BY-NC-SA

https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-96-105

Становление микробиоценоза кишечника у детей, рожденных от матерей с гестационным сахарным диабетом

Маяцкая Т. А.[1], Харитонова Л. А.[1], Папышева О. В.[2], Затевалов А. М.[3]

[1] Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н. И. Пирогова Российская Федерация, Москва 117997, ул. Островитянова д. 1, Россия

[2] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С. С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы», 115446, г. Москва, Коломенский проезд, д. 4, Россия

[3] ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, ул. Адмирала Макарова, д. 10, Москва, 125212, Россия

Для цитирования: Маяцкая Т. А., Харитонова Л. А., Папышева О. В., Затевалов А. М. Становление микробиоценоза кишечника у детей, рожденных от матерей с гестационным сахарным диабетом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;185(1): 96–105. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-96-105

✉ *Для переписки:*
Харитонова Любовь Алексеевна
luba2k@mail.ru

Харитонова Любовь Алексеевна, д.м.н., проф., зав. кафедрой педиатрии с инфекционными болезнями у детей
Маяцкая Татьяна Александровна, аспирант кафедры педиатрии с инфекционными болезнями у детей
Папышева Ольга Виуленовна, к.м.н., гл.врач
Затевалов Александр Михайлович, гл.н.с. лаборатории Диагностики и профилактики инфекционных заболеваний

Резюме

Актуальность. В настоящее время мировым медицинским сообществом изучается влияние микробиоценоза на макроорганизм. Так известно, что метаболом микробиома кишечника человека может являться одним из факторов развития патологических процессов в тканях и органах.

Цель исследования. Совершенствовать раннюю диагностику нарушений микроэкологии кишечника у грудных детей, путем определения видового состава и функциональной активности микрофлоры кишечника для прогнозирования состояния здоровья детей, родившихся от матерей с сахарным диабетом.

Материал и методы. Проведено исследование состояния микробиоценоза кишечника у 60 грудных детей в возрасте 1–28 дней, из них 22 ребенка от здоровых матерей (контрольная группа) и 38 от матерей, больных сахарным диабетом (СД) (исследовательская группа). Исследовали: видовой состав микробиоценоза кишечника; его функциональное состояние по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот (КЖК); содержание эластазы и простых углеводов в кале. Видовой состав изучали методом ngs-секвенирования кала, концентрацию КЖК методом газо-жидкостной хроматографии подкисленного супернатанта кала, для количественного определения панкреатической эластазы в образцах кала применялся иммуноферментный анализ ELISA, для определения содержания углеводов в кале — метод Бенедикта. Мерой дизбиоза кишечника считали биоразнообразие микробного сообщества, которое в биологии количественно определяется индексом Шеннона и рассчитывается по формуле: $H=-\sum_{i=1}^{n} p_i log_2 p_i$

где $p_i=\frac{x_i}{\sum_{i=1}^{n} x_i}$

и соответствует числу видов микроорганизмов в микробном сообществе кишечника. Нормированный индекс Шеннона имеет разброс значений от 0 до 1, что удобно для интерпретации состояния микробиоценоза. Увеличение биоразнообразия микробного сообщества связано с увеличением дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программных пакетов Statistica 8.0. и MS OfficeExcel 2010.

Результаты исследования. У детей, рожденных от матерей с сахарным диабетом, формирование микробного сообщества на этапе заселения кишечного тракта происходит за счет увеличения видового биоразнообразия и формирования сильных корреляционных связей между различными классами микроорганизмов, что указывает на снижение симбионтных отношений микробиоценоза с макроорганизмом, опосредованных в норме состоянием клеток кишечного эпителия, кооперацией клеток и компонентов кишечного мукозного барьера. За счет выраженного биоразнообразия и межвидового симбиоза бактерий в толстой кишке формируются компенсаторные механизмы для сосуществования макроорганизма и микробиоты. Таким образом происходит не только выработка масляной кислоты в достаточном количестве, но и потребление КЦЖК микробиотой с последующим выделением изокислот в увеличенном количестве, что приводит к росту гнилостной микробной флоры.

Ключевые слова: микробиоценоз, кишечник, метагеномика, панкреатическая эластаза, гестационный сахарный диабет, дети

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-96-105

BY-NC-SA

Formation of intestinal microbiocenosis in children born to mothers with gestational diabetes mellitus

T. A. Mayatskaya[1], L. A. Kharitonova[1], O. V. Papysheva[2], A. M. Zatevalov[3]

[1] Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia

[2] State budgetary institution of health care of the city of Moscow "City Clinical Hospital named after S. S. Yudin of the Moscow City Health Department, Kolomensky proezd, 4115446, Moscow, Russia

[3] Gabrichevsky Moscow research Institute of epidemiology and Microbiology of the Russian consumer protection agency Rospotrebnadzor, st. Admiral Makarov, 10, Moscow, 125212, Russia

For citation: Mayatskaya T. A., Kharitonova L. A., Papysheva O. V., Zatevalov A. M. Formation of intestinal microbiocenosis in children born to mothers with gestational diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2021;185(1): 96–105. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-96-105

Lyubov A. Kharitonova, MD, Professor, Head of the Department of Pediatrics with infectious diseases in children of Faculty of additional professional education; *ORCID: 0000–0003–2298–7427, Scopus Author ID: 7004072783*

Tatiana A. Mayatskaya, Postgraduate student of the Department of Pediatrics with infectious diseases in children of FAPE, *ORCID: 0000–0001–8760–3231*; *Scopus ID: 57212526804*

Olga V. Papysheva, Candidate of medical sciences, Head physician; *ORCID: 0000–0002–1143–669X*

Alexander M. Zatevalov, Chief Researcher of Laboratory of diagnostics and prophylaxis of infectious diseases; *ORCID: 0000–0002–1460–4362*; *Scopus ID: 57192157894*

✉ *Corresponding author:*
Lyubov A. Kharitonova
luba2k@mail.ru

Summary

Rationale. The global medical community currently studies the influence of microbiocenosis on macroorganism. The metabolome of the human gut microbiome may be a factor in the development of pathology in tissues and organs.

Objective. To improve the early diagnosis of intestinal microecology disorders in infants by determining the species composition and functional activity of the intestinal microflora to predict the health status of children born to mothers with diabetes.

Materials and methods. We studied the intestinal microbiocenosis in 60 infants aged 1–28 days, including 22 infants by healthy mothers (control group) and 38 infants by mothers with diabetes (study group). The following was evaluated: the species composition of the intestinal microbiocenosis; its functional state by concentrations of short-chain fatty acids (SCFA); the content of elastase and simple carbohydrates in feces. The species composition was studied by fecal next generation sequencing (NGS), SCFA concentration was studied by gas-liquid chromatography of acidified fecal supernatant, pancreatic elastase in fecal samples was quantified by ELISA, and fecal carbohydrate content was determined by Benedict's test. The gut dysbiosis was measured by the biodiversity of the microbial community quantified in biology by Shannon index according to the formula: $H=-\sum_{i=1}^{n} p_i \log_2 p_i$

where $p_i=\frac{X_i}{\sum_{i=1}^{n} X_i}$

and corresponds to the number of microbial species in the intestinal microbial community. Normalized Shannon index has a range of values from 0 to 1, convenient for the interpretation of the microbiocenosis condition. An increase in the biodiversity of the microbial community was associated with an increase in dysbiotic changes of the gut microbiocenosis. Statistical analysis was performed with Statistica 8.0 and MS Office Excel 2010.

Results. In children born by mothers with diabetes, the formation of microbial community at the stage of intestinal tract settlement occurs because of the increase of species biodiversity and formation of strong correlation between different classes of microorganisms, indicating a decrease of symbiont relationships of microbiocenosis with macroorganism normally mediated by intestinal epithelial cells condition and cooperation of the cells with intestinal mucosal barrier components. Due to the pronounced biodiversity and interspecies symbiosis of bacteria, compensatory mechanisms are formed in the colon for coexistence of macroorganism and microbiota. Thus, not only the butyric acid is produced in sufficient quantities but also the microbiota consumes SCFA releasing an increased amounts of iso-acids and promoting the growth of putrefactive microbial flora.

Keywords: microbiocenosis, gut, metagenomics, pancreatic elastase, gestational diabetes mellitus, children

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Микробиота человека представляет собой совокупность множества микробиоцинозов, включает в себя десятки и сотни разнообразных видов и превышает число клеток всех органов и тканей человеческого организма. Является открытым органом человека, оказывая влияние на жизненно-важные процессы в организме и выполняя пищеварительную, энергетическую, морфокинетическую (энергообеспечение эпителия, тепловое обеспечение организма, регуляция перистальтики кишечника, дифференцировки и регенераций эпителиальных тканей слизистой оболочки), биосинтетическую, иммуномодулирующую функции, а также обеспечивает колонизационную резистентность слизистой оболочки кишечника и противоинфекционную защиту. Микрофлора кишечника участвует в ферментации нерасщеплённых ранее компонентов пищи, главным образом углеводов, олиго и полисахаридов, жиров и белков. Метаболиты микрофлоры, образующиеся в результате этого процесса, оказывают существенное влияние на состояние здоровья человека. Различия микробного состава кишечника и метаболические особенности отдельных представителей микробиома влияют на предрасположенность к метаболическим нарушениям. Одним из самых важных метаболитов является масляная кислота, которая необходима для нормального существования и функционирования клеток слизистой оболочки кишечника, является важным энергетическим субстратом и регулятором пролиферации и дифференцировки энтероцитов, а также влияет на процессы всасывания воды, натрия, хлора, кальция и магния. Обладает антиканцерогенным, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием. [1, 2, 3]. Обычно вместе с концентрацией масляной кислоты определяют также и другие короткоцепочечные кислоты – уксусную, пропионовую, валериановую, капроновую и их изомеры, по которым устанавливают особенности функциональной активности микробиоценоза кишечника. Соотношение уксусной, пропионовой, масляной кислот является важным индикатором целостности микробного сообщества кишечника. При симбиотических отношениях микроорганизмов индигенной микрофлоры в микробно-тканевом комплексе толстой кишки соотношение этих метаболитов сохраняет постоянство в рамках небольшого интервала концентраций. Отношение суммы концентраций пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров к концентрации уксусной кислоты называется структурным индексом [4]. Структурный индекс позволяет оценить соотношение метаболической активности анаэробной, индигенной микрофлоры кишечника к общей метаболической активности всех микроорганизмов микробно-тканевого комплекса толстой кишки и охарактеризовать структуру микробного сообщества. Ключевая роль масляной кислоты в поддержании целостности микробного сообщества и ее критическая концентрация в кале определены в работе [5], где исследована структура метаболической активности микробиоценоза кишечника пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, находящихся на парентеральном питании в зависимости от концентрации масляной кислоты в кале. Определена концентрация масляной кислоты в кале 2,2 ммоль/г, выше которой соотношение концентраций в кале уксусной, пропионовой и масляной кислот (С2: С3: С4) стабильно и составляет 72:17:11, а значение структурного индекса 0,56 ед. При снижении концентрации масляной кислоты в кале ниже 2,2 ммоль/г наблюдается линейная тенденция к увеличению доли уксусной кислоты в соотношении С2: С3: С4 и снижение структурного индекса. Отмечаемую тенденцию снижения продукции летучих жирных кислот анаэробной микрофлорой при снижении концентрации масляной кислоты в кале ниже 2,2 ммоль/г можно считать важным метаболическим предиктором разрушения метаболических связей между представителями индигенной микрофлоры и перестройкой микробного пищеварения по пути аэробного сбраживания [6].

Известно также, что выявляются существенные различия детских и взрослых типов микрофлоры. Ранее рождение ребенка означало переход его от «стерильных» условий внутриутробного развития к существованию в разнообразном мире микробов. Однако, в современных исследованиях начали рассматривать другую теорию – о «внутриутробной колонизации матки» [7], которая освещает тот факт, что внутриутробные условия пребывания плода нестерильны, т.к. при микробиологическом исследовании околоплодных вод, плаценты, пуповинной крови и мекония обнаруживались бактерии *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* и *Streptococcus*.

Выделяют 3 фазы становления нормальной микрофлоры у новорождённого. В первую фазу фекальная микрофлора представлен анаэробами: *Bifidobacterium bifidum, B. longum, B. adolescentis, B. catenulatum spp., Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii*. Во вторую – начинают преобладать факультативно-анаэробные бактерии: *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Micrococcus Gemella, Globicatella, Granulicatella, Rothia; Corynebacterium, Bacillus, E.coli, Enterobateriaceae*. В третью фазу индигенная флора обогащается за счет облигатных анаэробов: *Bacteroides, Parabacteroides, Veillonella, Clostridium, Fusobacterium, Ruminococcus, Eubacterium, Eggerthella, Actinomyces, Collinsella, Propionibacterium*. Постепенно, с поступлением бактерий с грудным молоком и с окружающих предметов продолжается физиологическая бактериальная транслокация кишечника у новорожденного, исходом которой является формирование бактериальной биопленки. Под бактериальной биопленкой подразумевают микробное сообщество, в котором прикрепленныек субстрату(-муцин – пептидогликан бокаловидных клеток эпителия кишечника) и друг к другу бактерии окружены матриксом, продуцируемым микроорганизмами в соответствии с уровнем развития популяции и условиями транскрипции генов [8]. Бактериальная биопленка способствует

выживанию микроорганизмов в определенном биотопе организма хозяина и зависит от QS-системы (*Quorum Sensing* – чувство кворума). В зависимости от активности данной регуляторной системы, происходит внутрипопуляционный информационный обмен бактериальных клеток между собой (регуляция экспрессии генов) с использованием низкомолекулярных сигнальных молекул – аутоиндукторов [9]. Еще внутриутробно у плода формируется иммунологическая память о микробиоценозе матери. Кишечная микрофлора влияет на становление иммунной системы, созревание CD4+, CD8+ лимфоцитов и дендритных клеток. При нарушении микробиоценоза у матери, ее условно-патогенные и патогенные аллохтонные микроорганизмы становятся индигенными для плода. А так как во время раннего периода жизни ребенка иммунная система слишком незрелая для ликвидации кишечных микроорганизмов это становится причиной нарушения становления гармоничного микробиоценоза. В связи с этим изучение состояния микробиоты кишечника у детей, родившихся от матерей с СД, в первые 28 дней после рождения представляет особый интерес. Так, формирование нормальной микрофлоры ребенка зависит от многих факторов, а именно от здоровья матери до и во время беременности, состояния её родовых путей, особенностей микробного загрязнения окружающей среды, активности неспецифических защитных механизмов (бактерицидность и резистентность кожных покровов, активность макрофагов, секреция лизоцима, пероксидазы), степень активности пассивного иммунитета и других. В связи с этим представляло интерес изучить особенности микробиома кишечника у детей, родившихся от матерей с гестационным сахарным диабетом (ГСД).

Цель исследования. Совершенствовать раннюю диагностику нарушений микроэкологии кишечника у грудных детей, путем определения видового состава и функциональной активности микрофлоры кишечника для прогнозирования состояния здоровья детей, родившихся от матерей с сахарным диабетом.

Материал и методы

Проведено исследование состояния микробиоценоза кишечника у 60 грудных детей в возрасте 1–28 дней, из них 22 ребенка от здоровых матерей (контрольная группа) и 38 от матерей, больных ГСД (исследовательская группа). Исследовали: видовой состав микробиоценоза кишечника; его функциональное состояние по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот (КЖК).

Видовой состав изучали методом ngs-секвенирования кала, концентрацию КЖК методом газо-жидкостной хроматографии подкисленного супернатанта кала. Мерой дизбиоза кишечника считали биоразнообразие микробного сообщества, которое в биологии количественно определяется индексом Шеннона и рассчитывается по формуле:

$$H = -\sum_{i=1}^{n} p_i log_2 p_i$$

где $p_i = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^{n} x_i}$

и соответствует числу видов микроорганизмов в микробном сообществе кишечника. Нормированный индекс Шеннона имеет разброс значений от 0 до 1, что удобно для интерпретации состояния микробиоценоза. Увеличение биоразнообразия микробного сообщества связано с увеличением дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программных пакетов Statistica 8.0. и MS OfficeExcel 2010.

Результаты исследования и обсуждение

Концентрации короткоцепочечных жирных кислот и их расчетные индексы в исследуемых группах представлены в табл. 1.

В табл. 1. Представлено, что между показателями функциональной активности микрофлоры кишечника исследовательской группы и группы сравнения есть статистическая значимость по показателям концентрации валериановой и изокапроновой кислот. Валериановая (син. пентановая) является одной из тяжелых короткоцепочечных жирных кислот, обладает слабым спазмолитическим действием и стимулирует моторику толстой кишки. Наряду с изовалериановой измеряется для характеристики функциональной активности микробиоты кишечника. Изокапроновая кислота, как продукт переработки белков микробиотой кишечника, свидетельствует о повышении протеолитической активности, что в свою очередь указывает на преобладание гнилостных процессов в просвете толстой кишки. Также, изоформа капроновой кислоты может проникать в кровеносное русло и оказывать токсическое воздействие на нервную ткань организма человека.

Функциональная активность микробиоценоза напрямую зависит от филотипа микробиоценоза и его качественного состава и взаимодействия бактерий между друг другом и макроорганизмом, начиная с раннего этапа формирования. Известно, что 2,2 ммоль/г масляной кислоты в кале является критической концентрацией для микробного сообщества, ниже которой вероятность метаболических связей индигенной микрофлоры резко снижается [5]. Используем этот критерий для определения частоты встречаемости микробиоценозов кишечника, характерных для симбионтных взаимоотношений макроорганизм – микробиота в исследуемых группах в зависимости от возраста детей (табл. 2.). Этапы становления микроэкологии кишечника у наблюдаемых детей в первые дни жизни после рождения представлены в Табл. 2.

Таблица 1.
Функциональная активность микрофлоры кишечника у исследуемых групп детей, n=60; ммоль/г

Примечание:
Полужирным шрифтом выделены значения статистической значимости p<0,05, рассчитанной по χ^2-критерию

Table 1.
Functional activity of gut microflora in the studied groups of children, n=60; mmoL/g

Компонент КЖК	Исследовательская группа	Группа сравнения	Референсные значения	Статистическая значимость, p<0,05
Абсолютные значения				
Уксусная, ммоль/г	48,32 [30,9–125,9]	47,59 [17,4–73,6]	50,21 [32,67–6,09]	0,291704
Пропионовая, ммоль/г	3,84 [1,4–18,2]	3,15 [1,3–7,9]	5,95 [2,86–13,05]	0,354819
Изомасляная, ммоль/г	0,57 [0,2–1,6]	0,61 [0,3–1]	0,54 [0,24–1,24]	0,931393
Масляная, ммоль/г	1,96 [0,6–6,3]	1,86 [0,5–3,4]	3,92 [1,99–7,46]	0,389335
Изовалериановая, ммоль/г	0,63 [0,2–1,2]	0,66 [0,3–0,9]	0,44 [0,18–0,76]	0,829607
Валериановая, ммоль/г	0,13 [0,1–1]	0,28 [0,1–0,5]	0,2 [0,08–0,39]	***0,050147***
Изокапроновая, ммоль/г	0,07 [0–0,1]	0,03 [0–0,1]	0,01 [0,01–0,02]	***0,049167***
Капроновая, ммоль/г	0,07 [0–0,3]	0,07 [0–0,1]	0,02 [0,01–0,21]	0,762656
Расчетные индексы				
Суммарная концентрация КЖК, ммоль/г	54,37 [34,2–151,5]	53,76 [21,5–92,6]	67,3 [43,7–101,6]	0,236611
Структурный индекс, ед.	0,17 [0,1–0,3]	0,23 [0,2–0,3]	0,29 [0,17–0,43]	0,620657
Индекс изокислот, ед.	0,52 [0,4–0,9]	0,68 [0,4–0,9]	0,25 [0,13–0,47]	0,682653
Соотношение уксусная – пропионовая – масляная кислота				
Уксусная,%	86,5 [83,4–92,2]	86,64 [83,5–89,6]	79,4 [72,89–7,31]	0,88027
Пропионовая,%	7,17 [4,9–11,5]	8,96 [4,9–10]	11,52 [5,72–17,58]	0,948529
Масляная,%	3,75 [1,8–5,4]	4,5 [1,7–7,5]	6,05 [3,25–1,62]	0,846439
Относительные концентрации				
Уксусная, ед.	0,85 [0,8–0,9]	0,81 [0,8–0,9]	0,772 [0,695 –,865]	0,620657
Пропионовая, ед.	0,07 [0–0,1]	0,09 [0–0,1]	0,104 [0,054 –,174]	0,982832
Изомасляная, ед.	0,01 [0–0,01]	0,02 [0–0,02]	0,0096 [0,0043–0,017]	0,116223
Масляная, ед.	0,04 [0–0,1]	0,04 [0–0,1]	0,057 [0,031 –,11]	0,88027
Изовалериановая, ед.	0,01 [0–0,01]	0,01 [0–0,01]	0,006 [0,0032–0,011]	0,161908
Валериановая, ед.	0 [0–0,01]	0 [0–0,01]	0,0036 [0,0011–0,0061]	0,779679
Изокапроновая, ед.	0 [0–0,01]	0 [0–0,01]	0,01 [0,01–0,02]	0,354819
Капроновая, ед.	0 [0–0,01]	0 [0–0,01]	0,01 [0,01–0,02]	0,779679

Таблица 2.
Становление микроэкологии кишечника у наблюдаемых детей в первые дни жизни после рождения,%

Примечание:
Полужирным шрифтом выделены значения статистической значимости p<0,05, рассчитанной по χ^2-критерию

Table 2.
Gut microecology formation in the studied groups of children in the first days of life,%

Возраст, сут.	Исследовательская группа	Группа сравнения	Статистическая значимость
1	0	25	***p<0,01***
2	100	57,1	***0,000629***
3	33,3	40	0,44
Всего	45,5	47,4	0,84

Из табл. 2. следует, что в исследовательской группе заселение кишечника микроорганизмами начинается на 2-е сутки, а в группе сравнения в 1-е сутки. Это может быть связано с тем, что нормальная индигенная микрофлора с самого рождения сохраняет этапность заселения кишечника, формирует крепкие симбионтные отношения с макроорганизмом, что приводит к регулируемому становлению здорового микробиоценоза. Между тем, к 5-му дню показатели выравниваются в обеих группах, но за счет разных механизмов.

Для оценки видового состава микробиоценоза кишечника сравним частоты встречаемости видов микроорганизмов и классов к которым они относятся в титре выше 10^3 КОЕ/г и интенсивность бактериальной колонизации по среднему Lg КОЕ/г (табл. 3.).

В табл. 3. представлены данные, из которых следует, что чаще других в исследовательской группе и группе сравнения встречаются микроорганизмы класса *Firmicutes* (73,7% и 90,9% соответственно). Но у детей, рожденных от матерей с ГСД, при анализе качественного и количественного состава микроорганизмов: бактерии формирующие индигенную микрофлору (*Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria*) встречаются реже. Так, только

Таблица 3.
Сравнение видового состава микробиоценоза кишечника по частоте встречаемости и интенсивности бактериальной колонизации кала детей исследуемых групп; КОЕ/г

Примечание:
Полужирным шрифтом выделены значения статистической значимости p<0,05, рассчитанной по U-критерию Манна-Уитни и χ^2-критерию

Table 3.
Comparison of the frequency and intensity of bacterial colonization of the feces of the studied groups of children to determine the species composition of the gut microbiocenosis; CFU/g

Класс/вид микроорганизма	Частота встречаемости выше 10^3 КОЕ/г			Интенсивность бактериальной колонизации, средний Lg КОЕ/г		
	ИГ	ГС	Статистическая значимость, p<0,05	ИГ	ГС	Статистическая значимость, p<0,05
Firmicutes	73,68	90,91	0,179	4,2 [2,2–4,9]	5,9 [4–6,3]	***0,022***
Clostridiumdificile	9,09	-	***0,003***	2,75 [1,5–4]	1,65 [1–2,45]	0,533
Clostridiumleptum	45,45	15,79	p<0,01	2,5 [2,4–3,3]	2,15 [1,5–3,7]	0,608
Enterococcusspp.	36,84	72,73	***0,001***	4,45 [2,9–4,9]	5,5 [4,1–6]	0,133
Staphylococcusspp.	47,37	72,73	***0,021***	3,3 [3,05 –,9]	4 [2,4–4,6]	0,525
Anaerococcusspp.	-	-		1,9 [1,9–1,9]	1,1 [0,4–2]	***p<0,01***
Erysipelotrichaceae	9,09	-	***0,003***	6 [6–6]	-	***p<0,01***
Lactobacillaceae	-	18,18	p<0,01	1,4 [1,1–2,4]	2,6 [2,2–3]	***0,012***
Lactococcuslactis	-	-		1,6 [1,6–1,6]	2,6 [2,6–2,6]	***p<0,01***
Streptococcusspp.	42,11	72,73	***0,004***	3,7 [1,95 –,8]	4,45 [3,2–5,5]	0,346
Actinobacteria	21,05	27,27	0,371	0,5 [0–2,7]	1 [0–4,9]	0,377
Bifidobacteriumspp.	21,05	27,27	0,371	2,6 [0,5–5,1]	2,5 [0,95–6]	0,717
B. dentium	-	9,09	***0,003***	-	4,9 [4,9–4,9]	***p<0,01***
B. adolescentis	-	18,18	p<0,01	-	6,2 [2,1–6,8]	***p<0,01***
B. bifidum	5,26	-	***0,022***	-	7 [7–7]	***p<0,01***
B. longum	-	18,18	p<0,01	-	4,9 [3,4–6,4]	***p<0,01***
B. animalislactis	-	-		2,2 [2,2–2,2]	-	***p<0,01***
Coriobacteriia	-	18,18	p<0,01	2,6 [2,6–2,6]	5,6 [4,6–6,6]	***p<0,01***
Bacteroidetes	21,05	45,45	***0,003***	4,9 [4,3 –,45]	5,2 [3,1–6,1]	0,762
Bacteroidesspp.	21,05	45,45	***0,003***	0 [0–0]	2,3 [0–5,8]	***0,027***
Parabacteroidesspp.	-	18,18	p<0,01	1,5 [1,4–2,1]	2,9 [2,5–4,1]	0,25
Butyricimonas	-	-		-	2,9 [2,9–2,9]	***p<0,01***

таблица 3 (продолжение)
table 3 (continued)

Класс/вид микроорганизма	Частота встречаемости выше 10^3 КОЕ/г			Интенсивность бактериальной колонизации, средний Lg КОЕ/г		
	ИГ	ГС	Статистическая значимость, p<0,05	ИГ	ГС	Статистическая значимость, p<0,05
Prevotellaspp.	-	-		-	2,5 [2,5–2,5]	***p<0,01***
Alistipesspp.	-	9,09	***0,003***	-	3,3 [3,3–3,3]	***p<0,01***
Proteobacteria	54,55	47,37	0,477	5,7 [2,1–6,7]	2,5 [1,9–5,5]	0,377
Enterobateriaceae	54,55	47,37	0,477	6,4 [2,3–6,7]	2,95 [1,9–5,5]	0,131
E. coli	45,45	42,11	0,720	5,1 [1,3–5,7]	4 [1,7–4,9]	0,485
Pseudomonasspp.	-	-		1,9 [1,9–2,2]	1,9 [1,9–2,1]	0,74
Bdelovibrio	-	-		-	0,7 [0,7–0,7]	***p<0,01***
Suterellawadsworthensis	-	-		2,8 [2,8–2,8]	-	***p<0,01***
DialisterAlisonella Megaspherae Vellonella	5,26	18,18	***0,008***	0 [0–0]	0 [0–1,8]	0,22

один вид бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* в исследовательской группе, к *B. Dentium, B. Adolescentis, B. Longum, Lactobacillaceae* в группе сравнения. В меньшем количестве *Enterococcus spp. Staphylococcusspp. Streptococcus*, являющихся индигенной флорой на этапе подготовки внутрикишечных условий к анаэробным, активно снижают содержание кислорода в полости кишки; и обеспечивают колонизационную резистентность слизистой оболочки кишечника. И в большем *E. coli*, которая конкурирует с патогенными микроорганизмами за места прикрепления к эпителиальным клеткам толстой кишки и вырабатывает колицины – антибиотикоподобные вещества, тормозящие рост патогенных микроорганизмов.

Также в отличие от группы сравнения у детей от матерей с ГСД в меньшем количестве выделялись бактерии, представители нормальной микрофлоры: *Actinomyces, Parabacteroides, Veillonella, Bacteroides*, разлагающие сложные растительные полисахариды (крахмал, целлюлоза, ксиланы, пектины) и играющие важную роль в метаболизме белка. Далее, во время качественного анализа составляющих микробиоценоза у детей исследовательской группы были выделены бактерии типа *Firmicutes* относящиеся к патогенным: *Clostridium dificile*, вызывающие воспаление слизистой кишечника при ослаблении местного иммунитета и нарушении биопленки, *Erysipelotrichaceae*, влияющие на метаболизм липидов хозяина. Преобладающие бактерии типов *Proteobacteria* и *Tenericutes* включающие большое количество патогенных бактерий. Протеобактерии имеют высокий потенциал для чрезмерного роста и кишечного доминирования, что может приводить к воспалительным заболеваниям кишечника и нарушению усвоения питательных веществ, обмена веществ.

В целом, микрофлора исследовательской группы представлена большим видовым разнообразием микроорганизмов, что указывает на снижение симбионтных отношений микробиома с макроорганизмом. Колонизация отдельных видов микроорганизмов в исследовательской группе достигает 10^3–10^4 микроорганизмов, тогда как в группе сравнения 10^5–10^6. Это может быть связано с тем, что для подготовки условий для колонизации индигенной флорой кишечника у детей, рожденных от матерей с ГСД, необходимо затратить больше усилий, чем у детей от матерей без сахарного диабета. Известно, что микробиоценоз имеющий симбионтные отношения с макроорганизмом более качественно отлаживает свою работу уже с начальных этапов заселения в кишечнике. В тоже время, активный рост микроорганизмов у детей от матерей с сахарным диабетом, начиная со вторых суток жизни может приводить формированию дизбиоза, т.к. идет активная борьба отдельных видов бактерий за питательный субстракт. При этом увеличение биоразнообразия может сопровождаться выравниванием показателя интенсивности бактериальной колонизации, что приведет к быстрой смене доминирующего вида микроорганизма без участия макроорганизма.

Проведенные нами корреляции между основными показателями функциональной активности микробиоценоза кишечника и классами микроорганизмов кала детей исследуемых групп представлены в табл. 4.

В табл. 4. показано, что в исследовательской группе отмечается прямая корреляционная связь концентрации масляной кислоты с общим уровнем ЛЖК и структурным индексом. Также обнаружена прямая корреляционная связь интенсивности бактериальной колонизации *Proteobacteria* с *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Сильные корреляционные связи

	Общий уровень КЖК	Структурный индекс	Масляная кислота	*Firmicutes*	*Actinobacteria*	*Bacteroidetes*	*Proteobacteria*
Исследовательская группа							
Общий уровень (ОУ) КЖК	1,00	0,06	***0,74***	0,14	0,46	-0,15	-0,11
Структурный индекс (СИ)	0,06	1,00	***0,58***	-0,30	-0,43	0,36	0,09
Масляная кислота (С4)	***0,74***	***0,58***	1,00	-0,09	0,02	0,12	-0,12
Firmicutes	0,14	-0,30	-0,09	1,00	0,25	0,30	***0,63***
Actinobacteria	0,46	-0,43	0,02	0,25	1,00	-0,18	-0,01
Bacteroidetes	-0,15	0,36	0,12	0,30	-0,18	1,00	***0,52***
Proteobacteria	-0,11	0,09	-0,12	***0,63***	-0,01	***0,52***	1,00
Группа сравнения							
ОУ	1,00	-0,36	0,32	0,20	-0,15	-0,39	***-0,69***
СИ	-0,36	1,00	0,53	-0,49	0,04	0,11	-0,14
С4	0,32	0,53	1,00	-0,21	0,09	-0,48	***-0,65***
Firmicutes	0,20	-0,49	-0,21	1,00	0,17	0,17	0,34
Actinobacteria	-0,15	0,04	0,09	0,17	1,00	0,27	0,41
Bacteroidetes	-0,39	0,11	-0,48	0,17	0,27	1,00	0,47
Proteobacteria	***-0,69***	-0,14	***-0,65***	0,34	0,41	0,47	1,00

Таблица 4.
Корреляционные связи между показателями функциональной активности микробиоценоза кишечника и интенсивностью бактериальной колонизации кала у наблюдаемых детей

Примечание:
Полужирным шрифтом выделены значения статистической значимости p<0,05 коэффициента корреляции

Table 4.
Correlations of the intestinal microbiocenosis functional activity and the fecal bacterial colonization in the studied groups of children

Параметры функциональной активности микробиоценоза кишечника	Исследовательская группа	Группа сравнения
Суммарная концентрация КЖК, ммоль/г	0,28	-0,3
Структурный индекс, ед.	0,29	0,28
Индекс изокислот, ед.	-0,26	0,26
Уксусная, ммоль/г	0,23	-0,26
Пропионовая, ммоль/г	0,36	-0,13
Масляная, ммоль/г	***0,47***	***-0,68***
Валериановая, ммоль/г	0,29	***-0,66***
Капроновая, ммоль/г	0,15	-0,43
Изомасляная, ммоль/г	0,29	-0,47
Изовалериановая, ммоль/г	0,4	-0,6
Изокапроновая, ммоль/г	0,09	-0,52
Концентрация углеводов в кале	***-0,57***	-0,55
Концентрация эластазы в кале	0,06	0,31

Таблица 5.
Коэффициенты корреляции между показателями индекса Шеннона и параметрами функциональной активности микробиоценоза кишечника; ммоль/г

Примечание:
Полужирным шрифтом выделены значения статистической значимости p<0,05 коэффициента корреляции

Table 5.
Correlation of Shannon index and the intestinal microbiocenosis functional activity; mmoL/g

в исследовательской группе между показателями функциональной активности микробиоценоза кишечника и между *Proteobacteria, Firmicutes* и *Bacteroidetes* указывают на повышение функциональной активности условно-патогенных и патогенных бактерий. Масляная кислота удовлетворяет энергетические потребности неструктурированного и некачественного микробного сообщества, что в свою очередь приводит к благоприятным условиям для дальнейшего бесконтрольного роста патогенных бактерий и увеличению ферментации ими белков в толстой кишке. Следствием данного варианта функциональной активности дисбиотического сообщества являются повышение изоформ ЛЖК и преобладание протеолитических реакций в кишечнике.

В группе детей, рожденных от матерей без сахарного диабета, напротив, выявлена обратная корреляционная связь Proteobacteria с концентрацией масляной кислоты. Таким образом, формирование качественной индигенной микрофлоры кишечника способствует достаточной выработке масляной кислоты, удовлетворяющей потребности и макро- и микроорганизмов для поддержания дальнейшего роста и развития гармоничного микробного сообщества поддерживающего симбионтные взаимоотношения с макроорганизмом.

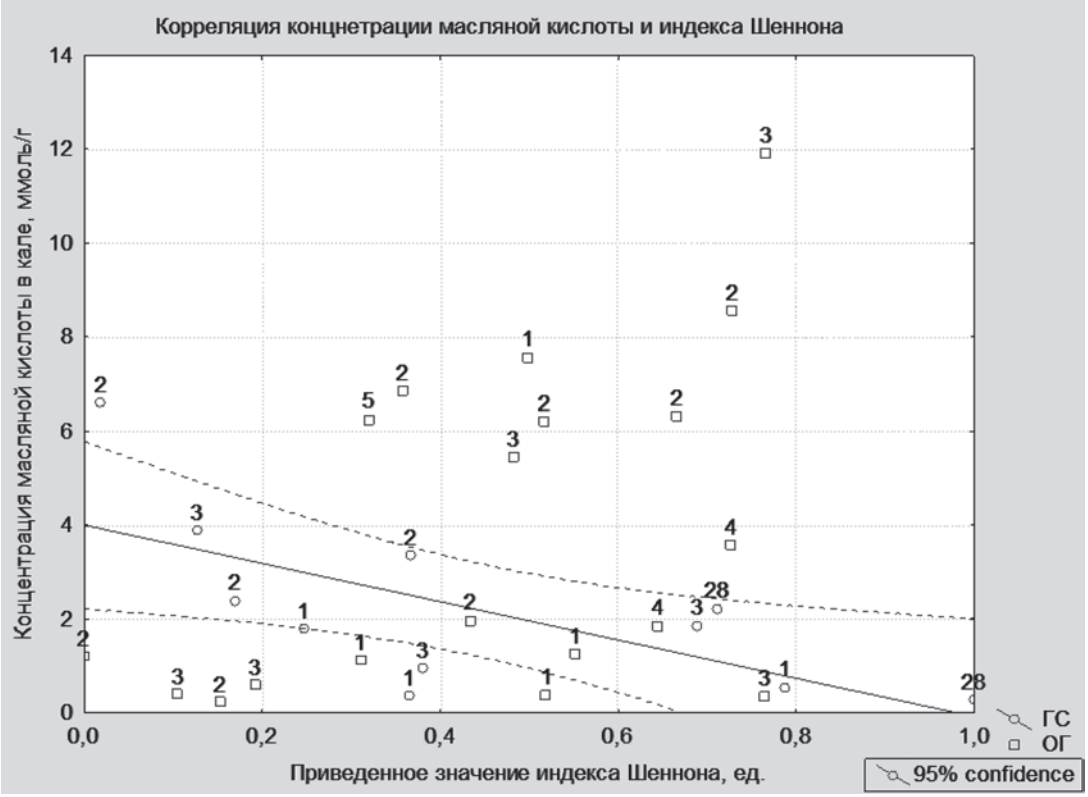
Для выявления наличия и направленности корреляционных связей между критериями биоразнообразия и функциональной активностью микробиоценоза сравним их коэффициенты корреляции (табл. 5.).

Из табл. 5. следует, что у детей, рожденных от матерей с ГСД между индексом Шеннона и концентрацией масляной кислоты в кале имеется прямая корреляционная связь. Основной критерий функциональной активности микробиоценоза кишечника – концентрация масляной кислоты, а также пропионовой и изовалериановой кислот увеличиваются в исследовательской группе вместе с увеличением биоразнообразия, приводящего к формированию дисбиотического микробиома (дизбиоза).

В группе сравнения также имеется корреляционная связь между индексом Шеннона и концентрацией масляной кислоты и другими показателями

Рисунок 1
Распределение концентрации масляной кислоты относительно индекса Шеннона в исследуемых группах с учетом возраста ребенка

Figure 1.
Distribution of the concentration of butyric acid in relation to the Shannon index in the age-distrubuted children



функциональной активности микробиоценоза кишечника, но с отрицательным значением. Низкая интенсивность бактериальной колонизации условно-патогенной и патогенной флорой ведет к формированию здорового микробиома.

Высокое биоразнообразие представителей условно-патогенной флоры у детей, рожденных от матерей с ГСД, отрицательная корреляционная связь с углеводами кала, свидетельствуют о том, что даже при наличии достаточных показателей масляной кислоты, вырабатываемой бактериями, среда недоокисляется, что приводит к повышению pH и росту гнилостной флоры (клостридии, энтеробактерии).

Таким образом в кале обнаруживаются более высокие показатели изоформ КЖК, свидетельствующие о повышении протеолитической активности бактреий. В процессе разложения белков и аминокислот в результате ферментативного гидролиза гнилостных бактерий образуются токсичные конечные продукты – аммиак и сероводород. Идет повреждение слизистой толстой кишки, нарушаются защитные функции биопленки, формируется хроническое воспаление, слизистая становится уязвимой к воздействию токсинов. Одновременно, повышение pH среды в толстой кишке ведет к изменению pH среды в верхних отделах желудочно-кишечного тракта (ВОПТ), а значит, нарушается баланс микробиоты в тонкой кишке, с последующим нарушением пищеварения. Что в свою очередь ведет к дефициту микронутриентов, необходимых для полноценного роста и развития детей.

Далее рассмотрели распределение концентрации масляной кислоты относительно индекса Шеннона (рис. 1).

На рис. 1. отмечена линия регрессии концентрации масляной кислоты относительно индекса Шеннона с указанием 95% доверительного интервала. Также показано, что дети исследовательской группы в основной массе старше 2 дней имеют высокие (более 0,5) значения индекса Шеннона и значения концентраций масляной кислоты 5 ммоль/г и выше. Таким образом, дети, рожденные от матерей с ГСД на 2й день жизни достигают нормального уровня масляной кислоты за счет увеличения микробного разнообразия. Нарушение микроэкологии кишечника (МЭК) в сторону увеличения факультативной и транзиторной микрофлоры, помимо изменения физиологических функций могут сопровождаться: транслокацией бактерий с развитием эндогенных инфекционных процессов (вплоть до гнойно-септических); снижением общей иммунологической резистентности; развитием аллергических и иммунокомплексных реакций; формированием патогенных клонов бактерий и др.

Заключение

Изменение микробиоценоза кишечника у детей происходит благодаря поэтажному заселению и формированию особой зоны, прилегающей непосредственно к эпителию толстой кишки, в которой будет сформировано анаэробное микробное сообщество индигенной микрофлоры. Благодаря сравнению частот встречаемости концентрации масляной кислоты относительно ее критического

значения в кале определяется более позднее время начала формирования симбионтного микробиоценоза кишечника у исследовательской группы. Видовой состав микробиоты у детей, рожденных от матерей с сахарным диабетом, отмечается более поздним заселением индигенной микрофлоры, но более быстрыми темпами заселения кишечника большим количеством видов микроорганизмов, но с низкими значениями интенсивности бактериальной колонизации.

Между интенсивностью бактериальной колонизации различных классов микроорганизмов отмечается прямая корреляционная связь в исследовательской группе, которая сопровождается прямой корреляцией суммарной концентрации КЖК и структурного индекса с концентрацией масляной кислоты. Таким образом, наблюдается снижение управляемости микробного сообщества макроорганизмом и формирование дизбиоза кишечника. Развитие дизбиоза кишечника в исследовательской группе подтверждается прямой корреляционной связью концентрации масляной кислоты в кале и критерия биоразнообразия – индекса Шеннона.

Формирование микробного сообщества у детей, рожденных от матерей с ГСД, на этапе заселения кишечника за счет увеличения видового разнообразия указывает на снижение симбионтных отношений микробиоценоза с макроорганизмом. За счет такого биоразнообразия и межвидового симбиоза бактерий в толстой кишке формируются компенсаторные механизмы для сосуществования макроорганизма и микробиоты. С одной стороны: вырабатывается достаточный уровень масляной кислоты, являющейся одним из основных метаболитов микробиоты кишечника, регулирующей основные метаболические и пищеварительные процессы. С другой: потребление КЦЖК микробиотой с последующим выделением изокислот в увеличенном количестве приводит к росту гнилостной микробной флоры. В данных условиях есть риск формирования патологических реакций, срыва компенсаторных механизмов, как пускового фактора для развития метаболических нарушений.

Литература | References

1. Vorobiev A. A. Bacteria of normal microflora: biological properties and protective functions. *ZhMEI*. 1999, no. 6, pp. 102–105. (In Russ).

   Воробьев А. А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции // ЖМЭИ. – 1999. – № 6. – С. 102–105.

2. Kuchumova S. Yu., Poluektova E. A., Sheptulin A. A., et al. Physiological significance of intestinal microflora. *RZhGGK*. 2011, Vol. 21, No. 5, pp. 17–27. (In Russ).

   Кучумова С. Ю. Физиологическое значение кишечной микрофлоры / С. Ю. Кучумова, Е. А. Полуэктова, А. А. Шептулин [и др.] // РЖГГК. – 2011. – Т. 21, № 5. – С. 17–27. 2.

3. Douglas A. Symbiotic interaction. Oxford Univer Press. Oxford: Y-N, Toronto, 1994, 148 p.

4. Zatevalov A. M., Kiseleva I. A., Kopanev Yu. A., Aleshkin A. V., Afanasyev S. S., Selkova E. P. The influence of bacteriophages on the microflora of the large intestine. Materials of the 1st international scientific-practical conference "Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry." Ulyanovsk. UGSKhA them. P. A. Stolypin. 2013, no.2, pp.9–14.

   Затевалов, А. М. Киселева И. А., Копанев Ю. А., Алешкин А. В., Афанасьев С. С., Селькова Е. П. Влияние бактериофагов на микрофлору толстой кишки // Материалы 1 международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». Ульяновск: УГСХА им. П. А. Столыпина. 2013. Т. 2. С. 9–14.

5. Zatevalov A.M., Alyoshkin V. A., Selkova E. P., Grenkova T. A. Determination of the concentration of butyric acid in feces, critical for the functional activity of normal intestinal and oropharyngeal microflora, of butyric acid concentration in the feces of patients of the intensive care unit who are on tube feeding. *Fundamental and clinical medicine*. 2017, Vol. 2, no. 1, pp. 14–22. (In Russ).

   Затевалов А. М., Алёшкин В. А., Селькова Е. П., Гренкова Т. А. Определение критической для функциональной активности нормальной микрофлоры кишечника и ротоглотки величины концентрации масляной кислоты в кале пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, находящихся на зондовом питании. Фундаментальная и клиническая медицина. 2017. Т. 2. № 1. С. 14–22.

6. Onishchenko G.G., Aleshkin V. A., Afanasyev S. S., et al. Immunobiological preparations and prospects for their use in infectious diseases. GOUVUMNTSMZRF Publ., Moscow, 2002. (In Russ).

   Онищенко Г. Г., Алешкин В. А., Афанасьев С. С., Поспелова В. В., Грачева Н. М., и др. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии/ ГОУВУМНЦМЗРФ – Москва, 2002.

7. Aagaard K. et al., 2014.

8. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, Vol. 15, pp. 167–193.

9. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* 2008, Vol. 242(Suppl. 3), pp. S142–S143.