1085 ± 301 грамм. В результате ученые выявили, что у детей с НЭК экспрессия генов клаудина-4 ($p=0,05$), зонулина (ZO-1) ($p=0,05$), окклюдина ($p=0,007$) и цингулина ($p=0,007$) была значительно снижена, помимо этого они установили, что степень снижения коррелирует с тяжестью заболевания (табл. 3) [54].

Таблица 3
Генетическая регуляция функциональной активности компонентов кишечного барьера [53–60]

Полиморфизм/Продукт	Год, страна	Патофизиологические эффекты	Клинические эффекты	n, количество обследованных	OR, p (достоверность)
Генетическая регуляция белков плотных контактов					
CLDN4 (CPETR1) 7q11	2011–2015 год, Израиль	Снижение синтеза клаудина-4	Повышает риск возникновения НЭК	12 случаев	p=0,05
Окклюдин OCLN 5q13.2	Израиль, 2011–2015 год	Снижение синтеза окклюдина	Повышает риск возникновения НЭК	12 случаев	p =0,007
Цингулин CGN	Израиль, 2011–2015 год	Снижение синтеза цингулина	Повышает риск возникновения НЭК	12 случаев	p =0,007
ZO-1	Израиль, 2011–2015 год	Снижение синтеза ZO-1	Повышает риск возникновения НЭК	12 случаев	p =0,05
Генетическая регуляция иммунных клеток кишечника					
В-клетки: IGHG1, IGHA1, SLC15A2, IGHM, IGKC и CR2	Китай, 2021 год	Повышают экспрессию Ig	Повышает риск возникновения НЭК	9 случаев	p =0,05
Макрофаги: CXCL9, CXCL10 и CXCL11	Китай, 2021 год	Повышают экспрессию Ig	Повышает риск возникновения НЭК	9 случаев	p =0,05
Плазматические клетки: NFRSF17, MZB1 и EAF2	Китай, 2021 год	Повышают экспрессию Ig	Повышает риск возникновения НЭК	9 случаев	p =0,05
Генетическая регуляция других активных структур					
TLR4, MD2 Толл-подобные рецепторы	Китай, 2015 год	Связывание MD2 с TLR4 приводит к активации NF-kB (универсальный фактор транскрипции, контролирует экспрессию генов иммунного ответа)	Наличие полиморфизмов MD2 повышает тяжесть течения НЭК	42 случая НЭК и 83 случая контроля	OR 1.66, 95% p=0,036

таблица 3
(продолжение)

Полиморфизм/ Продукт	Год, страна	Пато- физиологические эффекты	Клинические эффекты	n, количество обследованных	OR, p (достоверность)
Единый ре- цептор имму- ноглобулина и толл-интерлей- кина 1 (SIGIRR) Нонсенс- мутация p.Y168X и миссенс- мутация p.S80Y	США, 2015 год	Мутации в гене снижают экс- прессию SIGIRR	SIGIRR выступа- ет как «тормоз», предотвращает чрезвычайную активацию TLR, потеря этой функции приво- дит к чрезмерно- му воспалению	37 случаев	
Нуклеотид- связывающий домен олигоме- ризации, содер- жащий белок 2 (NOD2)	Германия, 2016 год	Наличие 2х и более вариан- тов NOD2 ведет к потери его функции (рас- познавание му- раимидпептид- ного компонента клеточной стенки бактерий и активация их уничтожения)	Повышает риск возникновения НЭК	9000 недоношен- ных детей	OR 4.14, 95% p = 0,009
Связанный с аутофагией 16-подобный 1 (ATG16L1)	США, 2016 год	Снижает интен- сивность про- цесса аутофагии	У младенцев с гомозиготным аллелем этого гена снижается частота НЭК	260 недоношен- ных детей	OR=0,4, (p<0,05)
Маннозосвязы- вающий лектин (MBL) полимор- физм -221 X/Y	Италия, 2012 год	Повышает выработку MBL (MBL активи- рует систему комплемента)	Повышает риск возникновения НЭК	107 недоношен- ных детей	OR= 4,42, 95% p=0,03
Фактор актива- ции тромбоци- тов (PAF) Белок-активатор GM2A Полиморфиз- мы: rs1048719, rs2075783	Китай, 2015 год	Снижают выра- ботку белка- активатора GM2A (антаго- нист PAF)	Повышают риск возникновения НЭК	125 младенцев, 42 с НЭК	rs1048719 (OR 1,86, 95%, (p<0,05)) и rs2075783 (OR 3,23, 95%, (p<0,05))
Ядерный фактор-карпа В (NFKB) Вариант g- 24519delATTG	США, 2011 год	Повышает экс- прессию NFKB (основной фак- тор, регулирую- щий экспрессию нескольких провоспалитель- ных генов)	Повышает риск возникновения НЭК	166 детей с НЭК 256 детей без НЭК	OR ∞, 95% p=0,003
Генетическая регуляция кишечно-сосудистой проницаемости					
Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) мутантный ал- лель VEGF-2578	Венгрия, 2006 год	Снижает про- дукцию VEGF	Повышает риск возникновения НЭК	128 младенцев с низкой массой тела (< или = 1500 грамм)	OR 2,77, 95% p=0,049
Ген эндотелиаль- ной NO-синтазы eNOS полимор- физмы eNOS 894G>T и eNOS 786T>C	Польша, 2018 год	Повышают про- дукцию NO	Повышают риск возникновения НЭК и тяжесть течения НЭК	100 младенцев, 22 с НЭК	eNOS 894G>T: OR= 20, 95% p=0,0004 eNOS 786T>C: OR 4,88, 95%, p=0,013
Гепарин- связывающий эпидермальный фактор роста- подобный фактор роста (HB-EGF) rs4912711	Китай, 2018 год	Снижает выра- ботку HB-EGF	Повышает риск возникновения НЭК	30 младенцев с НЭК и 80 кон- трольная группа	

В другой работе китайские ученые оценили количественную экспрессию в 9 образцах ткани кишечника детей, страдающих НЭК и 5 контрольных образцах (табл. 3). Была выявлена повышенная экспрессия генов основных клеток иммунного ответа, в частности, В-клеток: *IGHG1*, *IGHA1*, *SLC15A2*, *IGHM*, *IGKC* и *CR2* ($p=0,05$), макрофагов: *CXCL9*, *CXCL10* и *CXCL11* ($p=0,05$), плазматических клеток: *NFRSF17*, *MZB1* и *EAF2* ($p=0,05$) [55].

Также в Китае ученые описали полиморфизмы толл-рецепторов, а именно *MD2* в 42 случаях НЭК и 83 случаях контроля (табл. 3). В целом, не было выявлено различий в частоте встречаемости SNPs *MD2* между случаями НЭК и контролем; хотя анализ, основанный на степени тяжести, продемонстрировал небольшое, но значительное повышение риска хирургического НЭК при наличии вариантов *MD2* (OR 1,66, 95% ДИ 1,09–3,05, $p=0,036$) [56].

С помощью полноэкзомного секвенирования Sampath и соавт. выявили новый стоп-вариант (p.Y168X) *SIGIRR* у младенца с НЭК (табл. 3). Дополнительное секвенирование гена *SIGIRR* у 37 других недоношенных детей (17 с НЭК) показало, что редкие и новые варианты *SIGIRR* встречаются чаще у недоношенных детей с НЭК по сравнению с контролем, что еще больше указывает на то, что *SIGIRR* является геном, повышающим риск НЭК [57].

Функциональные полиморфизмы *NOD2* также связаны с развитием НЭК у новорожденных и воспалительных заболеваний кишечника у взрослых. Это доказали немецкие ученые в своем исследовании, где они обследовали 9000 недоношенных новорожденных европейского происхождения и обнаружили, что хотя ни один вариант *NOD2* не был связан с НЭК, наличие 2 или более вариантов *NOD2* с потерей функции было значительно связано с повышенным риском НЭК (OR=4,14, 95% CI 1,41–12,12, $p=0,009$) (табл. 3) [56].

В США в 2016 году Sampath и другие оценили ключевой ген аутофагии *ATG16L1* и обнаружили, что распространенный вариант *ATG16L1* (Thr300Ala) обеспечивает защиту от НЭК (OR=0,4, 95% CI 0,19–0,81), также была выявлена тенденция к снижению частоты НЭК среди младенцев, гомозиготных по аллелю варианта потери функции, что является дополнительным доказательством важности этого гена (табл. 3) [57].

Поскольку составной частью процесса воспаления является повышение проницаемости, ученые активно исследовали гены белков, провоцирующих развитие воспалительного процесса. Исследование 107 новорожденных в Италии, было направлено на генетическую регуляцию маннозосвязывающего лектина (ген *MBL*). Они определили, что промоторный SNP (–221 X/Y) гена *MBL* чаще встречается у новорожденных с НЭК (OR 4,42, 95% CI 1,11%–17,49%, $p=0,03$). Этот же полиморфизм был связан с повышенным уровнем *MBL* в сыворотке крови, что подтверждает гипотезу о том, что варианты усиления функции *MBL* связаны с повышенным риском развития НЭК (табл. 3) [57].

Фактор активации тромбоцитов (PAF) является мощным провоспалительным фосфолипидом, его антагонист белок-активатор *GM2A*. Zhou и коллеги в 2015 году выяснили, что полиморфизмы *GM2A* rs1048719 (OR 1,86, 95%) и rs2075783 (OR 3,23, 95%) снижают выработку белка-активатора, тем самым повышая риск развития НЭК [57, 58].

Другой активный провоспалительный ген – ядерный фактор-карра В (*NFKB*) и его полиморфизм g.-24519delATTG, за счет которого повышается экспрессия *NFKB*, был выявлен у всех 15 младенцев с НЭК ($p=0,003$), по сравнению с контрольной группой (166 детей без НЭК) (табл. 3) [58–60].

Продолжаются исследования по изучению регуляции кишечно-сосудистого барьера у недоношенных детей (табл. 3). Так, в Венгрии в 2016 году исследовали 128 младенцев с низкой массой тела (< или = 1500 грамм) и выявили полиморфизм гена сосудистого эндотелиального фактора (мутантный аллель *VEGF*-2578). Этот полиморфизм снижает продукцию *VEGF*, а это в свою очередь повышает риск развития НЭК (OR 2,77, 95% $p=0,049$) [60]. В Польше в 2018 год, определяли полиморфизмы эндотелиальной NO-синтазы 894G>T и 786T>C, данные полиморфизмы повышают продукцию оксида азота, повышают риск развития НЭК и являются предикторами тяжелого течения заболевания (*eNOS* 894G>T: OR= 20, 95% $p=0,0004$; *eNOS* 786T>C: OR 4,88, 95%, $p=0,013$) [59].

Анализируя, приведенные выше исследования, становится ясно, что одна из облигатных проблем при недоношенности – дефицит витамина D является существенным фактором, влияющим на внутрипросветную воспалительную активность в тонкой кишке.

Известно, что метаболиты витамина D – 25(OH)D и 1,25(OH)2D3 действуют на клетки не прямо, а опосредованно, через специфические рецепторы, которые имеются во многих органах-мишенях, включая кишечник. Большая часть клеток относится к клеткам иммунной системы, например, Th17-хелперы, активность которых подавляет витамин D, снижая воспалительную реакцию тканей. Другие клетки, витамин D, наоборот стимулирует, к таким относятся Т-супрессоры [16–22]. Помимо клеток, витамин D способен регулировать правильное соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ингибирует интерлейкин 12, фактор некроза опухоли и увеличивает продукцию интерлейкина 10). Кроме того, витамин D способен повышать экспрессию *NOD2* в эпителиальных клетках кишечника [22].

И наконец, сами полиморфизмы гена рецептора витамина D способны оказывать влияние на регуляцию проницаемости кишечника, индуцировать бактериальную транслокацию и как итог реализацию НЭК (рис. 1). В 2020 году в Польше было обследовано 122 недоношенных новорожденных и показано, что частота НЭК была в 2 раза выше среди носителей генотипа CC полиморфизма Aра I (rs797532) гена *VDR* (OR = 2,129 (1,169–3,912), $p<0,05$) [48]. Китайские ученые продемонстрировали, что носительство мутантного генотипа GG полиморфизма Bsm I (rs1544410) гена *VDR* повышает тяжесть течения НЭК ($p=0,006$) (табл. 3) [59].

Таким образом, результаты исследований последних лет аргументируют актуальность и дают предпосылки для дальнейшего изучения уровня 25(OH)D у недоношенных новорожденных, выявить определенные закономерности и решить проблему лечения тяжелых заболеваний у недоношенных детей, это даст нам возможность снизить смертность младенцев в неонатальном периоде и обеспечить им здоровое полноценное детство.

Рисунок 1.
Идентификация
неинвазивных
маркеров пора-
жения кишечника
у недоношенных
детей и оценка
влияния генов
кандидатов на
течение патологи-
ческого процесса



Заключение

Таким образом, сохраняющаяся стабильной частота рождения недоношенного ребенка, современные технологии выхаживания недоношенного ребенка, высокая частота НЭК среди данной категории пациентов, сложность и многогранность этиологии и патогенеза НЭК, невозможность на современном этапе своевременно установить диагноз, а соответственно вовремя начать лечение диктует необходимость медицинскому сообществу объединять свои усилия в идентификации ранних доклинических высокоспецифичных и неинвазивных маркеров формирования НЭК.

Значимое снижение показателей 25(OH)D характерно для недоношенных детей и выявляется непосредственно после рождения. Нарушения обеспеченности 25(OH)D свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований с накоплением эпидемиологического материала, формирования концепций диагностики, индивидуальной профилактики и лечения гиповитаминоза D среди недоношенных детей, которые могут отличаться от подходов к коррекции статуса витамина D в общей популяции.

Эта непростая задача требует комплексного междисциплинарного подхода и касается множества медицинских отраслей: перинатология, неонатология, педиатрия, хирургия, гастроэнтерология, генетика, метагеномика, метаболомика и безусловно не должна оставаться без внимания.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках проекта ФГБОУ ВО СибГМУ МЗ РФ «Особенности нарушений кальций-фосфорного гомеостаза у недоношенных детей с экстремальной и очень низкой массой тела», реализуемого в соответствии с Положением № 51 от 16.05.2022 «О поддержке научно-исследовательских проектов, выполняемых молодыми учеными SibMedSholar», протокол заседания конкурсной комиссии от 27.06.2022.

Financial support

The work was carried out within the framework of the project of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation “Features of disorders of calcium-phosphorus homeostasis in premature infants with extreme and very low body weight”, implemented in accordance with Regulation No. 51 of May 16, 2022 “On support for research projects carried out by young SibMedSholar scientists”, minutes of the meeting of the competition commission dated 06/27/2022

Информированное согласие

Дизайн исследования не предполагал наличия информированного согласия пациентов или их родителей либо законных представителей.

Вклад авторов

Е. В. Лошкова – разработка концепции и дизайна, подготовка литературного обзора, обсуждение рукописи, и проверка содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

В. К. Прудникова – подготовка литературного обзора и интерпретация данных.

Ю. С. Рафикова – подготовка литературного обзора и интерпретация данных.

Л. В. Ким – техническое сопровождение.

Т. С. Люлька – техническое сопровождение.

В. А. Желев – контроль сроков выполнения.

Т. В. Саприна – обсуждение дизайна и содержания рукописи.

А. И. Хавкин – подготовка обзора и обсуждение содержания рукописи.

Е. А. Боженко – техническое сопровождение.

Authors' contributions

E. V. Loshkova – development of the concept and design, preparation of a literature review, discussion of the manuscript, and verification of the content, final approval of the manuscript for publication.

V. K. Prudnikova – preparation of a literature review and data interpretation.

Yu. S. Rafikova – preparing a literature review and interpreting the data.

L. V. Kim – technical support.

T. S. Cradle – technical support.

V. A. Zhelev – control of deadlines.

T. V. Saprina – discussion of the design and content of the manuscript.

A. I. Khavkin – preparation of the review and discussion of the content of the manuscript.

E. A. Bozhenko – technical support.

Литература | References

1. Jones I.H., Hall N. J., J. Pediatr, et al. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis – a systematic review. Recent advances in understanding necrotizing enterocolitis. *F1000Res*, 107 (2019). 2020;220:86–92 e83.
2. Zani A., Pierro A. Necrotizing enterocolitis: controversies and challenges. *F1000Res*. 2015 Nov 30;4: F1000 Faculty Rev-1373. doi: 10.12688/f1000research.6888.1.
3. Barbara G., Barbaro M. R., Fuschi D., et al. Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier. *Front Nutr*. 2021 Sep 13;8:718356. doi: 10.3389/fnut.2021.718356. Erratum in: *Front Nutr*. 2021 Nov 01;8:790387.
4. Khavkin A. I., Bogdanova N. M., Novikova V. P. The biological role of zonulin and the effectiveness of its use as a biomarker of the syndrome of increased intestinal permeability. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2021;66(1):31–38. (in Russ.) doi: 10.21508/1027–4065–2021–66–1–31–38.
Хавкин А. И., Богданова Н. М., Новикова В. П. Биологическая роль зонulina и эффективность его использования в качестве биомаркера синдрома повышенной кишечной проницаемости. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2021;66(1):31–38. doi: 10.21508/1027–4065–2021–66–1–31–38.
5. Simanenkova V. I., Maev I. V., Tkacheva O. N., et al. Epithelial permeability syndrome in clinical practice. Multidisciplinary national consensus. *Cardiovascular therapy and prevention*. 2021;20(1):2758. (in Russ.) doi: 10.15829/1728–8800–2021–2758.
Симаненков В. И., Маев И. В., Ткачева О. Н., и др. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(1):2758. doi: 10.15829/1728–8800–2021–2758.
6. Adams D. H. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1175. doi: 10.1136/gut.2007.121533.
7. Koziele M. J., Ziaja M., Piastowska-Ciesielska A. W. Intestinal Barrier, Claudins and Mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2021 Oct 26;13(11):758. doi: 10.3390/toxins13110758.
8. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res*. 2020 Jan 31;9: F1000 Faculty Rev-69. doi: 10.12688/f1000research.20510.1.
9. Vermette D., Hu P., Canarie M. F., Funaro M., Glover J., Pierce R. W. Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med Exp*. 2018 Sep 26;6(1):37. doi: 10.1186/s40635–018–0203–4.
10. Zhao X., Zeng H., Lei L., et al. Tight junctions and their regulation by non-coding RNAs. *Int J Biol Sci*. 2021 Jan 31;17(3):712–727. doi: 10.7150/ijbs.45885.
11. Wood Heckman L. K., DeBoer M. D., Fasano A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 Jul;36(5): e3309. doi: 10.1002/dmrr.3309.
12. Rosenthal R., Günzel D., Piontek J., Krug S. M., Ayala-Torres C., Hempel C., et al. Claudin-15 forms a water channel through the tight junction with distinct function compared to claudin-2. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020 Jan;228(1): e13334. doi: 10.1111/apha.13334.
13. Krug S. M., Günzel D., Conrad M. P., et al. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Aug;69(16):2765–78. doi: 10.1007/s00018–012–0949–x.
14. Sampath V., Bhandari V., Berger J., et al. A functional ATG16L1 (T300A) variant is associated with necrotizing enterocolitis in premature infants. *Pediatr Res*. 2017 Apr;81(4):582–588. doi: 10.1038/pr.2016.260.
15. Fawley J., Cuna A., Menden H. L., et al. Single-Immunoglobulin Interleukin-1-Related Receptor regulates vulnerability to TLR4-mediated necrotizing enterocolitis in a mouse model. *Pediatr Res*. 2018 Jan;83(1–1):164–174. doi: 10.1038/pr.2017.211.
16. Tian J., Liu Y., Jiang Y., et al. Association of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 with necrotizing enterocolitis in premature infants. *Mol Cell Biochem*. 2017 Jun;430(1–2):201–209. doi: 10.1007/s11010–017–2972–6.
17. Szecht D., Neumann-Klimasińska N., Błaszczyński M., et al. Candidate gene analysis in pathogenesis of surgically and non-surgically treated necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Mol Cell Biochem*. 2018 Feb;439(1–2):53–63. doi: 10.1007/s11010–017–3135–5.

18. Huizing M.J., Cavallaro G., Moonen R.M., et al. Is the C242T Polymorphism of the CYBA Gene Linked with Oxidative Stress-Associated Complications of Prematurity? *Antioxid Redox Signal.* 2017 Dec 10;27(17):1432–1438. doi: 10.1089/ars.2017.7042.
19. Prencipe G., Azzari C., Moriondo M., et al. Association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Aug;55(2):160–5. doi: 10.1097/MPG.0b013e31824e5f7a.
20. Sankararaman S., Yanamandra K., Napper D., Caldito G., Dhanireddy R. The prevalence of platelet activating factor acetylhydrolase single nucleotide polymorphisms in relationship to necrotizing enterocolitis in Northwest Louisiana infants. *Springerplus.* 2013 Jul 2;2(1):294. doi: 10.1186/2193–1801–2–294.
21. Yan X., Managlia E., Liu S.X., Tan X.D., Wang X., Marek C., et al. Lack of VEGFR2 signaling causes maldevelopment of the intestinal microvasculature and facilitates necrotizing enterocolitis in neonatal mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016 May 1;310(9):G716–25. doi: 10.1152/ajpgi.00273.2015.
22. Ma F., Li S., Hao H., Gao P., Dai Y., Himani C., et al. Association of Heparin-binding EGF-like Growth Factor Polymorphisms With Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018 Apr;66(4): e99–e102. doi: 10.1097/MPG.0000000000001753.
23. Llanos A.R., Moss M.E., Pinzón M.C., Dye T., Sinkin R.A., Kendig J.W. Epidemiology of neonatal necrotizing enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2002 Oct;16(4):342–9. doi: 10.1046/j.1365–3016.2002.00445.x.
24. Bein A., Eventov-Friedman S., Arbell D., Schwartz B. Intestinal tight junctions are severely altered in NEC preterm neonates. *Pediatr Neonatol.* 2018 Oct;59(5):464–473. doi: 10.1016/j.pedneo.2017.11.018.
25. Hoffsten A., Markasz L., Lilja H.E., Olsson K.W., Sindelar R. Early Postnatal Comprehensive Biomarkers Cannot Identify Extremely Preterm Infants at Risk of Developing Necrotizing Enterocolitis. *Front Pediatr.* 2021 Oct 22;9:755437. doi: 10.3389/fped.2021.755437.
26. de Kroon R.R., de Baat T., Senger S., van Weissenbruch M.M. Amniotic Fluid: A Perspective on Promising Advances in the Prevention and Treatment of Necrotizing Enterocolitis. *Front Pediatr.* 2022 Mar 14;10:859805. doi: 10.3389/fped.2022.859805.
27. MacQueen B.C., Christensen R.D., Yost C.C., Gordon P.V., Baer V.L., Schlager R, Lowe J. Reference intervals for stool calprotectin in preterm neonates and their utility for the diagnosis of necrotizing enterocolitis. *J. Perinatol.* 2018 Oct;38(10):1379–1385. doi: 10.1038/s41372–018–0108–9.
28. Zoppelli L., Güttel C., Bittrich H.J., Andrée C., Wirth S., Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology.* 2012;102(1):68–74. doi: 10.1159/000337841.
29. van Zoonen A.G.J.F., Hulzebos C.V., Muller Kobold A.C., Kooi E.M.W., Bos A.F., Hulscher J.B.F. Serial fecal calprotectin in the prediction of necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *J Pediatr Surg.* 2019 Mar;54(3):455–459. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.04.034.
30. Baranowski J.R., Claud E.C. Necrotizing Enterocolitis and the Preterm Infant Microbiome. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1125:25–36. doi: 10.1007/5584_2018_313.
31. Wang K., Tao G., Sun Z., Sylvester K.G. Recent potential noninvasive biomarkers in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2019 Apr 22;2019:8413698. doi: 10.1155/2019/8413698.
32. Alganabi M., Lee C., Bindu E., Li B., Pierro, A. Recent advances in understanding necrotizing enterocolitis. *F1000Res.* 2019 Jan 25;8: F1000 Faculty Rev-107. doi: 10.12688/f1000research.
33. Kim L. V., Zhelev V.A., Slizovskii G.V., et al. Some aspects of etiopathogenesis and diagnosis of necrotizing enterocolitis in children. *Mother and Child in Kuzbass.* 2021;3 (86):21–26 (in Russ.)
Ким Л. В., Желев В. А., Слизовский Г. В., и др. Некоторые аспекты этиопатогенеза и диагностики некротизирующего энтероколита у детей // *Мать и Дитя в Кузбассе.* 2021. № 3(86). С. 21–26.
34. Wang K., Tao G., Sun Z., Sylvester K.G. Recent potential noninvasive biomarkers in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2019 Apr 22;2019:8413698. doi: 10.1155/2019/8413698.
35. Wang K., Tao G., Sylvester K.G. Recent advances in prevention and therapies for clinical or experimental necrotizing enterocolitis. *Dig. Dis. Sci.* 2019 Nov;64(11):3078–3085. doi: 10.1007/s10620–019–05618–2.
36. Union of Pediatricians of Russia. National program Vitamin D deficiency in children and adolescents of the Russian Federation: modern approaches to correction. Moscow. *Pediatr.* 2021. 96 p. (in Russ.)
Национальная программа «Недостаточность витамина D у детей и подростков Российской Федерации: современные подходы к коррекции» / Союз педиатров России [и др.]. – М.: *ПедиатрЪ*, 2021. – 96 с.
37. Chen Z., Lv X., Hu W., Qian X., Wu T., Zhu Y. Vitamin D Status and Its Influence on the Health of Preschool Children in Hangzhou. *Front Public Health.* 2021 May 17;9:675403. doi: 10.3389/fpubh.2021.675403.
38. Ncayiyana J.R., Martinez L., Goddard E., Myer L., Zar H.J. Prevalence and Correlates of Vitamin D Deficiency among Young South African Infants: A Birth Cohort Study. *Nutrients.* 2021 Apr 29;13(5):1500. doi: 10.3390/nu13051500.
39. Loshkova E. V., Ponomarenko Yu. B. Seasonal fluctuations in vitamin D levels in children with oncohematological diseases. *Experimental and clinical gastroenterology.* 2022;197(1): 14–17 (in Russ.) doi: 10.31146/1682–8658-ecg-197–1–14–17.
Лошкова Е. В., Пономаренко Ю. Б. Сезонные колебания уровня витамина D у детей при онкогематологических заболеваниях. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022;197(1): 14–17. doi: 10.31146/1682–8658-ecg-197–1–14–17.
40. Kondratieva E. I., Loshkova E. V., Zakharova I. N., Shubina Yu.F., Saprina T. V., Nikonova V.S. Assessment of vitamin D sufficiency in different age periods. *Meditsinskiy sovet = Medical Council.* 2021;(12):294–303. (In Russ.) doi: 10.21518/2079–701X-2021–12–294–303.
Кондратьева Е. И., Лошкова Е. В., Захарова И. Н., Шубина Ю. Ф., Саприна Т. В., Никонова В. С. Оценка обеспеченности витамином D в различные возрастные периоды *Медицинский совет.* 2021. № 12. С. 294–303. doi: 10.21518/2079–701X-2021–12–294–303.
41. Kondratyeva E.I., Loshkova E. V., Zakharova I. N., et al. Vitamin D deficiency: gender characteristics. *Endocrinology: news, opinions, training.* 2021;10(2):18–25. (in Russ.)

- Кондратьева Е. И., Лошкова Е. В., Захарова И. Н., и др. Дефицит витамина D: гендерные особенности. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2021. Т. 10, № 2. С. 18–25.
42. Chen Z., Lv X., Hu W., Qian X., Wu T., Zhu Y. Vitamin D Status and Its Influence on the Health of Preschool Children in Hangzhou. *Front Public Health*. 2021 May 17;9:675403. doi: 10.3389/fpubh.2021.675403.
43. Ncayiyana J.R., Martinez L., Goddard E., Myer L., Zar H. J. Prevalence and Correlates of Vitamin D Deficiency among Young South African Infants: A Birth Cohort Study. *Nutrients*. 2021 Apr 29;13(5):1500. doi: 10.3390/nu13051500.
44. Gašparović Krpina M., Barišić A., Peterlin A., et al. Vitamin D receptor polymorphisms in spontaneous preterm birth: a case-control study. *Croat Med J*. 2020 Aug 31;61(4):338–345. doi: 10.3325/cmj.2020.61.338.
45. Kosik K., Szpecht D., Al-Saad S.R., et al. Single nucleotide vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI, ApaI, and TaqI) in the pathogenesis of prematurity complications. *Sci Rep*. 2020 Dec 3;10(1):21098. doi: 10.1038/s41598-020-78125-4.
46. Merewood A., Mehta S.D., Grossman X., et al. Widespread vitamin D deficiency in urban Massachusetts newborns and their mothers. *Pediatrics*. 2010 Apr;125(4):640–7. doi: 10.1542/peds.2009-2158.
47. Chen Z., Lv X., Hu W., Qian X., Wu T., Zhu Y. Vitamin D Status and Its Influence on the Health of Preschool Children in Hangzhou. *Front Public Health*. 2021 May 17;9:675403. doi: 10.3389/fpubh.2021.675403.
48. Burris H.H., Van Marter L. J., McElrath T.F., et al. Vitamin D status among preterm and full-term infants at birth. *Pediatr Res*. 2014 Jan;75(1-1):75–80. doi: 10.1038/pr.2013.174.
49. Ncayiyana J.R., Martinez L., Goddard E., Myer L., Zar H. J. Prevalence and Correlates of Vitamin D Deficiency among Young South African Infants: A Birth Cohort Study. *Nutrients*. 2021 Apr 29;13(5):1500. doi: 10.3390/nu13051500.
50. Kim I., Kim S. S., Song J. I., Yoon S. H., Park G. Y., Lee Y. W. Association between vitamin D level at birth and respiratory morbidities in very-low-birth-weight infants. *Korean J Pediatr*. 2019 May;62(5):166–172. doi: 10.3345/kjp.2018.06632.
51. Cuna A., George L., Sampath V. Genetic predisposition to necrotizing enterocolitis in premature infants: Current knowledge, challenges, and future directions. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018 Dec;23(6):387–393. doi: 10.1016/j.siny.2018.08.006.
52. Sampath V., Menden H., Helbling D., Li K., Gastonguay A., Ramchandran R., et al. SIGIRR genetic variants in premature infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 2015 Jun;135(6):e1530–4. doi: 10.1542/peds.2014-3386.
53. Gašparović Krpina M., Barišić A., Peterlin A., et al. Vitamin D receptor polymorphisms in spontaneous preterm birth: a case-control study. *Croat Med J*. 2020 Aug 31;61(4):338–345. doi: 10.3325/cmj.2020.61.338.
54. Castanet M., Costalos C., Haiden N., Hascoet J. M., et al. Early Effect of Supplemented Infant Formulae on Intestinal Biomarkers and Microbiota: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*. 2020 May 20;12(5):1481. doi: 10.3390/nu12051481.
55. De Fazio L., Beghetti I., Bertuccio S. N., et al. Necrotizing Enterocolitis: Overview on In Vitro Models. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 23;22(13):6761. doi: 10.3390/ijms22136761.
56. Rycyk A., Cudowska B., Lebensztejn D. M. Eosinophil-Derived Neurotoxin, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Calprotectin as Non-Invasive Biomarkers of Food Protein-Induced Allergic Proctocolitis in Infants. *J Clin Med*. 2020 Sep 29;9(10):3147. doi: 10.3390/jcm9103147.
57. Sampath V., Menden H., Helbling D., et al. SIGIRR genetic variants in premature infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 2015 Jun;135(6):e1530–4. doi: 10.1542/peds.2014-3386.
58. Tremblay É., Thibault M. P., Ferretti E., et al. Gene expression profiling in necrotizing enterocolitis reveals pathways common to those reported in Crohn's disease. *BMC Med Genomics*. 2016 Jan 22;9:6. doi: 10.1186/s12920-016-0166-9.
59. Kosik K., Szpecht D., Al-Saad S.R., et al. Single nucleotide vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI, ApaI, and TaqI) in the pathogenesis of prematurity complications. *Sci Rep*. 2020 Dec 3;10(1):21098. doi: 10.1038/s41598-020-78125-4.
60. Yan X., Managlia E., Liu S. X., et al. Lack of VEGFR2 signaling causes maldevelopment of the intestinal microvasculature and facilitates necrotizing enterocolitis in neonatal mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 May 1;310(9):G716–25. doi: 10.1152/ajpgi.00273.2015.