

САГАН

Елена Викторовна

СОСТОЯНИЕ БИОТОПОВ КИШЕЧНИКА И КЛИНИКО-ГОРМОНАЛЬНЫЕ  
ОСОБЕННОСТИ ПРИ ОЖИРЕНИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

3.1.21. Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Самойлова Юлия Геннадьевна**

**Официальные оппоненты:**

1. Болотова Нина Викторовна - доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры пропедевтики детских болезней, детской эндокринологии и диabetологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовского государственного медицинского университета имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации.
2. Таранушенко Татьяна Евгеньевна-доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии ИПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Гюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_2023г. на заседании диссертационного совета 208.096.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (634050, г. Томск, Московский тракт, 2). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_2023г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета

Саприна Татьяна Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

В течение более 20 последних лет проблема детского ожирения в мире рассматривается как первоочередная задача сохранения здоровья детей как развитых, так и развивающихся стран и принимает масштабы эпидемии [Wabish M, 2012 г.]. Россия входит в десятку стран с высокой распространенностью ожирения. Исследование, проведенное в г. Москве в рамках программы COSI (Childhood Obesity Surveillance Initiative — инициатива Европейского регионального бюро ВОЗ по эпиднадзору за детским ожирением), в которое было включено 2166 детей 7-летнего возраста, выявило наличие избыточной массы тела у 27% мальчиков и 22% девочек, а ожирение — у 10% и 6% детей соответственно [Latest WHO data on child obesity shows that southern European countries have the highest rate of childhood obesity/доклад Dr Joao Breda 25 ЕСО май 2018 г, Австрия, 2018 г.]. Ожирение по мнению многих авторов, считается сложным многофакторным хроническим заболеванием, где основной причиной является дисбаланс между потребляемой и расходуемой энергией [Fock KM, 2013, Guénard F, 2014 г.].

### **Степень разработанности темы исследования**

По современным данным, кишечная микробиота (КМБ) является «метаболическим органом». Ученые выделяют двунаправленную ось «кишечник-мозг», связь между компонентами которой осуществляется благодаря КМБ и ее метаболитам (дофамин, КЦЖК и др.). В настоящее время продолжают активно накапливаться научные данные, изучающие взаимосвязь нарушений микробиоты кишечника и развитие ожирения [Abenavoli, L., 2019 г. Julita Tokarek, et, 2022]. Появившиеся современные методы метагеномного анализа позволили определить видовой состав микробиоты без необходимости культивирования микроорганизмов. Однако в настоящее время еще не определен конкретный род и вид бактерий, которые напрямую связаны с развитием ожирения [Arumugam M, 2011 г., Park, S, 2020]. Во многих исследованиях важная роль отведена разнообразию и метаболической активности КМБ, которая помимо других важных функций, способна увеличивать потребление энергии из пищи и влиять на синтез некоторых инкретинов, вырабатываемых непосредственно в кишечнике и оказывающих влияние в том числе на пищевое поведение. В современных исследованиях отмечена роль КЦЖК или short-chain fatty acids (SCFAs), как основных метаболитов КМБ, образующихся в результате бактериальной ферментации пищевых волокон [Fauffman, M., 2019г., Liu B., 2021 г.]. «Здоровая микробиота» способна вырабатывать достаточное количество КЦЖК, которые обладают обширным спектром положительного влияния на организм человека (противовоспалительным, противоопухолевым, антиоксическим воздействием, стимулирующим рост нормальной

микробиоты и др.) [Gomes A.C.,2018, Li X.,2020]. Таким образом, проблема взаимосвязи состава, метаболических эффектов КМБ в развитии ожирения недостаточно изучена и требует дополнительного уточнения.

**Цель работы:** установить значимость состава и метаболической активности микробиоты кишечника, клинико-гормональных нарушений у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением для ранней диагностики нарушений углеводного обмена.

**Задачи исследования:**

1. Оценить клинико-метаболические, гормональные особенности детей и подростков с ожирением и избыточной массой тела.
2. Проанализировать состав микробиоты кишечника в детском и подростковом возрасте, с ожирением и избыточной массой тела с использованием различных методов исследования для выявления характерных изменений.
3. Изучить метаболическую активность микробиоты кишечника у детей и подростков с ожирением и избыточной массой тела.
4. Установить взаимосвязь между основными клинико-гормональными изменениями, составом и метаболической активностью микробиоты кишечника при ожирении в детском возрасте.
5. Определить группу риска детей и подростков по развитию нарушений микробиоты кишечника для оптимизации диспансерного наблюдения на амбулаторном этапе.

**Научная новизна исследования**

Впервые изучен таксономический состав КМБ у детей с ожирением и избыточной массой тела во взаимосвязи с метаболической активностью КМБ, который характеризуется увеличением фила *Actinobacteriota* 20,8 % [6,33 : 31,5], ( $p < 0,002$ ) и снижением фила *Bacteroidota* 17,2 % [11,5 : 21,8], ( $p < 0,001$ ), что сопровождается снижением уровня всех короткоцепочечных жирных кислот, преимущественно бутирата до 0,31 мг/г [0,186 : 0,624], ( $p < 0,0001$ ), являющихся лигандами рецепторов GPR41 и GPR43, участвующих в синтезе инкретинов, которые вносят вклад в развитие нарушений углеводного и жирового обменов. Впервые установлено, что метаболическая активность КМБ у детей с ожирением и избыточной массой тела определяется филум *Bacteroidota*, родом *Bacteroides* и видами *Faecalibacterium*, *Bacteroides\_eggerthi*. Впервые было проведено исследование биотопов КМБ с использованием различных методов исследования и получены данные о повышении бактериальной нагрузки в биотопе «Тонкая кишка» с увеличением количества микроскопических грибов рода *Candida* у 41,2 %, ( $p = 0,018$ ), *Micromycetes* у 23,5 % ( $p = 0,002$ ), вирусов простого герпеса у 32,4 % ( $p = 0,046$ ) и Эпштейн-Барр у 38,2 % ( $p = 0,021$ ) и снижением

*Lactobacillus spp.*, *Eubacterium*, *Alcaligenes*. Впервые отмечено, что биотоп «Просветная микробиота толстой кишки» у детей с ожирением и избыточной массой тела характеризовался уменьшением бактериальной нагрузки, что свидетельствует об обеднении микробиоты колонизирующей толстый кишечник.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В результате проведенного исследования определена категория детей и подростков, имеющих факторы риска по развитию нарушений микробиоты кишечника, изменению метаболической активности микробиоты и синтеза определенных гормонов, участвующих в энергетическом обмене. Разработана модель оптимизации диспансерного наблюдения пациентов на амбулаторном этапе, позволяющая выявлять предикторы развития метаболических нарушений с проведением своевременных лечебно-профилактических мероприятий на ранних этапах эволюции ожирения в детском и подростковом возрасте.

### **Методология и методы исследования**

В соответствии с поставленными целью и задачами выполнено простое сравнительное исследование. В работе использованы следующие методологические подходы: клиничко-анамнестические, лабораторные, инструментальные методы (ультразвуковое исследование органов брюшной полости и биоимпедансометрия), исследование микробиоты кишечника путем выделения бактериальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и секвенирования бактериальных генов 16S рРНК, хромато-масс-спектрометрии, исследования метаболитов микробиома кишечника (короткоцепочечных жирных кислот) методом газовой масс-спектрометрии, биоинформационный и статистический анализ данных.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Состав микробиоты кишечника у детей и подростков с ожирением и избыточной массой тела, колонизирующих желудочно-кишечный тракт характеризуется низким разнообразием микробиоты, проявляющееся увеличением представленности бактерий филов *Actinobacteriota* и *Euryarchaeota*, с достоверным уменьшением метаболически активного компонента-фила *Bacteroidota* с последующим снижением продукции всех короткоцепочечных жирных кислот: уксусной, пропионовой, масляной (бутирата), оказывающих влияние на секрецию инкретинов кишечника.

2. Метаболическая трансформация микробиоты кишечника у детей и подростков, сопровождающаяся изменением уровня короткоцепочечных жирных кислот оказывает влияние на секреторную активность гормонов гастроинтестинальной системы и жировой ткани, что приводит к снижению уровня инкретинов глюкагон-подобного пептида (GLP)-1 и 2, при этом наиболее значимые изменения выражены у обследованных, имеющих увеличение

площади висцерального жира, независимо от степени ожирения, позволяя выявить группу риска детей по развитию ранних нарушений углеводного обмена и жирового обменов.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры педиатрии с курсом эндокринологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, в работу Центра общественного здоровья и медицинской профилактики, а также в лечебный процесс МЦ «Профессор» ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом выборки, современными методами обследования и корректными методами обработки полученных данных.

### **Апробация результатов исследования**

Работа обсуждена на заседании кафедры детских болезней ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Результаты работы были представлены на конгрессах, съездах, конференциях: Научно-практическое общество врачей эндокринологов Томской области в рамках научно-практического семинара «Ожирение: персонализированная коррекция и реабилитация», 26 июня 2018 г.; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты патологии человека: вызовы и поиск решений, посвященный 100-летию кафедры микробиологии и вирусологии, 2–12 ноября 2019 г.; XXIII Конгресс педиатров с международным участием, г. Москва, 5–7 марта, 2021 г.; Всероссийская итоговая 80-ая студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова, 26–28 апреля 2021 г.; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фармакотерапия и диетология в педиатрии», г. Томск, 1–2 октября 2021 г.; XIX съезд педиатров с международным участием, г. Москва, 5–7 марта, 2022 г., IX(XXVIII) Национальном диабетологическом конгрессе с международным участием «Сахарный диабет и ожирение-неинфекционные междисциплинарные пандемии XXI века», 5-8 сентября 2022 г., г. Москва. Является победителем постерной сессии в IX(XXVIII) Национальном диабетологическом конгрессе с международным участием «Сахарный диабет и ожирение-неинфекционные междисциплинарные пандемии XXI века», 5-8 сентября 2022 г. с докладом «Метаболическая активность микробиоты толстого кишечника у детей с ожирением».

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из них 4 статьи, цитируемых в базе

данных Scopus, зарегистрирована программа для ЭВМ «Программа диагностики состава пристеночной микрофлоры и гормонального статуса детей и подростков с ожирением» (свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ №2021615402 от 07.04.2022 г.). Исследование поддержано Фондом содействия инновациям «Разработка способа диагностики метаболической активности микробиоты кишечника с целью персонализации лечения ожирения у детей» договор № 13830ГУ/2018 от 03 апреля 2019 г.

### **Личное участие**

Автор принимала непосредственное участие в отборе пациентов для исследования, изучении анамнеза, антропометрических измерений, анализа композиционного состава тела, интерпретации данных лабораторных и инструментальных методов обследования, статистической обработке результатов, поиске и анализе отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы, написании статей по результатам работы проведению статистической обработки результатов.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 196 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждений, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит источников 277, из них 22 отечественных и 255 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 41 таблицей, 22 рисунками.

## **МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Настоящее диссертационное исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в период 2018-2021 гг. В качестве клинических баз использованы: ОГАУЗ «Детская городская больница №1» (заведующий отделением к.м.н Горбатенко Е.В), детская клиника ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий отделением к.м.н Козырицкая Д.В.). Исследование микробиома кишечника методом 16sРНК секвенирования проводили на базе лаборатории ООО «Кномикс» (г. Москва), оценку микробиоты методом хромато-масс-спектрометрии было проведено в лаборатории микробной хроматографии ООО «МедБазис» (г. Санкт-Петербург). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение от 26 ноября 2018 г., регистрационный номер 6905/1). В соответствии с поставленными задачами в структуре исследования выполнены два этапа. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

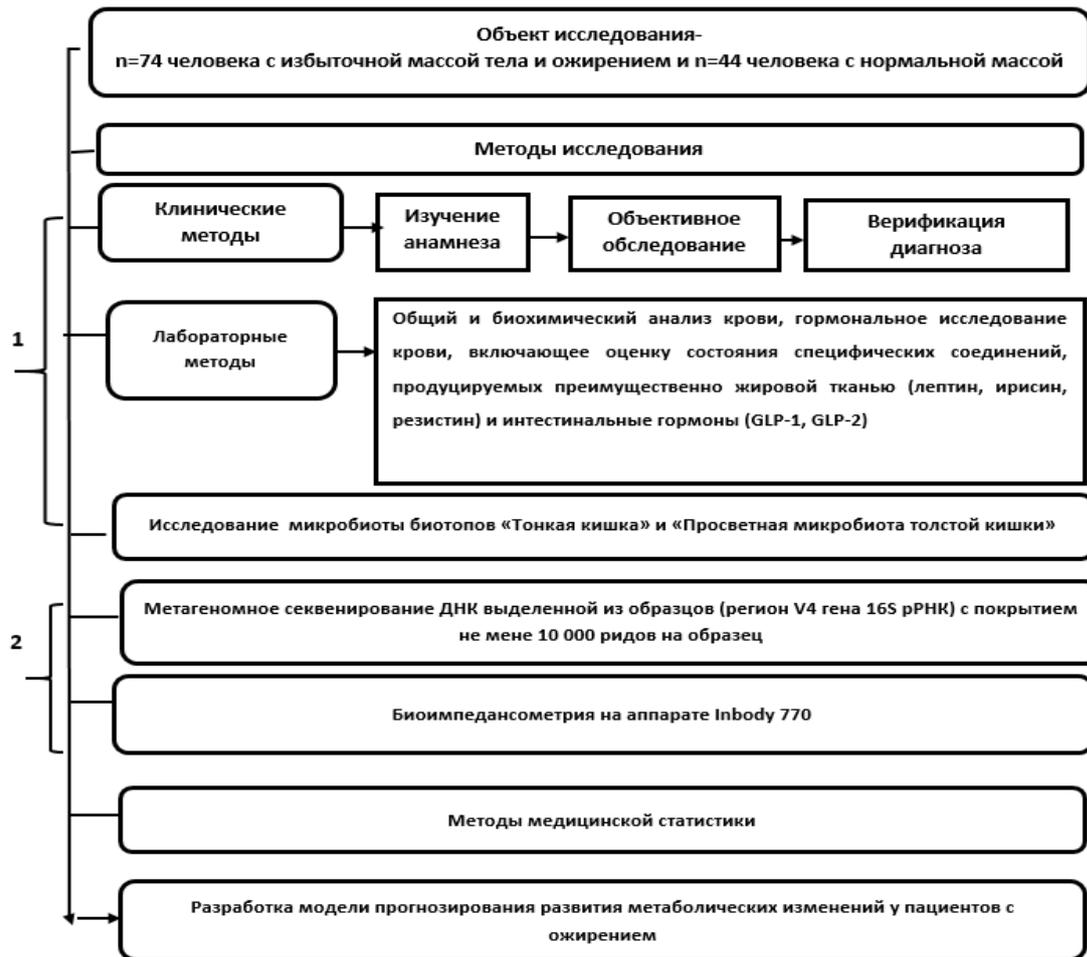


Рисунок 1 – Краткая характеристика проводимых исследований

Было проведено одномоментное сравнительное исследование, в которое было включено 114 детей и подростков. Основную группу составили 74 ребенка и подростка с ожирением или избыточной массой тела. Из них 38 мальчиков (51,3%) и 36 девочек (48,6%). Средний возраст 12,1 [10,8; 14,6] лет. Группу контроля составили 44 условно здоровых ребенка и подростка без острых и тяжелых хронических заболеваний с нормальной массой тела ( $SDS\ IMT \leq 1,0$ , критерии ВОЗ) – 26 мальчиков (59,09 %) и 18 девочек (40,9%) в возрасте 13,1 [10,5; 13,8] лет. Критерии включения пациентов в исследование: дети и подростки в возрасте от 6 до 18 лет с экзогенно-конституциональным ожирением различной степени, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения из исследования: несоответствие критериям включения, наличие у пациента вторичных форм ожирения (гиперкортицизм, гиперинсулинизм, гипогонадизм, гипотиреоз, гипопитуитаризм, преждевременное половое развитие у девочек), наследственных синдромов с ожирением (с-м Прадера-Вилли, с-м Барде-Бидля и др.) и заболеваний, требующих назначения антибактериальных, слабительных, гормональных препаратов, указание в анамнезе ребенка на клинически значимые сопутствующие заболевания внутренних органов, центральной и

периферической нервной системы, заболеваний крови, системных, аутоиммунных, сердечно-сосудистых, воспалительных заболеваний кишечника, при регистрации клинически значимых, остро возникших заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной, мочеполовой систем и желудочно-кишечного тракта, регистрация лабораторно подтвержденной глистной инвазии, применение антибактериальных препаратов (3 и менее месяцев). На первом этапе у всех обследуемых были проанализированы анамнестические данные с выявлением факторов риска развития ожирения и метаболического синдрома, оценены данные объективного статуса, произведен забор венозной крови. Антропометрическое исследование включало: измерение роста с точностью до 0,1 см («Ростомер металлический МСК – 233»), массы тела с точностью до 0,1 кг без обуви и верхней одежды на весах, встроенных в аппарат Inbody 770, расчет индекса массы тела (ИМТ) по Кетле:  $ИМТ = \text{масса тела (в кг)} / \text{рост (в м}^2\text{)}$  с дальнейшей оценкой стандартного отклонения (SDS), что необходимо для верификации избыточной массы тела или ожирения (WHO, 2007). Расчет SDS ИМТ и SDS роста осуществлялся с помощью программного обеспечения, разработанного Всемирной Организацией Здравоохранения: Anthroplus WHO (для детей от 6 до 19 лет), ссылка [www.who-anthroplus.informer.com](http://www.who-anthroplus.informer.com), использовалась формула  $SDS\ ИМТ = (x - X) / SD$ , где  $x$  – показатель ИМТ ребенка,  $X$  – средний показатель ИМТ для данного возраста и пола,  $SD$  – стандартное отклонение показателя ИМТ для данного пола и возраста. В результате исследования было выяснено, что среди всех обследованных ( $n=118$ ), 44 человека имели нормальную массу тела (критерий  $SDS\ ИМТ < 1$ ), а 74 человек (критерий  $SDS\ ИМТ \geq 1$ ) – избыточную массу или ожирение различной степени. Среди девочек верифицировали у 7 (19,4%) избыточную массу тела, 5 (13,8 %) – ожирение I степени, 12 (33,6%) – ожирение II степени, 9 (25%) – ожирение III степени, 3 (8,3 %) – ожирение IV степени. У 5 (13%) мальчиков был выявлен избыток массы тела, у 6 (16 %) ожирение I степени, у 10 (26,3%) ожирение II степени, у 13 (34,2%) ожирение III степени, 4 (10,5%) имели морбидное ожирение. Каждая группа была структурирована по гендерному признаку. Таким образом в группу с  $SDS\ ИМТ < 1$  было включено 26 мальчиков и 18 девочек; а в группу  $SDS\ ИМТ \geq 1$  – 38 мальчиков и 36 девочек соответственно. Учитывая, особенности роста и физического развития детей, связанные не только с полом, но и с возрастом, обследованные были разделены на возрастные страты: до 10 лет – дети, 10 лет и старше – подростки по классификации ВОЗ. У всех пациентов было оценено половое развитие по Таннеру, 34 (28,9%) ребенка имели допубертатное развитие (0-I ст.), а 84 (71,1%) – пубертатное (II-IV ст.). На втором этапе проводились инструментальные методы исследования (ультразвуковое исследование брюшной полости и биоимпедансометрия). После проведения лабораторных методов исследования, проведено изучение микробиоты с помощью методов масс-спектрометрии и 16sРНК секвенирования

достоверных различий в составе, метаболической активности микробиоты, уровня, исследуемых гормонов в группах, различных по возрасту, полу, степени ожирения не получено и было принято решение об объединении групп в одну основную группу. В результате дальнейшее сравнение проводилось между группой детей с ожирением и избыточной массой тела (основная группа) и группой детей с нормальной массой тела (контрольная группа).

### **Методы исследования**

**Клинико-anamnestические:** были проанализированы анамнестические данные с выявлением факторов риска развития ожирения и метаболического синдрома, оценены данные объективного статуса. **Лабораторные методы исследования включали:** общий анализ крови с использованием гематологического анализатора, биохимический анализ крови, исследование расширенного липидного спектра (общий холестерин (ХС), триглицериды, холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП-ХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП-ХС) определяли методом преципитации на биохимическом многоканальном анализаторе «Express –550» фирмы «Ciba-Corning» (Великобритания) после 12-часового голодания, с использованием реактивов «Human» (Германия) и «Bio-AnalyticIndustries» (США), коэффициент атерогенности рассчитывали по методу А.Н. Климова. Уровни лептина, инсулина оценены по принципу ферментной амплификации одностадийного «сэндвичного» ИФА с использованием набора «DSL-10-23100 ACTIVE Human Leptin ELISA». Состояние  $\beta$ -клеточного аппарата поджелудочной железы оценены по показателям С-пептида с использованием тест – системы для радиоиммунного метода «Immunotech» (Чехия). **Инструментальные методы исследования:** ультразвуковое исследование органов брюшной полости (аппарат General Electric LOGIQ e) и оценка состава тела с помощью метода биоимпедансного анализа (аппарат Inbody 770 (Корея) с определением показателей жировой ткани (площадь висцерального жира, абсолютное и процентное содержания жировой ткани в организме, распределение ее по сегментам), мышечной ткани (активная масса клеток, тощая масса и распределение ее по сегментам), водного баланса (внеклеточная и общая вода организма, их соотношение) и параметров общего состояния организма (фазовый угол тела, индекс безжировой массы тела, индекс жировой массы тела). Ультразвуковое исследование органов брюшной полости проводилось на базе ОГАУЗ ДГБ №2 поликлиника 2 и ОГАУЗ ДГБ №1 утром, натощак по общепринятой методике. **Исследование микробиоты кишечника:** Исследование биотопа «Просветная микробиота толстой кишки» (замороженный кал, собранный в предварительно выданный каждому пациенту одноразовый контейнер) осуществлялось с помощью двух методов исследования: метагеномного секвенирования ДНК выделенной из образцов кала в лаборатории ООО «Кномикс», г.Москва и метода хромато-

масс-спектрометрии (ООО «МедБазис», С-Петербург). Исследование метаболической активности микробиоты оценивалось методом газовой масс-спектрометрии в лаборатории ООО «Гемотест», г.Томск. Метагеномное секвенирование ДНК выделенной из образцов кала (регион V4 гена 16S рРНК) проводилось с использованием набора Qiagen Power Fecal PRO в соответствии с инструкцией производителя в лаборатории ООО «Кномикс». Последовательности базы 16S были обрезаны в соответствие с использованными праймерами (515F/806R) и агрегированы с порогом сходства 99%. Анализы проводились на прореженных до 3000 ридов на образец таблицах представленности характерных последовательностей. Альфа-разнообразие было оценено по метрике Шеннона и Chao1. Таблицы представленности на уровнях вида, рода, семейства и т. д. были получены путем суммирования представленности характерных последовательностей, принадлежащих соответствующей таксономической группе. Расстояние между образцами было оценено на уровне бактериальных родов с использованием меры расстояния Брея-Кертиса. Для оценки метаболического потенциала сообщества, полученные представленности характерных последовательностей были переданы в алгоритм PICRUSt2 [Douglas et al. 2020], представленность метаболических путей и модулей оценивалась по базам KEGG и MetaCyc [Caspi et al. 2018]. Исследование биотопа «Тонкая кишка» (венозная кровь) проводилось с помощью метода хромато-масс-спектрометрии (ООО «МедБазис», Санкт-Петербург). Исследование КЦЖК в кале (Faecal short-chain fatty acids (SCFA)) проводилось с помощью метода газовой масс-спектрометрии на газовом хроматографе с цифровым управлением параметрами режима и обработки данных (Хромос GX-1000) в лаборатории «Гемотест» (г.Томск). Метод основан на определении в фекалиях короткоцепочечных жирных кислот, являющихся метаболитами в основном анаэробной микрофлоры: уксусная – C<sub>2</sub>, пропионовая – C<sub>3</sub>, масляная – C<sub>4</sub>, изомаляная – iC<sub>4</sub>, изовалериановая - iC<sub>5</sub>, изокапроновая - iC<sub>6</sub>, а также расчетные показатели: изоC<sub>n</sub>/C<sub>n</sub>– отношение суммарного содержания кислот с разветвленной цепью (изомеров) к кислотам с неразветвленной цепью; АИ – анаэробный индекс – отношение суммы пропионовой и масляной кислот к уксусной кислоте. Пациентам из контрольной группы проведены те же исследования, что и пациентам основной групп.

**Статистические методы.** Статистическую обработку клинико-anamnestических данных и лабораторно-инструментальных параметров проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows version 10.0», анализ метагеномных данных с использованием языка программирования R версии 3.6.1. Для установления зависимости исхода от фактора - расчет отношение шансов - приведено в виде ОШ (95%-й ДИ). За статистически значимые различия принято значение  $p < 0,05$ . Различия в клинических и параклинических параметрах между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни-

Уилкоксона и критерия  $\chi^2$ , в связанных выборках (до и после лечения) использовали критерий Мак-Немара. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные - при нормальном распределении в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартное отклонение, при распределении, отличном от нормального - Mediana (Q25; Q75). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Проводился ROC – анализ с расчетом площади под ROC – кривой (AUC – area under ROC curve) – количественной интерпретации вышеназванного статистического анализа (чем выше показатель AUC, тем более информативен метод исследования. **Биоинформационный анализ.** Полученные в результате секвенирования данные были оценены аналитической системой Кномикс-Биота (<https://biota.knomics.ru/>) (Efimova et al. 2018), в том числе были осуществлены: базовая фильтрация и оценка качества данных, профилирование таксономического состава, визуализация, сопоставление состава с мета-данными. Таксономический анализ прочтения секвенаторов осуществляли с помощью QIIME v2 (Bolyen et al. 2019). В первую очередь была проведена фильтрация ридов с помощью алгоритма deblur (Amir et al. 2017) для получения представленности характерных последовательностей (англ. representative sequences). Далее проводилась таксономическая классификация этих последовательностей с использованием классификатора, реализованного в программном пакете QIIME2 (Bokulich et al. 2018) и обученного по базе SILVA v.138 (Quast et al. 2013) предобработанной с помощью RESCRIPT (<https://github.com/bokulich-lab/RESCRIPT>, Quast et al. 2013, Creative Commons Attribution 4.0 License (CC-BY 4.0)). Последовательности базы 16S были обрезаны в соответствие с использованными праймерами (515F/806R) и агрегированы с порогом сходства 99%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно дизайну исследования, на первом этапе была описана клиническая и лабораторная характеристика обследованных групп. Было выяснено, что 32 % детей основной группы были рождены с весом 4 кг и более; 12% этой же группы имели вес до 3 кг, вес остальных детей соответствовал среднему для срока гестации. Из них 66,6% родились естественным путем, 33,3% путем кесарева сечения (OR-2,1 (ДИ 1,1-4,8). Находились на искусственном вскармливании с рождения 7% детей. При этом до 3 мес. получали естественное вскармливание 13,5% (OR-1,34 (ДИ 0,501-3,605), до 6 мес. 54% (OR-0,518 (ДИ 0,243-1,103), до 12 мес. -18,9% детей (OR-2,7 (ДИ 1,16-6,25). Значимые прибавки веса за беременность отмечалось у большей части матерей (56,4%). Сахарный диабет 2 типа регистрировался у 58% родственников детей (OR -18,9 (ДИ 5,37-66,8) (из них 38,5% составляли бабушки, 7% матери, 5,3% дедушки, 5,2% отцы, 2% родные братья и сестры). Течение настоящей беременности было осложненным у большинства женщин -82,1%, (OR-

11,4 (ДИ-4,7-27,6), (у 45% гестоз, у 16% заболевания эндокринных органов, у 9% заболевания почек и у 5% анемии). Во время беременности 11% женщин (OR-2,8(ДИ-1,25-6,29) перенесли ОРВИ, которые в 46% потребовали назначения антибактериальных препаратов (OR-6,6(ДИ-2,35-18,706). В неонатальном возрасте у большинства детей (59,2%) регистрировались состояния и заболевания, согласно формулировки из амбулаторной карты (у 19% дисбиоз кишечника, у 10,5% перинатальное поражение нервной системы, у 8,7% ОРЗ, у 5,3% дакриоцистит, у 3,5% врожденный порок сердца, у 1,75% атопический дерматит, у 15% детей сохранялась желтуха к концу неонатального периода). У 82% детей в раннем возрасте верифицировали частые ОРЗ (OR-58,5 (ДИ 15,8-216,7), которые в 81% (OR-2 (ДИ 1,2-4,7) случае требовали назначения антибактериальных препаратов, и нередко повторных курсов. Анамнестически был оценен темп прибавок массы тела у детей основной группы, который был больше 3 SDS половозрастной норме на первом году жизни в два возрастные периода: 3–7 месяца и 9–12 месяцев. Дети с ожирением и избыточной массой тела имели статистически значимые отличия показателей биохимического исследования крови и липидного спектра от контрольной группы, но при этом значения были в пределах референсных значений: снижен уровень общего белка-74,5 г/л (72,3; 78), ( $p=0,001$ ), уровень общего кальция- 2,5 ммоль/л (2,4; 2,5), ( $p=0,001$ ). В липидограмме отмечалось некоторое повышение уровня триацилглицеридов 1,1 (0,8; 1,7), ( $p=0,044$ ). При проведении инструментальных методов исследования у пациентов с ожирением и избыточной массой тела получены данные об эхоскопических признаках гепатомегалии- косой-вертикальный размер печени (КВП) 127 мм (121,75; 140,75), ( $p=0,003$ ), толщина правой доли печени (ПД) 110 (85,5; 117,8), ( $p=0,001$ ). При проведении биоимпедансометрии были зарегистрированы изменения состава тела у детей основной группы, увеличены висцерального жира (VFA)-159 (125,5; 195,9), ( $p < 0,001$ ), жировой массы (BFM) -31,8 kg (24,7; 40,3), ( $p < 0,001$ ), перцентиля жировой массы (PBF) -43,3 (39,5; 46,3), ( $p < 0,001$ ), ИМТ (BMI)-29 (25,9; 33,6), ( $p < 0,001$ ), безжировой массы (SLM) -40,9 (32,5; 51,1), ( $p = 0,044$ ). Отмечалось увеличение содержания общей воды (TBW) в организме-31,8 L (25,3; 39,8), ( $p = 0,044$ ) и внутриклеточной воды (ICW)- 19,75 L (15,53; 24,65), ( $p = 0,021$ ), что может свидетельствовать об избыточной задержке жидкости в организме. Показатели скелетная мышечная масса (SMM), внеклеточная вода (ECW) и ECW/внутриклеточной жидкости (TBW) не имели статистической разницы между группами. Были увеличены индекс безжировой массы (FFMI) 16,7 (15,7; 18,8), ( $p=0,003$ ) и индекс жировой массы тела (FMI) -12 (10,3; 15,7), ( $p < 0,001$ ). Показатель фазового угла тела (Whole Body Phase Angle) не имел статистических отличий. При сравнении гормональных показателей крови пациентов основной группы были снижены уровни GLP-1 -20 пг/мл (17,3; 24,0), ( $p < 0,001$ ) и GLP-2- 102,95 пг/мл (91,97; 149,15), ( $p < 0,001$ ) соответственно. Уровень GLP-1 и GLP-2 был наиболее снижен у детей, у которых

площадь висцерального жира значительно увеличена ( $p < 0,001$ ). Содержание глюкагона-174,3 пг/мл (156,2; 200,1), ( $p < 0,001$ ), лептина- 4,5 пг/мл (2,2; 23,7), ( $p = 0,008$ ) и резистина 8,8 нг/мл (7,3; 26,7) ( $p = 0,019$ ) были снижены у детей с ожирением. Уровень инсулина был значительно выше в группе детей с ожирением 16,1 (10,2; 33,5), ( $p = 0,001$ ). Достоверных отличий в показателях С-пептида и ирисина не было зарегистрировано.

### **Особенности состава микробиоты кишечника у детей с ожирением с использованием различных методов диагностики**

При исследовании микробиоты кишечника обследуемых детей с использованием газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) в биотопе «Тонкая кишка» общая бактериальная нагрузка была выше у детей с ожирением 19146 кл/г\* $10^5$  (14549; 25514), ( $p < 0,001$ ). В обеих группах преобладали маркеры анаэробов ( $p = 0,001$ ). Были выявлены повышенные маркеры вирусов, 3879 (2410; 16200), ( $p < 0,001$ ) (*Herpes simplex* был повышен у 32,4% пациентов, ( $p = 0,046$ ), вирус Эпштейн-Барр был увеличен в 38,2% случаев ( $p = 0,021$ ). Отмечалось повышение *Candida spp.* у 41,2%, ( $p = 0,018$ ), *Micromycetes spp* у 23,5%, ( $p = 0,002$ ). В структуре основных типов преобладали *Fermicutes* у 75 % (73; 77) в основной группе и 70,0 % (66; 74,5) у контрольной ( $p = 0,013$ ), *Actinobacteria* регистрировалась у 25% (23; 27) детей с ожирением и у 29 % (24,3; 33) с нормальной массой ( $p = 0,044$ ), тип *Bacteroidia*, *Flavobacteria* определялся в единичных случаях в группе контроля и был диагностически не значимым. Тип *Proteobacteria* был представлен в структуре основных филов группы контроля у 1 % (1; 1), в основной группе практически не встречался ( $p = 0,001$ ). При исследовании маркеров микробиоты кишечника биотопа «Просветная микробиота толстой кишки» у детей с избыточной массой тела и ожирением количество бактерий в образце (общая бактериальная нагрузка) была ниже, чем в группе контроля. В структуре основных типов (филов) у детей с ожирением преобладали *Fermicutes*, 72 % (64; 78,5), ( $p = 0,019$ ). Сниженными были филов - *Actinobacteria*-22% (14; 26,5), ( $p = 0,105$ ), *Bacteroidia*-6 % (3; 9,5) ( $p = 0,173$ ). На уровне маркеров родов, видов микроорганизмов, входящих в биотоп, были выявлены изменения, характеризующиеся снижением микробного разнообразия: *Bifidobacterium spp*, ( $p = 0,01$ ), *Butyrivibrio spp*, ( $p = 0,02$ ), *Eubacterium spp*, ( $p = 0,002$ ), *Prevotella spp*, ( $p = 0,01$ ), *Aspergillus spp*, ( $p = 0,00002$ ), *Micromycetes spp*, ( $p = 0,001$ ), *Bacillus cereus*, ( $p = 0,006$ ), *Bacteroides fragilis*, ( $p = 0,01$ ), *Clostridium difficile*, ( $p = 0,02$ ), *Clostridium ramosum*, ( $p = 0,003$ ), *Eggerthella lenta*, ( $p = 0,004$ ), *Propionibacterium freudenreichii*, ( $p = 0,04$ ), *Propionibacterium jensenii*, ( $p = 0,0001$ ), *Staphylococcus epidermidis*, ( $p = 0,03$ ). *Bacillus megaterium* был выше у пациентов основной группы 996(0;4700) (кл/г\* $10^5$ ), по сравнению с контрольной группой 0(0;1226) (кл/г\* $10^5$ ), ( $p = 0,003$ ). При исследовании микробиоты кишечника обследуемых детей с использованием 16S рНК секвенирования в структуре микробиоты кишечника у детей с ожирением и

избыточной массой тела на уровне филов преобладали: *Firmicutes* и *Actinobacteriota*, *Euryarchaeota*, при этом был снижен фил *Bacteroidota* в соответствии с рисунком 2.



Рисунок 2 – Структура основных филов (типов) микробиоты кишечника, исследуемых методом 16sРНК секвенирования у обследуемых групп

На уровне классов в микробиоте кишечника значимо в основной группе были в большей степени представлены *Bacilli* и *Actinobacteria*, *Methanobacteria* по сравнению с контрольной группой. Класс *Bacteroidates* преобладал у детей с нормальной массой по сравнению с детьми с ожирением и избыточной массой тела в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Различия в составе кишечной микробиоты на уровне классов

Класс	Основная группа, (%)	Контрольная группа, (%)	p*
<i>Bacilli</i>	4,2 [1,5 : 9,3]	1,56 [0,89 : 2,13]**	< 0,003
<i>Bacteroidates</i>	17,2 [11,5 : 21,8]	32,1 [19,6 : 35,7]**	< 0,001
<i>Actinobacteria</i>	19,13 [4,7 : 23,13]	5,5 [4,34 : 6,81]**	< 0,008
<i>Methanobacteria</i>	0,01 [0 : 0,3]	0 [0 : 0]**	< 0,003

Примечание – \* Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

\*\* Описание количественных показателей проведено с указанием медианы (25; 75 процентиля).

Сравнение по количественным признакам в двух независимых выборках, данные которых не согласуются с нормальным законом распределения, проведено с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

На уровне порядка в микробиоте кишечника у детей с ожирением и избыточной массой тела преобладали *Bifidobacteriales* 19,13% [4,7:23,1], ( $p < 0,007$ ), *Coriobacteriales* 2% [0,8:7,6], ( $p < 0,001$ ), *Methanobacteriales* 0,01% [0:0,3], ( $p < 0,001$ ) по сравнению с детьми с нормальной массой тела. Такие порядки бактерий как *Oscillospirales* 17,3% [15,1:28,8], ( $p < 0,001$ ), *Staphylococcales*, *Bacteroidales* 17,2% [11,5:21,8], ( $p < 0,001$ ), *Burkholderiales* 0,1% [0:0,2] ( $p < 0,015$ ). На уровне семейств у детей основной группы были повышены *Bifidobacteriaceae* 19,13% [4,7: 23,1], ( $p = 0,007$ ), *Peptostreptococcales-Tissierellales* 0,4% [0:0,6], ( $p = 0,019$ ), *Peptostreptococcaceae* 0,1% [0:0,3], ( $p = 0,013$ ), *Coriobacteriaceae* 1,4% [0,6:6,2], ( $p < 0,001$ ), *Muribaculaceae* 0,1% [0 : 0,3], ( $p < 0,011$ ) и *Methanobacteriaceae* 0,01% [0:0,3], ( $p = 0,003$ ) по сравнению с контрольной группой. В меньшем количестве представлены такие представители как *Ruminococcaceae* 10% [7,8:12], ( $p < 0,001$ ), *Oscillospiraceae* 3,5% [1,5:5,2], *Selenomonadaceae*, *Bacteroidaceae* 9,6% [8:12], ( $p = 0,006$ ), *Rikenellaceae* 0,9% [0,7:2,6], ( $p < 0,001$ ), *Tannerellaceae* 0,2% [0,1:1,3], ( $p < 0,001$ ), *Barnesiellaceae*, *Sutterellaceae* 0,1% [0 :

0,2], ( $p=0,015$ ), чем в контрольной группе. На уровне родов у детей с избыточной массой тела и ожирением повышены бактерий: *Bifidobacterium*, *Ruminococcaceae*, *Agathobacter*, *Dorea*, *Blautia*, *Lachnospirillum*, *Roseburia*, *Collinsella*, *Muribaculaceae*, по сравнению с детьми с нормальной массой тела. Отмечалось значимое снижение у основной группы следующих родов бактерий: *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Eisenbergiella*, *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Barnesiella* в соответствии с рисунком 3.

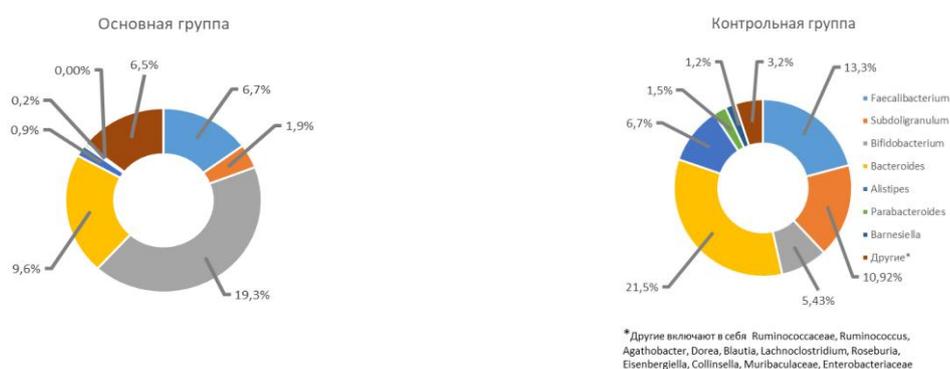


Рисунок 3 – Структура основных родов микробиоты кишечника, исследуемых методом 16sРНК секвенирования у обследуемых групп

На уровне видов в составе микробиоты кишечника у детей основной группы преобладали: *Bifidobacterium*, *Agathobacter*, *Dorea*, *Blautia*, *Lachnospirillum*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Collinsella*, были снижены: *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Bacteroides\_vulgatus*, *Bacteroides*, *Bacteroides\_massiliensis*, *Bacteroides\_eggerthii*, *Alistipes*, *Parabacteroides\_merdae*, в отличие от контрольной группы в соответствии с рисунком 4.

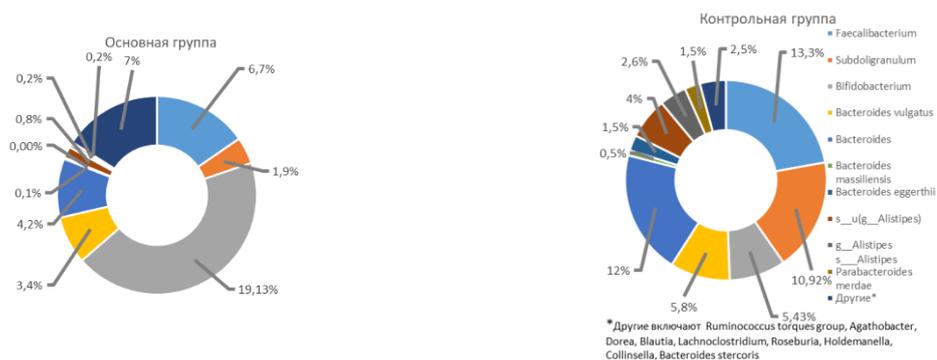


Рисунок 4 – Структура основных видов микробиоты кишечника, исследуемых методом 16sРНК секвенирования у обследуемых групп

Таким образом, состав микробиоты кишечника у обследуемых групп пациентов отличался. При использовании метода ГХ-МС производился анализ двух биотопов, характеризующих полостную микробиоту («Просветная микробиота толстой кишки») – материал фекалии и пристеночная микробиота («Тонкая кишка»), в венозной крови. Получены данные о повышении бактериальной нагрузки в биотопе «Тонкая кишка» и ее снижение в

биотопе «Просветная микробиота толстой кишки» у детей с избыточной массой тела и ожирением. Кроме того, структура основных филов у детей с ожирением отражалась в достоверном повышении *Fermicutes* и *Actinobacteria*, снижении *Proteobacteria*. На уровне отдельных родов и видов бактерий, вирусов и грибов у детей из основной группы отмечалось повышение *Candida*, *Micromycetes* и вируса простого герпеса, снижение *Lactobacillis spp*, *Eubactrium*, *Alcaligenes*. Данные, полученные при исследовании биотопа «Просветная микробиота» можно сопоставить с показателями при исследовании микробиоты методом 16sРНК-секвенирования, который, несомненно, является «золотым стандартом», так как позволяет с таксономической точностью определять бактерии в исследуемом микробиоме. Структура основных филов при анализе различными методами исследования микробиоты имеет схожие черты- снижение фила *Bacteroidota* у детей с избыточной массой тела и ожирением и не достоверное увеличение фила *Fermicutes*. Однако, увеличение фила *Actinobacteriota* отмечалось у детей основной группы при исследовании с помощью метода 16sРНК-секвенирования, а при использовании масс-спектрометрии достоверное снижение по сравнению с контрольной группой.

#### Оценка метаболической активности микробиоты

У детей основной группы было выявлено статистическое значимое снижение уровня основных короткоцепочечных жирных кислот в кале: более чем в два раза абсолютного содержания уксусной кислоты, более чем в три раза уровня пропионовой кислоты, более чем в пять раз уровня масляной кислоты по сравнению с контролем. Были снижены суммарные показатели - уровень ИзоСп, более чем в три раза снижено суммарное содержание КЦЖК, характеризующих метаболическую активность микробиоты, снижены расчетные показатели - анаэробный индекс в 1,3 раза, тогда как соотношение ИзоСп/Сп и ИзоС5/С5 были незначительно выше по сравнению с группой контроля в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Содержание основных КЦЖК и показателей, характеризующих метаболическую активность микробиоты у обследуемых групп

Показатели	Основная группа	Контрольная группа	p*
С2 (уксусная) (абсолютное) мг/г	1,3 [1,1 : 2,29]	3,75 [2,3 : 4,87]	< 0,001
С2 (уксусная) (относительное) ед.	0,697 [0,6 : 0,759]	0,534 [0,498 : 0,65]	< 0,002
С3(пропионовая) (абсолютное) мг/г	0,345 [0,163 : 0,52]	1,34 [1,2 : 1,65]	< 0,0001
С4 (масляная) (абсолютное) мг/г	0,31 [0,186 : 0,624]	1,67 [1,56 : 1,78]	< 0,0001
С4 (масляная) (относительное) ед.	0,167 [0,127 : 0,25]	0,23 [0,165 : 0,31]	< 0,040
Суммарное содержание ИзоСп (абсолютное) мг/г	0,23 [0,19 : 0,35]	0,57 [0,52 : 0,62]	< 0,0001
Суммарное содержание ИзоСп (относительное) ед.	0,098 [0,076 : 0,117]	0,057 [0,052 : 0,061]	< 0,0001
ИзоСп/Сп мг/г	0,56 [0,491 : 0,763]	0,37 [0,237 : 0,41]	< 0,0001
ИзоС5/С5	2,156 [1,765 : 2,759]	1,78 [1,56 : 1,9]	< 0,01

Суммарное содержание C2+C3+C4+C5+C6+изоC4+изоC5+изоC6 мг/г	2,171 [1,501 : 3,78]	7,1 [5,68 : 8,9]	< 0,0001
Анаэробный индекс (C2–C4) ед.	0,434 [0,362 : 0,667]	0,582 [0,561 : 0,682]	< 0,023

Примечание – Описание количественных показателей проведено с указанием медианы (25;50; 75 процентиля). Сравнение по количественным признакам в двух независимых выборках, данные которых не согласуются с нормальным законом распределения, проведено с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

\* Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Структура основных КЦЖК, определяющих метаболическую активность микробиоты кишечника представлена на рисунке 5.

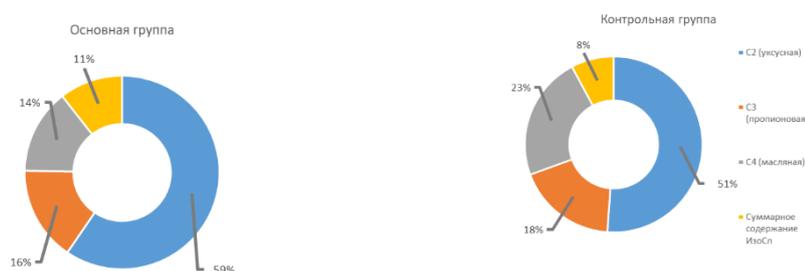


Рисунок 5 – Структура основных КЦЖК, определяющих метаболическую активность микробиоты кишечника, у обследуемых групп по данным биохимического исследования кала

В структуре обследованных групп преобладала уксусная кислота, у детей с избыточной массой тела и ожирением 59%, в контрольной группе - 51%. При оценке КЦЖК статистически значимо не отличалось между группами содержание пропионовой кислоты в основной группе-16%, а в контрольной -18% и суммарное содержание ИзоСп-11% и 8% соответственно. Уровень масляной кислоты было значительно ниже у детей с избыточной массой тела и ожирением по сравнению с детьми с нормальной массой тела-14% и 23% соответственно.

#### **Взаимосвязь состава и метаболической активности микробиоты кишечника и уровня, исследуемых гормонов**

Был проведен анализ корреляционных связей между показателями уровня инкретинов, гормонов жировой ткани (лептин, резистин, ирисин) и теми представителями типов, семейств, родов и видов микробиоты кишечника, по количеству которых была выявлена наиболее статистически значимая разница при сравнении показателей в обследованных группах. Отмечалась слабая положительная статистически незначимая корреляция между уровнем GLP-1 и *g\_Faecalibacterium* ( $rs=0,23$ ,  $p=0,33$ ). Средняя отрицательная взаимосвязь отмечалась между уровнем GLP-2 и *p\_Bacteroidota* ( $rs=-0,38$ ,  $p=0,086$ ) и *s\_Bacteroides* ( $rs=-0,46$ ,  $p=0,07$ ), средняя положительная с *s\_Bacteroides\_eggerthii* ( $rs=0,39$ ,  $p=0,096$ ). С уровнем лептина отмечалась средняя отрицательная статистически незначимая взаимосвязь отмечалась с *g\_Eisenbergiella* ( $rs=-0,46$ ,  $p=0,076$ ) и *g\_Bacteroides* ( $rs=-0,47$ ,  $p=0,075$ ), статистически

значимая положительная взаимосвязь отмечалась с *s\_Bacteroides* ( $r_s=0,52$ ,  $p<0,001$ ). С уровнем резистина отмечалась средняя положительная статистически незначимая взаимосвязь отмечалась с *f\_Coriobacteriaceae* ( $r_s=0,31$ ,  $p=0,07$ ) и *s\_Bacteroides* ( $r_s=0,4$ ,  $p=0,08$ ) и средняя отрицательная – с *p\_Actinobacteriota* ( $r_s=-0,43$ ,  $p=0,087$ ).

### **Взаимосвязь состава микробиоты кишечника, исследованного методом 16SPHK секвенирования и метаболической активности микробиоты кишечника у обследуемых групп**

У детей с ожирением и избыточной массой получена отрицательная взаимосвязь с содержанием ацетата на уровне семейства с *Oscillospiraceae* ( $r=-0,404$ ), на уровне рода с *Bacteroides* ( $r=-0,065$ ) и положительная на уровне вида *Bacteroides\_eggerthii* ( $r=0,454$ ), кроме того положительная корреляция была с пропионовой ( $r=0,955$ ) и масляной кислотами, суммарным количеством C2+C3+C4+C5+C6+изоC4+изоC5+изоC6 (далее суммарное количество КЦЖК) ( $r=0,971$ ) и суммарным содержанием ИзоCn ( $r=0,874$ ) и отрицательная с такими показателями как ИзоCn/Cn ( $r=-0,428$ ) и ИзоC5/C5 ( $r=-0,413$ ). При оценке взаимосвязи содержания пропионовой кислоты была получена положительная ассоциация в основной группе с родом *Bacteroides* и видом *Bacteroides\_eggerthii* ( $r=0,400$ ), с масляной кислотой, ( $r=0,907$ ), суммарным количеством КЦЖК ( $r=0,941$ ), и содержанием ИзоCn ( $r=0,825$ ), а также отрицательная с такими показателями как, ИзоCn/Cn ( $r=-0,428$ ) и ИзоC5/C5, ( $r=-0,489$ ). При анализе была получена взаимосвязь в основной группе масляной кислоты только с показателями КЦЖК: положительная с абсолютным содержанием уксусной кислоты ( $r=0,880$ ), суммарным содержанием КЦЖК, ( $r=0,917$ ), содержанием ИзоCn ( $r=0,760$ ), анаэробным индексом, ( $r=0,529$ ), отрицательная связь с отношением ИзоCn/Cn ( $r=-0,636$ ), ИзоC5/C5 ( $r=-0,574$ ) и относительным содержанием уксусной кислоты. Показатель, характеризующий суммарное содержание ИзоCn отрицательно коррелировал с семейством *Oscillospiraceae* и положительная на уровне рода *Bacteroides* и вида *Bacteroides\_eggerthii*. При оценке взаимосвязи показателя, характеризующего отношение КЦЖК с разветвленной цепью к КЦЖК с неразветвленной цепью (ИзоCn/Cn) получена отрицательная взаимосвязь в основной группе с уксусной, пропионовой и масляной, суммарным показателем КЦЖК, характеризующим метаболическую активность и положительную с ИзоCn и ИзоC5/C5. При оценке ассоциации показателя, характеризующего отношение ИзоC5/C5 получена отрицательная взаимосвязь с родом *Eisenbergiella*, уксусная, пропионовая, масляная и суммарное количество КЦЖК, анаэробный индекс в основной группе. Положительная корреляция отмечалась с параметрами, характеризующим суммарное содержание ИзоCn. При оценке взаимосвязи показателя – анаэробный индекс отмечалась отрицательная взаимосвязь с относительным содержанием уксусной кислоты, положительная связь с относительным

содержанием пропионовой и абсолютным и относительным содержанием масляной кислоты, отрицательная взаимосвязь с показателем ИЗОС5/С5 у детей с ожирением. При оценке взаимосвязи показателя, характеризующего, метаболическую активность микробиоты кишечника в основной группе отмечалась положительная взаимосвязь с уксусной, пропионовой, масляной кислотами, суммарным содержанием ИЗОСп и отрицательное с показателями ИЗОСп/Сп и ИЗОС5/С5.

### **Создание прогностической модели оценки предикторов развития метаболических изменений, связанных с микробиотой кишечника**

В результате ROC-анализа основных представителей микробиоты кишечника биотопа «Просветная микробиота толстой кишки» в качестве наиболее качественных показателей, т.е значение  $AUC > 0,5$ , выделены следующие бактерии *Firmicutes* ( $AUC=0,687$ ), чувствительность 90%, специфичность 66%, *Actinobacteria* ( $AUC=0,9$ ), чувствительность 90%, специфичность 66%. *Bacteroidia*, *Flavobacteria* ( $AUC=0,807$ ), чувствительность 90%, специфичность 53%, микроскопические грибы ( $AUC=0,902$ ), чувствительность 90%, специфичность 33%. ROC-анализ основных показателей микробиоты кишечника, изучаемых с применением метода 16S-РНК секвенирования, который дал схожие результаты т.е значение  $AUC^* > 0,5$ , выделены основные филы бактерий: *Bacteroidota* ( $AUC= 0,85$ ), чувствительность 94%, специфичность 88%, *Firmicutes* ( $AUC = 0,542$ ), чувствительность 92%, специфичность 94%, *Actinobacteriota* ( $AUC= 0,781$ ), чувствительность 96%, специфичность 94%, *Euryarchaeota* ( $AUC = 0,696$ ), чувствительность 48%, специфичность 2%. В качестве наиболее качественных показателей с высокой специфичность и чувствительностью показали себя филы *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*. Кроме того, был проведен ROC-анализ показателей уровня GLP-1 и GLP-2 у обследуемых групп, который показал следующие результаты. Для уровня GLP-1 площадь под кривой составила 0,901 для GLP-2 составила 0,965. Специфичность (Sensitivity) была для GLP-1 -80%, чувствительность (Specificity)-85%. Для GLP-2 специфичность (Sensitivity) -85%, чувствительность (Specificity)-95%. Учитывая достаточно высокую чувствительность и специфичность таких показателей, как состав микробиоты методом 16sРНК-секвенирования, уровня GLP-1 и GLP-2 они были предложены в качестве предикторов для построения прогностической модели влияния состава микробиоты кишечника на уровень инкретинов, в которой была определена функция каждого из показателей. Для сравнения было предложено две модели: «Прогностическая модель 1», где в качестве показателей состава микробиоты были предложены основные представители микроорганизмов, показавших высокую достоверность в предыдущих статистических анализах – всего 15 параметров (филы *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, семейства *Ruminococcaceae*, *Oscillospiraceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, роды

*Faecalibacterium*, *Eisenbergiella*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, виды *Bacteroides*, *Bacteroides\_eggerthii* и содержание GLP-1 и GLP-2, а также «Прогностическая модель 2», где в качестве показателей, характеризующих состав микробиоты были взяты некоторые КЦЖК в кале (всего 10 показателей): абсолютное содержание уксусной, пропионовой, масляной кислот, суммарное содержание кислот с разветвленной цепью, показатели ИЗОС<sub>n</sub>/С<sub>n</sub>, ИЗОС<sub>5</sub>/С<sub>5</sub>, суммарное количество КЦЖК, анаэробный индекс и уровень GLP-1 и GLP-2. «Прогностическая модель 1» и «Прогностическая модель 2» показала одинаковую точность полученных результатов (95%), в плане оценки предикторов развития метаболических изменений, но учитывая то, что биохимическое исследование кала-оценка уровня КЦЖК более доступное исследование в рутинной клинической практике ввиду более низкой стоимости и поэтому может быть рекомендована для ранней диагностики метаболических изменений в группах детей с высоким риском по развитию ожирения, особенно, если в анамнезе есть данные, указывающие на факторы, способствующие нарушению микробиоты кишечника.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволили сформулировать гипотезу о вкладе состава и метаболической активности КМБ в развитии ожирения и избыточной массы тела у детей и подростков. Микробиоценоз кишечника детей с ожирением и избыточной массой тела характеризуется увеличением бактерий, обладающих сниженным - *Actinobacteriota* и снижением бактерий *Bacteroidota*, которые обладают повышенным метаболическим потенциалом, связанным с выработкой основных КЦЖК, снижением микробного разнообразия. Состав микробиоты зависит от исследуемого биотопа и от метода диагностики. В биотопе «Тонкая кишка» у детей с ожирением отмечалось повышение бактериальной нагрузки, что свидетельствует о транслокации липополисахаридов, входящих в состав клеточной стенки бактерий в кровь с последующей стимуляцией иммунной системы и развитием «хронического медленного воспаления». Отмечалось снижение метаболической активности КМБ, которая связана прежде всего со снижением метаболической активности фила *Bacteroidota*, рода *Bacteroides*, вида *Bacteroides\_eggerthii*. Таким образом, состав КМБ влияет на ее метаболическую активность, увеличивая выработку КЦЖК, которые являются лигандами рецепторов GPR41 и GPR43, расположенных в т.ч на поверхности L-клеток кишечника и влияющих на выработку инкретинов (GLP-1 и GLP-2). Участие КМБ в выработке инкретинов, посредством синтеза КЦЖК доказано во многих современных исследованиях. Поэтому снижение количества отдельных КЦЖК, так и суммарного количества активных форм у детей с ожирением приведет к метаболическим нарушениям жирового и углеводного обменов, что требует дальнейшего изучения проведению коррекции.

## ВЫВОДЫ

1. Выявление пре-, интра- и постнатальных факторов, влияющих на формирование и становление микробиоты кишечника ребенка, позволяет выделить критически значимые возрастные периоды, в которые регистрировалась наибольшая прибавка в массе тела (3-7 месяцев и 9-12 мес.), что может быть использовано для ранней диагностики метаболических нарушений.
2. Таксономический состав микробиоты кишечника у детей с ожирением и избыточной массой тела характеризуется преобладанием устойчивого фила (типа) *Actinobacteriota* и снижением фила *Bacteroidota*, входящих в состав филогенетического ядра.
3. Метаболическая активность микробиоты кишечника у детей с ожирением и избыточной массой тела характеризуется снижением продукции всех короткоцепочечных жирных кислот, преимущественно бутирата, что сопровождается снижением некоторых видов бутиратпродуцирующих бактерий, таких как *Faecalibacterium*. Наибольшее влияние на метаболическую активность оказывают бактерии рода *Bacteroides*, вида *Bacteroides\_eggerthii*.
4. Снижение продукции короткоцепочечных жирных кислот у детей с ожирением и избыточной массой тела приводит к уменьшению уровня инкретинов, особенно GLP-1 и GLP-2 в крови, способствуя развитию нарушений углеводного обмена.
5. Прогностическая модель, основанная на показателях короткоцепочечных жирных кислот в кале и уровня GLP-1 и GLP-2 позволяет выявить группу детей и подростков по развитию нарушений микробиоты кишечника для проведения диетических мероприятий и своевременной коррекции.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исследование КЦЖК в кале и уровня инкретинов GLP-1 и GLP-2 в крови целесообразно включать в план исследования детей раннего возраста при наличии в анамнезе факторов, способствующих изменению нормального биоценоза кишечника (родоразрешение путем кесарева сечения, отсутствие грудного вскармливания, прием антибактериальных препаратов в анамнезе и т.д.). Включение в обследование ребенка определение КЦЖК в качестве скрининга позволяет определить риск развития ожирения и метаболического синдрома и нарушений углеводного обмена в дальнейшем.

## СПИСОК, ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Саган, Е.В.** Микробиота и метаболическое программирование у детей / Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Денисов Н.С., Кудлай Д.А., Канская Н.В. // **Педиатрия им. Г.Н. Сперанского.** – 2020. – 99 (1). – С. 209. ИФ РИНЦ = 0,707.
2. **Саган, Е.В.** Состав и метаболическая активность микробиоты пищеварительной системы у детей и подростков с ожирением / Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Ворожцова И.Н.,

- Филиппова Т.А., Денисов Н.С., Дьяков Д.А // **Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.** – 2020. – 35(3). – С. 38. ИФ РИНЦ = 0,545.
3. **Саган, Е.В.** Особенности нарушений углеводного обмена на фоне ожирения у детей/ Олейник О.А., Филиппова Т.А., Кудлай Д.А., Сиволобова Т.В., Дираева Н.М.// **Журнал «Врач».** – 2020. – № 9. – С. 78. ИФ РИНЦ = 0,433.
  4. **Саган, Е.В.** Особенности состава микробиоты биотопа тонкого кишечника и секреции инкретинов при ожирении у детей / Олейник О.А., Самойлова Ю.Г. // **Материалы III Всероссийской научно-практической конференции: Осенние Филатовские чтения «Важные вопросы детского здоровья», Российский педиатрический журнал.** – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 269.
  5. **Саган, Е.В.** Клинико-лабораторные и биохимические аспекты диагностики кардиоваскулярных осложнений у детей и подростков с ожирением/ Самойлова Ю.Г., Олейник О.А. // **Конференция: Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии, январь 2021 г.**
  6. **Саган, Е.В.** Клинико-лабораторные и биохимические аспекты диагностики кардиоваскулярных осложнений у детей и подростков с ожирением/ Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Саган Е.В.// **Материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии», г.Уфа, 21-23 сентября 2021 г.** – 2021. – С. 196.
  7. **Саган, Е.В.** Диагностическая значимость показателей гормональной активности жировой ткани у подростков с различной степенью ожирения/ Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Саган Е.В.//**Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии», г.Москва, 22-25 сентября 2021г.** <http://gae-org.ru>.
  8. **Саган, Е.В.** Биоимпедансный анализ как перспективная скрининговая технология у детей/ Самойлова Ю.Г., Подчиненова Д.В., Кудлай Д.А. и др. // **Журнал «Врач».** – 2021. –Т. 32, № 7. – С. 32-38. ИФ РИНЦ = 0,433.
  9. **Саган, Е.В.** Патогенетическая взаимосвязь микробиоты ротовой полости и ожирения у детей и подростков / Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Кудлай Д.А., Денисов Н.С.// **Российский вестник перинатологии и педиатрии.** – 2021. – Т. 66, № 5. – С. 38-41.
  10. **Саган, Е.В.** Концентрация уровня лептина, резистина и иризина при ожирении у подростков / Олейник О.А., Самойлова Ю.Г. // **Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Достижения науки в практику детского эндокринолога», г.Москва, декабрь 2021 г.** – 2021. – С. 43.

11. **Саган, Е.В.** Диагностическая значимость показателей гормональной активности жировой ткани у подростков с различной степенью ожирения / Олейник О.А., Самойлова Ю.Г. // Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Достижения науки в практику детского эндокринолога», г.Москва, декабрь 2021 г. – 2021. – С. 42.
12. **Саган, Е.В.** Характеристика состава тела и эхоскопические особенности печени при ожирении у подростков / Олейник О.А., Самойлова Ю.Г., Матвеева М.В., Подчиненова Д.В., Коваренко М.А., Захарчук П.И., Япрынцева М.Д.//Российский педиатрический журнал – 2022. – Т. 3, № 1. – С. 222.
13. **Саган, Е.В.** Метаболическая активность микробиоты толстого кишечника у детей с ожирением/Олейник О.А., Самойлова Ю.Г., Матвеева М.В. // Сборник тезисов IX (XXVIII) Национального диабетологического конгресса с международным участием «Сахарный диабет и ожирение-неинфекционная междисциплинарная пандемия XXI века»,5-8 сентября 2022, Москва. – 2022. – С. 154.
14. **Саган, Е.В.** Функциональная активность микробиоты кишечника, жировой ткани и инкретинов при ожирении в детском возрасте/ Самойлова Ю.Г., Олейник О.А и др.// Журнал «Врач». – 2022. –Т. 33, №8. – С. 41-46. ИФ РИНЦ = 0,433.
15. **Саган, Е.В.** Таксономическая характеристика микробиоты толстого кишечника и ее влияние на эндокринную регуляцию у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением// Самойлова, Ю. Г. Олейник, О. А. и др. // **Педиатрия им. Сперанского Г.Н.** – 2022. – №5. – С. 23-32. ИФ РИНЦ =0,707.
16. **Саган, Е.В.** Программа диагностики состава пристеночной кишечной микрофлоры и гормонального статуса детей и подростков с ожирением// Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Денисов Н.С., Толмачев И.В. // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021615402 от 07.04.2021 г.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

AUC- площадь под кривой (area under curver)

GPR41 и GPR41- рецепторы свободных жирных кислот, связанных с G-белком

ROC-анализ-анализ классификаций с применением ROC-кривых (receiver operating characteristic)

ДИ-доверительный интервал

КЦЖК-короткоцепочечные жирные кислоты

ОШ, OR (odds ratio) -отношение шансов

ЭВМ-электронно-вычислительная машина