

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Институт Развития Образования
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Галимов Тимур Рафитович

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА
ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии



Титова Т.Н.

Уфа – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Актуальность	7
1.2. Общий состав микрофлоры кишечника	8
1.3. Развитие микробиоты кишечника у детей.....	10
1.4. Факторы, способствующие формированию кишечной микробиоты ...	12
1.5. Специфика состава микробиоты кишечника у детей с метаболическим синдромом.....	12
1.6. Повреждение барьерной функции кишечника у людей с ожирением ..	16
1.7. Изменения в регуляции иммунных клеток кишечника у людей с ожирением.....	17
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	18
2.1. Объекты исследования	18
2.2. Материалы и составы сред.....	18
2.2.1 Приготовление среды Эндо	19
2.2.2 Приготовление среды MRS.....	20
2.2.3 Приготовление среды ГМ-Ф-АГАР	21
2.2.4 Приготовление среды №2 ГРМ (САБУРО).....	22
2.2.5 Приготовление среды Bifidobacterium Agar.....	23
2.2.6 Приготовление среды Солевой агар-М	24
2.2.7 Приготовление среды Бактоагар Плоскирева.....	25
2.2.8 Приготовление среды среда Левина-ГРМ.....	26
2.2.9 Приготовление среды Бифидум-среда.....	27
2.2.10 Приготовление среды Тиогликолевая среда	28
2.3. Посев Биоматериала	29
2.4. Идентификация микроорганизмов, выросших на питательных средах	31
2.4.1 Окраска по Граму	31
2.4.2. MALDI-TOF Mass Spectrometry.....	32
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	35

3.1. Исследование микробиоты детей.....	35
3.2. Анализ полученных данных и сравнение результатов	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
ВЫВОДЫ.....	42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	43

Список сокращений и условных обозначений

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ОТЕ - операционные таксономические единицы

МО - микроорганизм

КЦЖК - короткоцепочечные жирные кислоты

МЭК - эпителиальные клетки кишечника

ЛПС - липополисахарид

ВЖД - высокожировая диета

КОЕ - колониеобразующие единицы

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ученые считают, что микробиота кишечника является важным фактором здоровья человека. Ее участие в пищеварении, синтезе витаминов, развитии иммунной системы имеет огромное значение для организма в целом. Но так же нарушение в видовом составе и работе микробиоты может приводить к развитию различных неинфекционных болезней, таких как нарушение функционирования иммунной системы, функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также метаболического синдрома [21].

Метаболический синдром является мультифакторным заболеванием с участием в патогенез многих органов [1]. Немаловажную роль в сложном многоуровневом процессе пищеварения играют микроорганизмы в кишечнике. Данное заболевание представляет собой одно из наиболее распространенных проблем здоровья во многих странах, которое может приводить к тяжелым осложнениям.

В последние годы с развитием методов все большее внимание уделяется изучению связи микробиоты кишечника и патогенеза метаболического синдрома. Уже полученные данные указывают на то, что у детей с метаболическим синдромом наблюдаются существенные различия в качественном и количественном составе микробиоты кишечника по сравнению со здоровыми детьми.

Осуществление данного исследования позволит получить новые данные о связи между микробиотой кишечника и метаболическим синдромом у детей, а также выявить предполагаемые цели для диагностики и лечения метаболического синдрома.

Цель: выполнить сравнительный анализ микробиоты кишечника здоровых детей и детей с метаболическим синдромом.

Задачи:

1. Посев биоматериала на питательные среды
2. Произвести идентификацию бактерий
3. Провести сравнительный анализ, в составе микробиоты кишечника у здоровых детей и детей с метаболическим синдромом.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность

За последние несколько десятилетий ожирение стало одной из наиболее распространенных проблем здоровья детей. Отсутствие сбалансированного питания и сидячий образ жизни привели к росту числа детей с избыточным весом, что является серьезным фактором риска для развития различных заболеваний среди молодежи.

Изучение взаимосвязи между составом микробиоты кишечника и образом жизни ребенка стало большой областью для диагностики и профилактики ожирения. Под микробиотой понимают совокупность микроорганизмов, населяющих организм, которые выполняют ключевые функции, такие как усвоение питательных веществ и синтез витаминов. Исследования как иностранных, так и Российских исследователей показывают, что состав микробиоты кишечника может отличаться у детей с ожирением и у здоровых детей. Дети с метаболическим синдромом часто имеют нарушения в обмене веществ, повышенный уровень глюкозы и холестерина в крови [2].

Изучение микробиоты кишечника у больных может помочь понять механизмы развития и прогрессирования этого заболевания. Сравнительный анализ микробиоты кишечника здоровых детей и детей с метаболическим синдромом может пролить свет на важные отличия в составе и функциях микробиоты, которые могут быть ключом к пониманию и лечению данного заболевания.

Также, у них часто отмечается повышенное количество некоторых микроорганизмов, которые могут быть связаны с ожирением и воспалительными процессами в организме. Однако, микробиота кишечника – это очень сложная система, и нужно произвести еще множество исследований, чтобы полностью понять ее роль в развитии ожирения. Тем не менее, результаты первых исследований уже позволяют сделать некоторые выводы. Доступ к здоровому питанию с высоким содержанием пищевых

волокон, пробиотиков и ферментированных продуктов может оказаться полезным для поддержания здоровья кишечника и профилактики ожирения [3].

Уже существует множество работ, посвященных исследованию микробиоты кишечника у детей, однако немного исследований сосредоточено на сравнении микробиоты у детей с метаболическим синдромом и у здоровых детей. Проведение сравнительного анализа может помочь выявить уникальные свойства микробиоты у этой группы детей и выделить потенциальные цели для диагностики и лечения метаболического синдрома.

1.2. Общий состав микрофлоры кишечника

Общая микрофлора кишечника, также известная как кишечная микробиота или микробиом кишечника, представляет собой сложное сообщество микроорганизмов, включая бактерии, археи, грибы, которые живут в пищеварительном тракте, в основном в толстой кишке.

Микробиота кишечника — это богатая и динамичная экосистема, которая активно взаимодействует с организмом человека, играя важную роль в состоянии здоровья и болезнях хозяина. Диета, физические упражнения, психическое здоровье и другие факторы продемонстрировали способность влиять на бактериальный состав кишечника, приводя к изменениям, которые могут предотвращать и улучшать, или благоприятствовать и ухудшать как кишечные, так и внекишечные заболевания.

В кишечнике человека обитает множество микроорганизмов, представленных смесью бактерий, архей, грибов и простейших, которые начинают колонизировать кишечник при рождении и эволюционируют вместе с хозяевами на протяжении всей их жизни. Эта популяция организмов называется "микробиотой кишечника" и представляет собой результат тысячелетней коэволюции и мутуалистических отношений с организмом человека. Наиболее распространенными отделами бактерий в кишечнике являются *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, которые составляют более 90% всех

бактерий. Другие отделы, такие как *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, также присутствуют в кишечнике, но в меньшем количестве.

Микробиота кишечника синтезирует витамины, такие как витамин К и большинство водорастворимых витаминов группы В, включая биотин, кобаламин, фолиевую кислоту, никотиновую кислоту, пантотеновую кислоту, пиридоксин, рибофлавин и тиамин [12].

Он также вырабатывает нейротрансмиттеры и гормоны, которые служат сигналами для центральной нервной системы и могут влиять на настроение и когнитивные способности [14, 15]. Кишечная микробиота человека также участвует в разложении и ферментации волокон и биотрансформации желчных кислот, вырабатываемых печенью, способствуя усвоению питательных веществ и метаболизму и, следовательно, влияя на общее состояние здоровья хозяина [16]. Общий состав микрофлоры кишечника может варьироваться у разных людей в зависимости от многих факторов, включая возраст, пол, питание, образ жизни, здоровье и прием лекарств. Однако, в целом, здоровая микрофлора кишечника характеризуется высоким разнообразием и стабильностью состава микроорганизмов. Дисбаланс состава и функционирования кишечной микрофлоры, также известный как дисбиоз, может стать причиной различных заболеваний и нарушений здоровья. В кишечнике человека имеется биопленка состоящая из микроскопических грибов и экзополисахаридов [4]. Многие полезные функции, обеспечивающиеся благодаря сложной метаболической системы пищеварения и ее ферментативной активностью, что и представляет кишечную микробиоту.

Анализ исследований микробиоты кишечника показал, большая часть видов, выявленных у людей, принадлежат к типам *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria* составляют оставшуюся часть. Бактерии типа *Firmicutes* являются грамположительными бактериями и представлены *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* и

Clostridium, в то время как бактерии типа *Bacteroidetes* - грамотрицательные бактерии, представителями которого являются *Bacteroides* и *Prevotella*. С другой стороны, род *Bifidobacterium* является основным представителем актинобактерий [26].

В современной литературе исследователи выделяют три основных типа кишечной микробиоты: *Prevotella-enterotype*, *Bacteroides-enterotype* и *Ruminococcus-enterotype*. Существует взаимосвязь между численностью каждого из типов и характером питания человека. Например, *Prevotella-enterotype* встречается у людей, в рационе которых отсутствуют животные белки и у жителей сельских местностей, избирающие углеводную диету. *Bacteroides-enterotype* распространён у людей, которые употребляют в пищу животного происхождения. *Ruminococcus-enterotype* преобладает у людей, рацион которых разнообразен [17].

Однако, не все типы кишечной микробиоты полезны для выживания хозяина. Некоторые кишечные бактерии, например *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* и *Helicobacter pylori*, могут вызывать патогенные реакции у хозяина [18]. Также, например фенол, амины, сероводород и аммиак, провоцируют воспаление, повреждение ДНК, вызывая рак [19]. Но, данные процессы могут быть ослаблены употреблением пищевых волокон или растительной пищи, что говорит о том, что в ферментации углеводов важную роль так же имеет кишечная микробиота [20].

1.3. Развитие микробиоты кишечника у детей

Нам известно, что в процессе рождения, когда ребенок проходит по родовым путям, происходит заселение биотопа его организма. Физиологическая колонизация микроорганизмов ЖКТ начинается от верхних отделов к нижним с определенной последовательностью [27].

Прикладывание ребенка к материнской груди так же является необходимым фактором для нормального заселения микроорганизмами пищеварительного тракта. Это обуславливается высоким содержанием пребиотиков в молоке и большим содержанием молочнокислых бактерий на поверхности ареолы

сосков [25, 34]. Использование культуральных методов показало, что активное заселение и рост кишечной палочки и энтерококков происходит в первые сутки жизни. Далее со вторых суток преобладает рост лактобацилл, с третьих суток — бифидобактерий [5, 6]. В ходе одного исследования было определено, что в ЖКТ взрослого человека может содержаться от 15 до 34 тыс. видов бактерий, общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл фекалий может достигать 10^{12} [40]. Так же, в микробиоте кишечника присутствуют ядродержащие эукариоты и прокариоты, у которых отсутствует ДНК-содержащее ядро, вирусы и простейшие. Вместе кишечная микробиота содержит около 3,2 млн. генов, при этом их число в геноме человека почти в 140 раз меньше [8].

У детей раннего возраста в микробиоте кишечника преобладают *Bifidobacterium*, составляя большую часть популяции микроорганизмов [7]. Результаты исследований с использованием методов секвенирования генов 16S рНК, метод полимеразной цепной реакции показали, что у детей в возрасте 8–14 месяцев преобладающими видами *Bifidobacterium* являются *B. longum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*. Характерные для детей первых 12 месяцев жизни *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* имеют противовоспалительный эффект. У взрослых же преобладают штаммы *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, которые поддерживают Th2-иммунному ответу [23]. Именно поэтому профилактика ожирения возможна путем использования штаммов *Bifidobacterium* характерных для детей.

В течении взросления ребенка соотношение основных типов микроорганизмов в его кишечнике изменяется с положительным результатом для *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Исходя из имеющихся результатов современных исследований, есть поводы считать, что от соотношения *Bacteroidetes* и *Firmicutes* имеют зависимость от метаболизма. Полученные результаты на животных, говорят, что при ожирении значительно снижается содержание *Bacteroidetes* и повышается содержание *Firmicutes* [24].

1.4. Факторы, способствующие формированию кишечной микробиоты

Такие вещества как олигосахариды, лактоза, короткоцепочечные кислоты, β -лактоальбумин и нуклеотиды создают условия для нормального развития микробиоты кишечника у грудных детей [16].

Но так же, нужно понимать, что существует много факторов, которые могут вызвать нарушения в формировании микробиоты. К таким факторам можно отнести наличие хронических инфекций у матери ребенка, использование антибиотиков во время беременности, что приводит к нарушению микробиоценоза родовых путей. Так же при родах путем кесарева сечения, недоношенности, несвоевременном прикладыванию к груди и искусственном вскармливании формирование нормальной микробиоты ребенка может быть нарушена [10].

Например, у детей, находящихся на искусственном вскармливании, чаще выявляются *B. longum*, характерные для "взрослого" микробиоценоза, а также условно-патогенные микроорганизмы, такие как энтерококки, энтеробактерии и клостридии. Многочисленные исследования показали нарушение формирования нормального микробиоценоза кишечника у недоношенных детей. Исследование, проведенное в отделении для недоношенных детей Научного центра здоровья детей в Москве, было зарегистрировано сочетание многих факторов риска, приводящих к нарушению формирования микробиоты кишечника. Из 25 недоношенных детей в возрасте менее года 11 родились путем кесарева сечения, 18 находились на смешанном 7 - на искусственном вскармливании. Каждый третий ребенок получал лечение в отделении реанимации новорожденных, а остальные - в отделении второго этапа выхаживания. Все дети получали антибактериальную терапию. При помощи метода микробиологического исследования в возрасте 7 суток жизни *Bifidobacterium* были обнаружены у каждого четвертого ребенка, *Lactobacillus* - у каждого третьего [28].

1.5. Специфика состава микробиоты кишечника у детей с метаболическим синдромом

В период с 2016 по 2017 год было проведено крупное популяционное исследование "Микробиота кишечника и масса тела у детей школьного возраста: когортное исследование KOALA", целью которого было изучение состава микробиоты кишечника у детей школьного возраста в сочетании с избыточным весом. Было обнаружено, что как новые, так и ранее идентифицированные бактериальные группы связаны с избыточным весом. Результаты показали, что *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella oralis*, *Dialister* составили четверть изменений в составе микробиоты. *Streptococcus bovis* был положительно связан с избыточным весом. Микробное разнообразие, а также отношение *Bacteroidetes* к *Firmicutes* не были статистически значимо связаны ни с одним из результатов [28].

В другом исследовании кишечной микробиоты, была отмечена положительная корреляция *B. fragilis* и *Lactobacillus* с избыточной массой тела и отрицательная корреляция с *Bifidobacterium*. В исследовании, проведенном у китайских детей и подростков с ожирением, отмечалось увеличение *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в процессе снижения веса. Х. Chen в своем исследовании с использованием секвенирования гена 16S рНК показало уменьшение разнообразия кишечной микробиоты с увеличением массы тела. Группа с нормальной массой тела имела более высокую численность и биоразнообразие, чем группа с ожирением. Что касается типов, то микробиота кишечника в группе с ожирением имела более низкие пропорции *Bacteroidetes*. На уровне рода *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Megamonas* и *Haemophilus* были заметно более многочисленными в группе с ожирением. Кишечная микробиота детей в группе с ожирением имела более низкие пропорции *Oscillospira* и *Dialister* по сравнению с группой с нормальной массой тела [30].

Исследование Н. Zhong, приумножило наши знания о развитии кишечной микробиоты у детей старшего возраста. Было еще раз доказано,

что образ жизни детей влияет на состав микрофлоры и метаболическую регуляцию в школьном возрасте. Была проанализирована микробиота кишечника у взрослых и 250 детей школьного возраста и определено три энтеротипа, в которых преобладали роды *Bacteroides*, *Prevotella* и *Bifidobacterium*. Было снова доказано, что продолжительность грудного вскармливания и диетический образ жизни взаимосвязаны с составом и микробиоты кишечника у детей в школьном возрасте. Связь между дошкольными диетами и метаболическими фенотипами обнаружила значимую зависимость от энтеротипа. Только у лиц с энтеротипами *Bacteroides* и *Prevotella* наблюдалась обратная взаимосвязь между высоким потреблением клетчатки и низким уровнем инсулина в плазме. В то время как, у лиц с энтеротипом *Bifidobacterium* кишечная микробиота демонстрировала общее более низкое богатство микробных генов, функциональный потенциал для сложной ферментации углеводов, а также производства бутирата и сукцината. Высокое общее потребление жира и повышенные уровни свободных жирных кислот в плазме энтеротипа *Bifidobacterium* связаны с одновременным появлением *Streptococcus* [31].

Из этих данных можно сделать вывод, что существуют специфические связи между метаболическим состоянием и питанием. Это доказывает важность анализа микробиоты при изучении метаболического синдрома.

Много работ по изучению метаболического синдрома проводятся в странах Латинской Америки, где стоит острая проблема ожирения. Результаты исследования семей с низким уровнем дохода свидетельствуют о том, что в группах детей с недостаточным питанием и ожирением – более низкое бактериальное богатство и разнообразие, чем в группах с нормальным весом. Плохо питающиеся дети имели большее содержание бактерий типа *Firmicutes* и в частности семейства *Lachnospiraceae*, чем дети с ожирением, в то время как тип *Proteobacteria* был чрезмерно представлен в группе детей с ожирением. Уровень *Lachnospiraceae* отрицательно взаимосвязан с потреблением энергии и положительно с уровнем лептина в сыворотке

крови. Анализ выявил четкие таксономические профили для недоедающих и тучных детей [32].

Исследование А. Riva, проведенное на группе детей в возрасте 5-15 лет, показало, что детское ожирение связано с измененной микробиотой кишечника, характеризующейся повышенным уровнем *Firmicutes* и низким уровнем *Bacteroidetes*. Корреляционный анализ показал, что кишечная микробиота детей с ожирением также имеет повышенную плотность корреляции и кластеризацию операционных таксономических единиц (ОТЕ). Представители типа *Bacteroidetes* были в целом лучшими предикторами z-показателя избыточной массы тела и ожирения, чем *Firmicutes*, что, вероятно, связано с противоречивыми ответами ОТЕ *Firmicutes*. Основные метаболиты, вырабатываемые кишечными бактериями, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), были более высокой концентрации у детей с ожирением, что свидетельствует о повышенном использовании субстрата. Таким образом, нарушение кишечной микробиоты и повышенная активность ферментации могут быть связаны с этиологией детского ожирения, а именно, с усилением тесной связи между микробиотой, КЦЖК и ожирением [33].

Дальнейший мета-анализ показал, что единственным биомаркером, который в целом можно связать с ожирением, было разнообразие бактериальных видов. Однако всех страдающих ожирением лиц нельзя отнести к какому-то определенному паттерну дисбиоза, в первую очередь, из-за высокой вариабельности микробиоты у разных людей и сложности метаболических фенотипов (ожирение с другими осложнениями и без них).

В конце прошлого века было проведено исследование, в котором охарактеризовали микробиоту кала 60 детей в исследовании в течение четырехлетнего периода. Все дети имели нормальный вес в начале этого исследования, но 36 из них набрали избыточный вес в динамике. Данные анализировали вместе с информацией о диете хозяев, физической активности и параметрах воспаления. Части кишечной микробиоты были разделены на отдельные группы, различающиеся маркерами воспаления и пищевыми

привычками независимо от возраста, пола и массы тела. Полученные данные показали, что снижение разнообразия видового состава бактерий связанное с нездоровым питанием, обеспечивает факторы, которые способствуют росту *Proteobacteria* и набору лишнего веса в дальнейшем(35).

1.6. Повреждение барьерной функции кишечника у людей с ожирением

Микробиота кишечника играет важную роль в регуляции метаболизма и тесно взаимодействует с эпителиальными клетками кишечника. Гистондеацетилаза 3 (HDAC3) в эпителиальных клетках кишечника (ЭКК) интегрирует сигналы, полученные от микробиоты, для поддержания гомеостаза кишечника. Проведённые исследования на мышах показало, что HDAC3 способствует развитию ожирения, вызванного диетой, а бутират снижает активность HDAC3 в ЭКК для предотвращения ожирения (Schroeder et al., 2018).

Несбалансированное питание, может нарушать барьерную функцию слизистой оболочки кишечника, что способствует переселению бактериальных компонентов, например липополисахарид (ЛПС) и пептидогликан. Нарушение слизистого барьера кишечника вызвано местным воспалением, которому способствовало нерациональное питание, а также сопутствующими нарушениями в слизистом слое [20].

Метаболическая эндотоксемия так же способна вызывать ожирение, и связана с повышенным индексом массы тела, питанием с высоким содержанием жира и риском возникновения сахарного диабета 2-го типа у людей. Этому может способствовать чрезмерное разрастание грамотрицательных бактерий, которые являются источником ЛПС при высокожировом питании. Так же из-за активации врожденного иммунитета в кишечнике и за его пределами которому способствуют ЛПС, может вызвать накопление воспалительных клеток [37].

Высокожировая диета (ВЖД) может также повышать уровень пептидогликанов в крови. В зависимости от своего типа пептидогликаны

могут действовать как лиганды Nod1 провоспалительных макрофагов жировой ткани или печени, что вызывает резистентность к инсулину, в то время как в бета-клетках поджелудочной железы возникают противоположные эффекты, возможно, по механизмам обратной связи [38].

1.7. Изменения в регуляции иммунных клеток кишечника у людей с ожирением

При ожирении нарушение иммунного гомеостаза испытывают все метаболические органы, кишечник, печень и жировая ткань. При ожирении врожденные и адаптивные популяции иммунных клеток обретают провоспалительный эффект. Этот эффект проявляется в увеличении цитокинов и макрофагов. Одновременно с этим происходит уменьшение доли Т-хелперов 17 типа и Т-хелперы 22 типа, которые вырабатывают интерлейкин-22(IL-22), участвующие в регенерации тканей, защите, поддержания целостности кишечного барьера [11, 40]. Интерлейкин-22 поддерживает иммунитет слизистой оболочки, и играет роль в прибавки веса и гомеостазе глюкозы. Положительный эффект IL-22 заключается в изменении проницаемости кишечника, уменьшении концентрации ЛПС в сыворотке, а так же улучшает метаболизм в жировой ткани. Из этого можно предположить, что IL-22 играет большую роль в регуляции метаболического синдрома.

У.С. Orbe-Orihuela в своем исследовании впервые показал, что у детей с метаболическим синдромом была высокая распространённость *Firmicutes*, что взаимосвязано с повышением уровня тумор-некротического фактора- α [41].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Для проведения сравнительного анализа микробиоты кишечника были сформированы две группы детей. Первая группа включала здоровых детей в возрасте от 8 до 14 лет без клинических проявлений метаболического синдрома. Вторая группа состояла из детей того же возраста с подтвержденным диагнозом метаболического синдрома.

2.2. Материалы и составы сред

Клинический материал для исследования – кал, полученный у здоровых детей и детей с метаболическим синдромом в возрасте от 8 до 14 лет, предоставленный Лабораторией Микробиома человека.

Материал исследования был рассеян на разные питательные среды: «Питательная среда №2 ГРМ (САБУРО)», «Bifidobacterium Agar», «Питательная среда для выделения стафилококков сухая (Солевой агар-М)», «Питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл сухая (Бактоагар Плоскирева)», «Питательная среда с эозин-метиленовым синим сухая (среда Левина-ГРМ)», «Питательная среда для выделения и культивирования бифидобактерий сухая(Бифидум-среда)», «Питательная среда для контроля стерильности сухая (Тиогликолевая среда)», «Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо)», «Питательная среда для культивирования микроорганизмов сухой (ГМ-Ф-АГАР)», «Бульон MRS для лактобактерий».

2.2.1. Приготовление среды Эндо

Состав среды Эндо в г/л:

Питательный агар сухой.....	26,5;
ЭКДА.....	1,22;
Фуксин основной.....	0,23;
Сахар молочный	10,7;
Динатрия фосфат	0,48;
Натрия сульфат безводный	0,83;
Натрия карбонат.....	0,03;

Способ приготовления:

«Агар Эндо» в количестве 20 г тщательно размешивают в 500 мл воды дистиллированной, кипятят 3 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и снова доводят до кипения. Среду охлаждают до температуры 45–50 °С, перемешивают и, соблюдая правила асептики, разливают в стерильные чашки Петри слоем 3–4 мм. После застывания среды чашки подсушивают при температуре 37 °С в течение 40–60 мин. Готовая среда в чашках Петри - прозрачная, розового цвета. Готовую среду используют в день приготовления, хранят до посева в защищенном от света месте. (Рисунок 1)



Рисунок 1. Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо)

2.2.2. Приготовление среды MRS

Состав среды в г/л:

Протеозопептон.....	10,00;
Мясной экстракт.....	10,00;
Дрожжевой экстракт.....	5,00;
Глюкоза (безводная).....	20,00;
Твин-80.....	1,00;
Аммония цитрат.....	2,00;
Натрия ацетат.....	5,00;
Магния сульфат.....	0,10;
Марганца сульфат.....	0,05;
Калия гидрофосфат.....	2,00;

Способ приготовления:

Смешать 55,15 г среды в 1000 мл дистиллированной воды. Нагрейте до кипения для растворения компонентов среды полностью. Стерилизуйте автоклавированием при 1,1 атмосфере (121°C) в течение 15 минут. Охладите до 45–50 °С, тщательно перемешайте и разлейте в стерильные чашки Петри (рисунок 2).



Рисунок 2. Питательная среда Lactobacillus MRS Broth

2.2.3. Приготовление среды ГМ-Ф-АГАР

Состав среды в г/л:

Пептон мясной.....	15,0;
Натрий хлористый.....	8,0;
Агар бактериологический.....	10,0 +-3,0;

Способ приготовления:

18 г ГМФ-агара размешивают в 500мл дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стеклянные флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут. Среду охлаждают до температуры 48°С, разливают в стерильные чашки Петри слоем 4–5 мм. После застывания среды, соблюдая правила антисептики, чашки подсушивают при температуре 37°С в течение 40–60 минут. В таком виде ГМФ-агар можно использовать в течение 7 суток при температуре хранения от 2 до 8°С (рисунок 3).

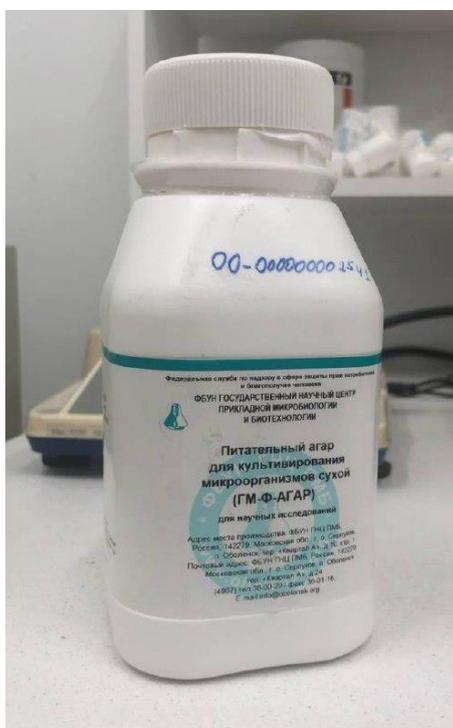


Рисунок 3. Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГМ-Ф- АГАР)

2.2.4. Приготовление среды №2 ГРМ (САБУРО)

Состав среды в г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки.....	10,0
Панкреатический гидролизат казеина.....	10,0
Дрожжевой экстракт.....	2,0
Натрия фосфат однозамещенный.....	2,0
Д-глюкоза.....	40,0
Агар.....	10,0±3,0

Способ приготовления:

37,0 г среды размешать в 500 мл дистиллированной воды. кипятить 2 мин до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Среду охладить до температуры 45-50°C, разлить в стерильные чашки Петри и после застывания подсушить в течение 40+-5 минут. Для придания среде селективных свойств в качестве ингибитора роста большинства сопутствующих бактерий рекомендуется применять 2 % раствор теллурита калия (2,5 мл на 500 мл готовой среды охлажденной до температуры 45-50°C) или антибиотики (рисунок 4).

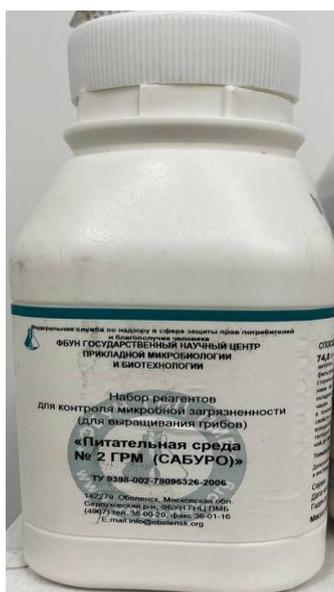


Рисунок 4. Питательная среда №2 ГРМ (САБУРО)

2.2.5. Приготовление среды Bifidobacterium Agar

Состав среды в г/л:

Основа из колумбийского агара.....	42,5
Глюкоза 2,5 г Лактулоза.....	2,5
Гидрохлорид цистеина.....	0,5
Рибофлавин.....	0,01 г
Пропионовая кислота.....	5,0

Приготовление среды:

25,0 г порошка тщательно размешивают в 500 мл воды дистиллированной, кипятят в течение 1 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара, при необходимости фильтруют, разливают по 9,0 мл в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 112 С в течение 30 мин (рисунок 5).

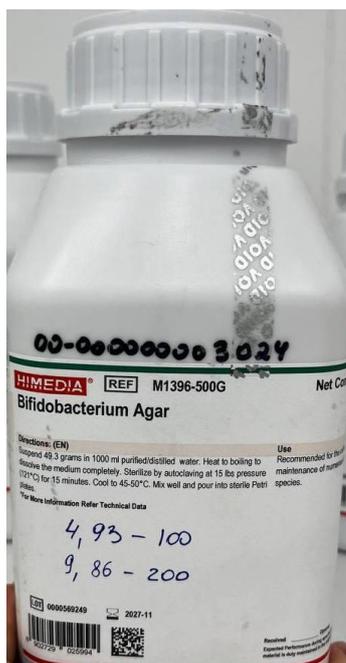


Рисунок 5. Питательная среда Bifidobacterium Agar

2.2.6. Приготовление среды Солевой агар-М

Состав среды в г/л:

Питательный агар для культивирования сухой.....	35,0+1,8
Натрия хлорид.....	75
Натрий углекислый.....	0,15
Динатрий фосфат.....	0,5

Способ приготовления:

27,0 г набора реагентов размешивают в 250 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят 2-3 мин до полного расплавления агара. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при температуре $(121\pm 2)^\circ\text{C}$. Среду охлаждают до температуры $45-50^\circ\text{C}$, разливают в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм. После застывания среды в чашках ее подсушивают, соблюдая правила асептики, при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 40-60 мин. Готовая среда в чашках Петри светло-желтого цвета. Готовую среду можно использовать в течение 10 суток при условии хранения ее при температуре от 2 до 8°C (рисунок 6).



Рисунок 6. Питательная среда для выделения стафилококков сухая (Солевой агар-М)

2.2.7. Приготовление среды Бактоагар Плоскирева

Состав среды в г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки с тиосульфатом и цитратом натрия	14,5 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	2,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
α -Д-лактоза	10,0 г
Желчь очищенная сухая.....	7,0 г
Натрий хлористый.....	1,0 г
Йод кристаллический.....	0,04 г
Нейтральный красный.....	0,04 г
Бриллиантовый зеленый.....	0,00033 г
Агар микробиологический.....	9,0 \pm 2,0 г

Способ приготовления:

11,0 г питательной среды размешать в 200мл дистиллированной воды, кипятить 2 минуты, периодически помешивая, до полного растворения агара. Среду охладить до температуры 45-50°C, разлить в чашки Петри слоем 5-6 мм и подсушить с открытыми крышками в течении 1,5 часа при температуре 18-25°C (рисунок 7).

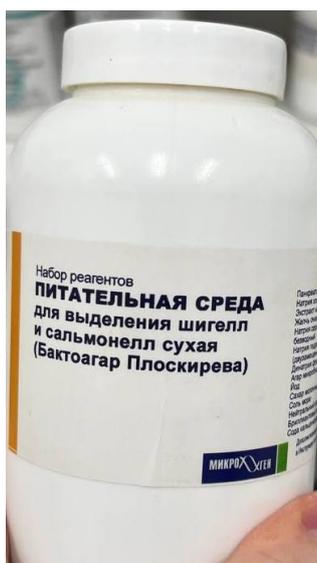


Рисунок 7. Питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл сухая (Бактоагар Плоскирева)

2.2.8. Приготовление среды среда Левина-ГРМ

Состав среды в г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки.....	12,0
Экстракт пекарных дрожжей импортный.....	1,0
Д-(+)-лактоза.....	10,0
Натрия гидрофосфат.....	0,7
Натрия хлорид.....	4,2
Эозин-Н.....	0,4
Метиленовый синий.....	0,065
Агар.....	9,0+_3,0

Способ приготовления:

37,2 г среды тщательно размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить в течение 3 мин, фильтровать через ватно-марлевый фильтр и автоклавировать при температуре 110°C в течение 20 мин. Стерильную среду охладить до температуры 45-50 °С, разлить в стерильные чашки Петри слоем 5 - 6 мм, после застывания подсушить при температуре 37°C в течение 40-60 мин (рисунок 8).

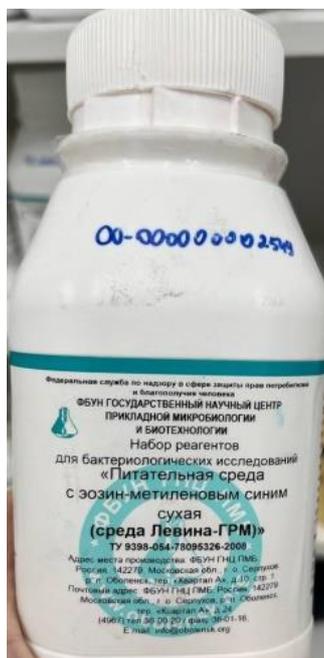


Рисунок 8. Питательная среда с эозин-метиленовым синим сухая (среда Левина-ГРМ)

2.2.9. Приготовление среды Бифидум-среда

Состав среды в г/л:

Питательный бульон сухой.....	30,0
Д(+)- глюкоза.....	20,0
Экстракт кормовых дрожжей.....	5,0
Агар микробиологический.....	1,5
Натрий лимоннокислый трехзамещенный.....	1,0
Железо сернокислое 7-водное.....	0,15
Цистеин.....	0,5
Сода кальцинированная.....	0,77

Способ приготовления:

12,5 г среды тщательно размешать в 250 мл дистиллированной воды, кипятить не более 2 мин до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные пробирки по 9 мл. Среду автоклавировать при температуре 110 °С в течение 20 мин (рисунок 9).



Рисунок 9. Питательная среда для выделения и культивирования бифидобактерий сухая (Бифидум-среда)

2.2.10. Приготовление среды Тиогликолевая среда

Состав среды в г/л:

Панкреатический гидролизат казеина.....	15,0
Дрожжевой экстракт.....	5,0
Натрия хлорид.....	2,5
Д-глюкоза.....	5,0
Натрия тиогликолят.....	0,5
Натрий углекислый.....	0,8+-0,2
Цистеина гидрохлорид.....	0,75
Агар.....	0,75

Способ приготовления:

15,5 г препарата размешать в 500 мл дистиллированной воды. кипятить в течение 2 мин, профильтровать через бумажный фильтр, разлить по 10 мл в стерильные пробирки и стерилизовать автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин (рисунок 10).

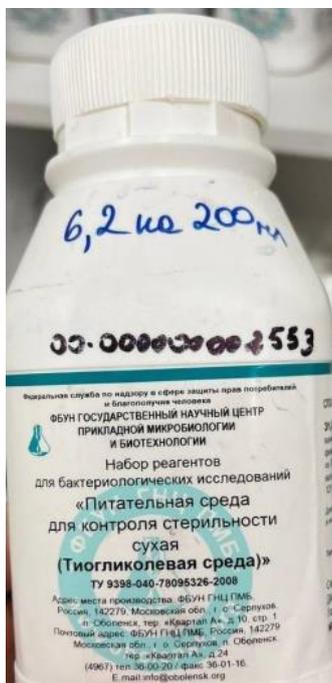


Рисунок 10. Питательная среда для контроля стерильности сухая (Тиогликолевая среда)

2.3. Посев биоматериала

В качестве биоматериала был использован кал, полученный от двух групп детей: Детей с подтверждённым метаболическим синдромом и здоровых детей.

В ходе исследования был использован метод посева с разведением. Данный метод является широко используемым микробиологическим методом для определения количества живых микроорганизмов в образце. Он основан на последовательном разведении образца и высевании микроорганизмов на питательные среды.

Этапы метода посева с разведением:

Подготовка стерильных пробирок: для проведения метода посева с разведением необходимо подготовить стерильные пробирки, которые будут использоваться для разведения образца. Стерилизация производилась при 180 °С в течение 90 минут. В каждую пробирку, которая будет использована в разведении мы добавляем по 9 мл тиогликолевой среды, в нашем разведении было использовано 11 пробирок, в которые мы добавляли среду и еще одна пробирка в которой находился биоматериал.

Разведение образца: Берем 1 грамм кала, разводим с тиогликолевой средой, в каждую последующую пробирку переносим по 1 мл, из последний скидываем 1 мл.

Посев материала: после разведения образца необходимо посеять микроорганизмы на питательные среды. Для этого используют стерильные петли, шпатели или автоматические посевные машины. Высевание производится на несколько чашек Петри с различными концентрациями разведения образца.

Инкубация: после высевания микроорганизмов на питательные среды необходимо инкубировать чашки Петри при оптимальной температуре и влажности для роста микроорганизмов. Срок инкубации зависит от типа микроорганизмов, которые ожидаются в образце.

Подсчет колоний: после инкубации необходимо подсчитать количество колоний, образованных на питательной среде.

Метод посева с разведением является простым и надежным методом для определения количества живых микроорганизмов в образце. Однако, он имеет определенные ограничения, связанные с необходимостью использовать питательные среды, которые могут не обеспечивать рост всех микроорганизмов, присутствующих в образце, и невозможностью определить видовой состав микроорганизмов.

В исследовании было использовано десятикратное разведение, в исследуемый материал добавлялась тиогликолевая среда, проводилось разведение в 11 пробирок с тиогликолевой средой. Из пробирки с концентрацией 10^{-11} производился посев в пробирку со средой бифидум 10^{-11} , с концентрацией 10^{-9} в две пробирки со средой бифидум 10^{-9} , с концентрацией 10^{-7} в две пробирки со средой бифидум 10^{-7} и чашку Петри со средой MRS, с концентрацией 10^{-6} на среды Эндо и Кровяной агар, с концентрацией 10^{-5} на среды ЖСА и Сабуро, и из пробирки с концентрацией 10^{-3} производился посев на среды Плоскирева, Энтерококковую среду и из пробирки с исследуемым образцом производим посев на среды Плоскирева и Левина.

Вносят каплю инокулируемого материала, и стерильным шпателем производится его втирание в поверхность питательной среды. Использование данного метода позволяет получить сплошной рост на поверхности среды в чашке.

После инокуляции образцы с микроорганизмами инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение необходимого времени (обычно 24 часа).

2.4. Идентификация микроорганизмов, выросших на питательных средах

2.4.1. Окраска по Граму

Метод окраски бактерий, известный как окрашивание по Граму, позволяет классифицировать прокариотические микроорганизмы на две группы: грамположительные и грамотрицательные бактерии. Это разделение основано на различиях в строении клеточной стенки этих микроорганизмов. Метод был впервые предложен датским ученым Х. Грамом в 1884 году. К грамотрицательным бактериям относятся такие микроорганизмы, как кишечная палочка, сальмонелла, бруцелла, возбудители дизентерии и холеры, а также уксуснокислые бактерии.

Основная идея метода окрашивания бактерий по Граму заключается в различной способности микроорганизмов удерживать в своих клетках красители трифенилметанового ряда, такие как кристаллический фиолетовый или генциановый фиолетовый. Это различие в способности к окрашиванию объясняется различиями в химическом составе и строении клеточной стенки бактерий.

Согласно этому признаку, все бактерии делятся на две группы:

Грамположительные бактерии, которые способны к окрашиванию по Граму.

Грамотрицательные бактерии, которые не способны к окрашиванию по Граму.

Окраска состоит из следующих этапов:

1. На фиксированный мазок нанести раствор генцианвиолета на 1–2 минуты, краситель слить.
2. Нанести раствор Люголя на 1–2 минуты, краситель слить.
3. Нанести спирт на 30-60 секунд, и промыть препарат водой.
4. Докрасить раствором фуксина в течение 1-2 минут, промыть водой, высушить и микроскопировать.

2.4.2. MALDI-TOF Mass Spectrometry

Использование стандартизированных методик MALDI-TOF MS позволяет точно идентифицировать до вида большинство клинически значимых бактерий.

Масс-спектрометр MALDI-TOF включает в себя три основные функциональных компонента: лазер, который обеспечивает десорбцию и ионизацию; анализатор масс, разделяющий ионы в вакууме в соответствии с их массово-зарядным отношением; и детектор, предназначенный для регистрации разделенных ионов.

В клинической микробиологии применение MALDI-анализа подразумевает смешивание образцов культур микроорганизмов с матрицей, способной к оптическому поглощению в диапазоне используемых длин волн. Состав матрицы может варьироваться в зависимости от типа анализируемых биомолекул и применяемого лазера. Наиболее распространенные матрицы включают α -циано-4-гидроксикоричную кислоту и 2,4-гидрокси-фенилбензойную кислоту; при этом α -циано-4-гидроксикоричная кислота проявляет высокую эффективность при детекции белковых биомаркеров, в то время как 2,4-гидрокси-фенилбензойная кислота преимущественна при обнаружении гликопептидов и гликопротеинов.

Процесс использования MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологической лаборатории можно проиллюстрировать на примере анализа рабочего протокола. Выбранная для идентификации колония с чашки первичного посева переносится целиком или частично на участок пластины масс-спектрометра, изготовленной обычно из нержавеющей стали (рисунок 11).



Рисунок 11. Перенос микроорганизмов на планшет-мишень

После переноса микроорганизма на пластину наносится 1,5 мкл. матрицы, после чего пластинку полностью высушивают. Идентификация микроорганизмов, контроль загрязнения и калибровка осуществляются на отдельных участках пластины. Затем пластина размещается в камере масс-спектрометра MALDI-TOF (рисунок 12).



Рисунок 12. Планшет-мишень

После проведения калибровки аппарата процесс становится автоматизированным. С помощью программного обеспечения определяется

степень совпадения спектра тестируемого штамма с известными спектрами, хранящимися в базе данных системы. В результате микробиолог получает информацию о видовой идентификации исследуемого микроорганизма, выраженную в баллах или процентах, что отражает достоверность проведенной идентификации (рисунок 13).

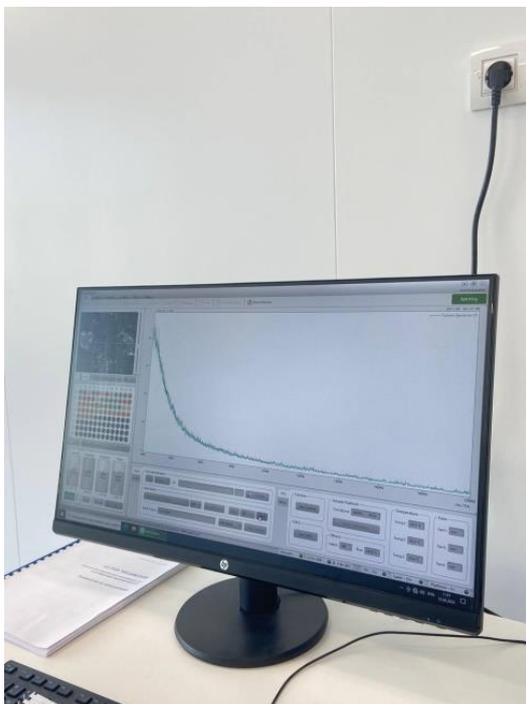


Рисунок. 13. Отображение результатов

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Исследование микробиоты детей

Для проведения исследования были получены образцы кала здоровых детей и детей с метаболическим синдромом. Далее высевали образцы на разные питательные среды и культивировали. Выросшие колонии окрашивали по Граму и использовали Mass-спектрометрию для определения видового состава, к каким группам микроорганизмов относятся, выросшие бактерии (рисунок 1).

Схема исследования



Рисунок 1. Последовательная схема исследования

3.2. Анализ полученных данных и сравнение результатов

Как и предполагалось, в нашем исследовании показано, что у группы здоровых детей было выделено больше всего различных родов (рисунок 2). Чаще всего встречались представители рода *Staphylococcus spp.* (26%) и *Lactobacillus spp.* (19%). По масс-спектрическим данным *Staphylococcus spp.* был представлен видами *S. Hominis*, *S. Haemolyticus*, *S. Epidermidis* и *S. capitis*. Данный род встречался у 100% испытуемых. Также обнаруживались бактерии из рода *Bacillus*, определенные у некоторых испытуемых до вида как *B. pumilus* и *B. cereus*.

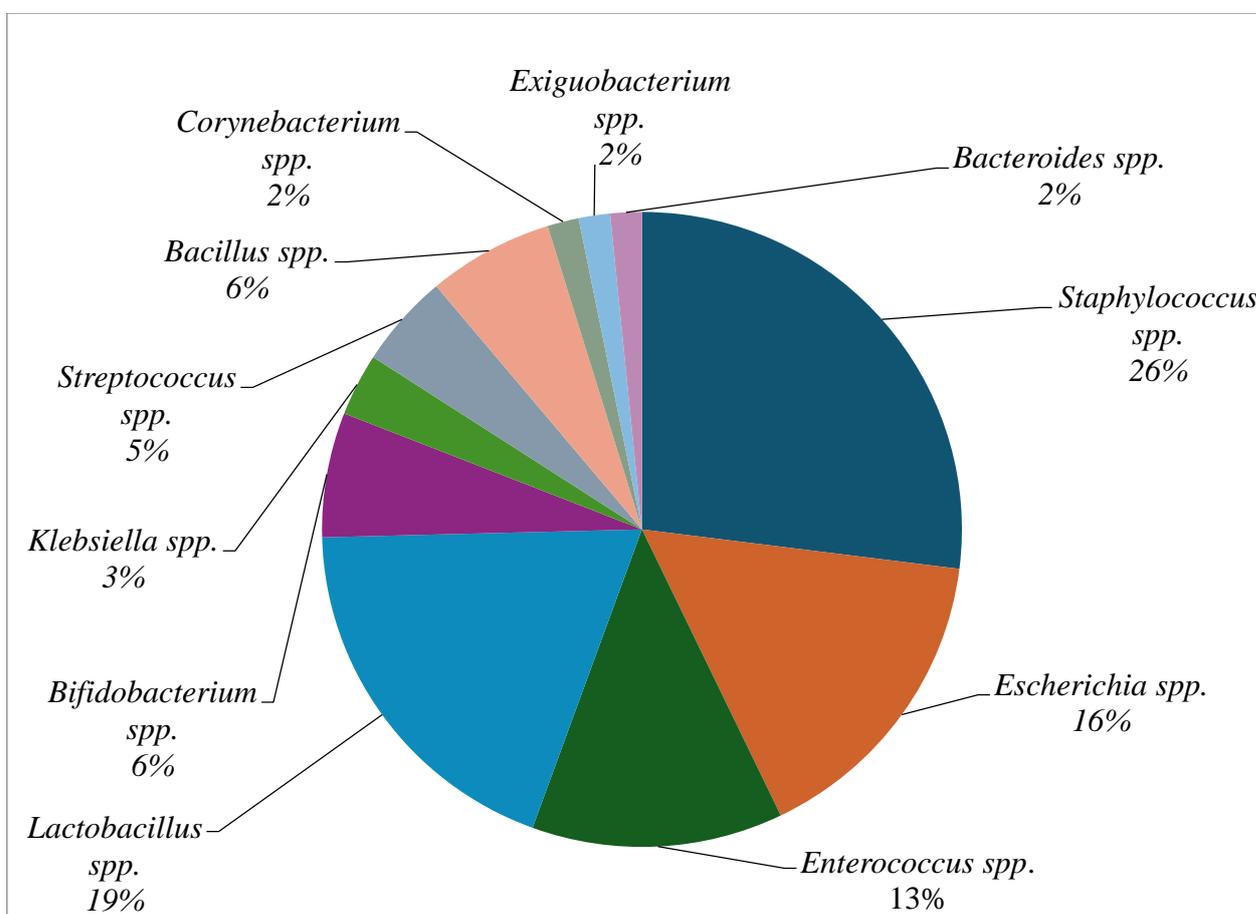


Рисунок 2. Родовой состав микроорганизмов, выросших у группы здоровых детей

У группы здоровых детей бактерии вида *Staphylococcus hominis* и *Staphylococcus haemolyticus* встречались в 6 случаях, что составило по 10%

встречаемости, *Lactobacillus plantarum* были обнаружены 5 раз, (по 8%). *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* по 4 раза (по 6%), в 3 анализах наблюдались бактерии вида *Staphylococcus epidermidis* (5%), бактерии видов *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Bacillus cereus* имели по два случая обнаружения (по 3%). Так же по одному разу (по 2%) были обнаружены бактерии видов *Corynebacterium afermentans*, *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus ruminis*, *Streptococcus vestibularis*, *Bacteroides intestinalis*, *Streptococcus gallolyticus* (рисунок 3).

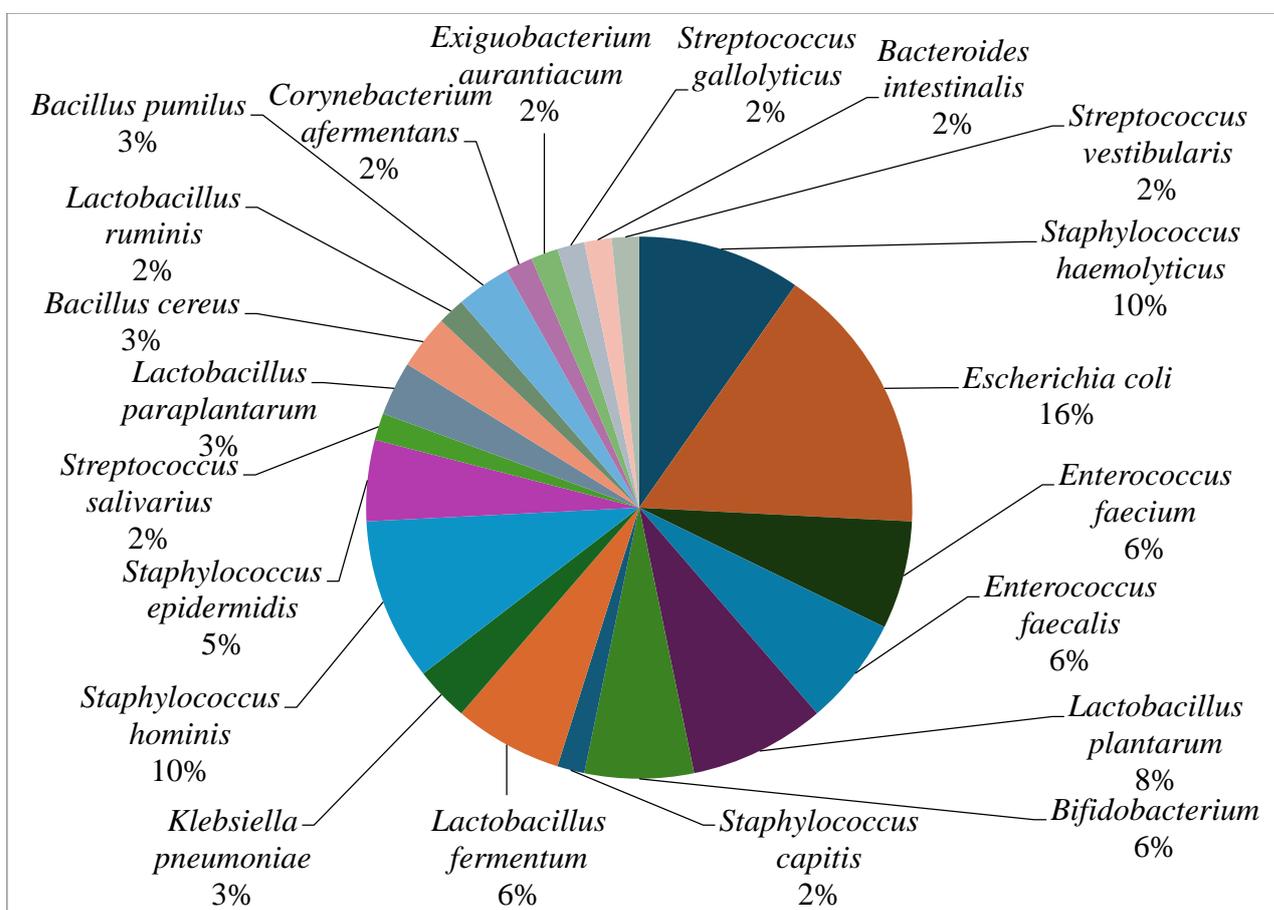


Рисунок 3. Видовой состав микроорганизмов, выросших у группы здоровых детей

При исследовании группы детей с метаболическим синдромом, было выявлено значительно меньшее разнообразие бактерий в кишечнике. В

данной группе наиболее часто встречающимися были представители рода *Staphylococcus spp.* (34%) и *Escherichia spp.* (26%) (рисунок 4).

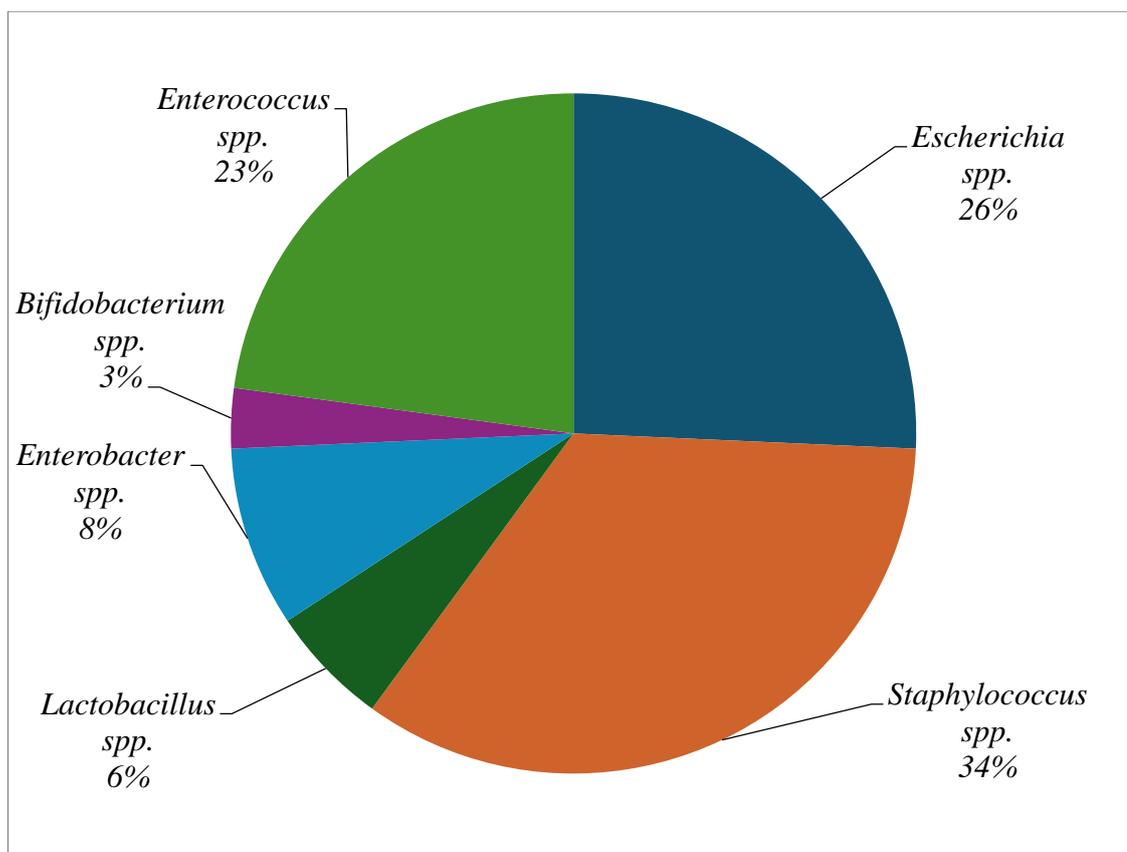


Рисунок 4. Родовой состав микроорганизмов, выросших у группы детей с метаболическим синдромом

По масс-спектрическим данным было идентифицировано бактерии вида *Escherichia coli* в 9 случаях, что составило 26% встречаемости, *Staphylococcus haemolyticus* был обнаружен в 6 случаях (17%). *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* встречались по 4 раза (по 11%), *Enterobacter cloacae* и *Staphylococcus epidermidis* обнаружены по 3 раза, что равняется 8% встречаемости. Бактерии вида *Lactobacillus fermentum* встретились в посевах 2 биоматериалов (6%) . Единичные случаи встречаемости были у видов *Staphylococcus hominis*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus gallolyticus* (по 3%) (рисунок 5).

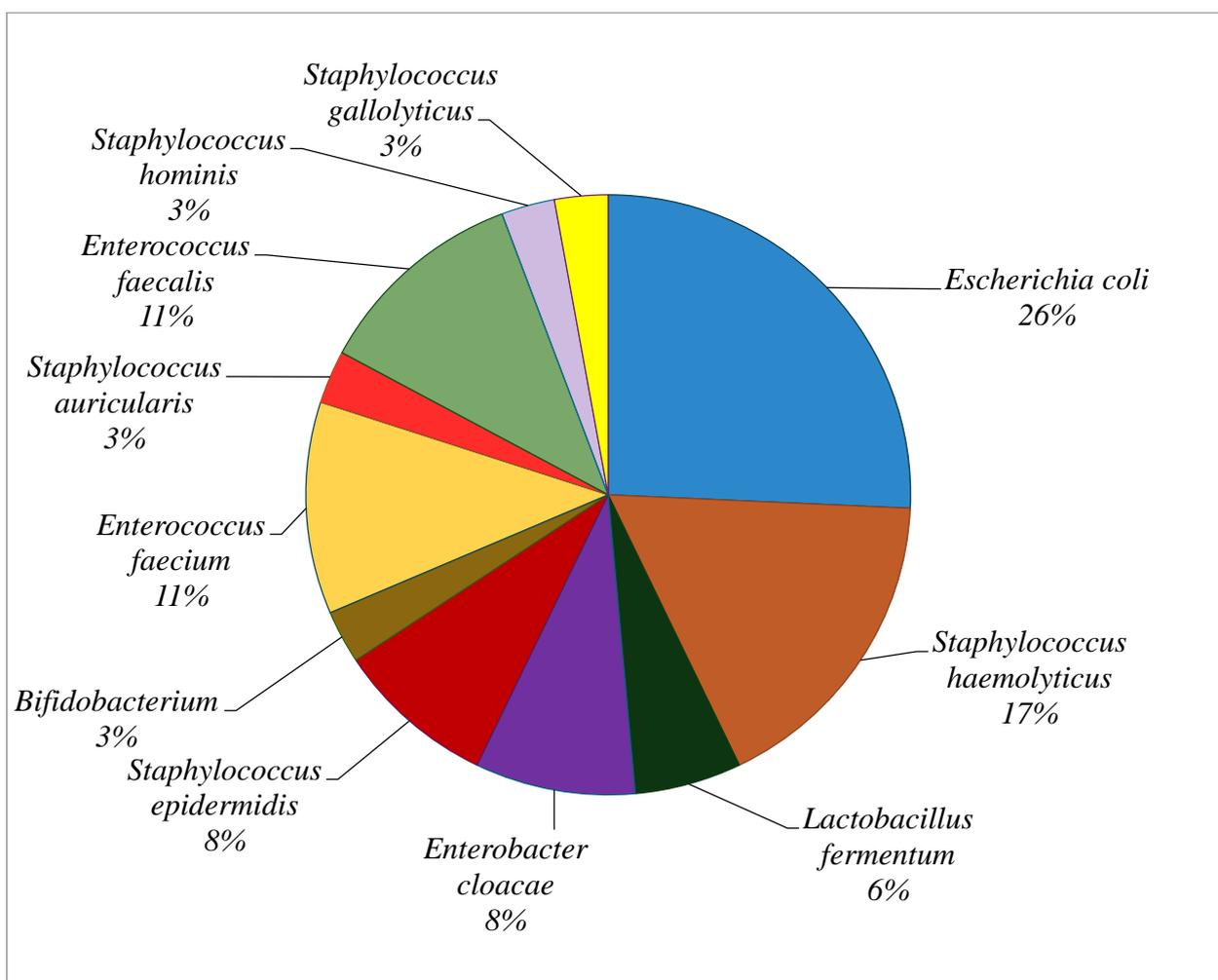


Рисунок 5. Видовой состав микроорганизмов, выросших у группы детей с метаболическим синдромом

При сравнении полученных результатов здоровых детей и детей с метаболическим синдромом мы можем увидеть значительное различие в видовом составе кишечной микробиоты. Так, например, в группе здоровых детей были обнаружены роды *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bacteroides spp.*, и *Exiguobacterium spp.* которых не было обнаружено у детей с метаболическим синдромом. Так же представители рода *Staphylococcus spp.*, тоже отличаются в разнообразии видового состава. У больных детей заметно преобладание типа *Firmicutes*, а именно таких родов как, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* и *Lactobacillus spp.* и значительное снижение типа *Bacteroidetes* в случае с нашими результатами практически полное отсутствие. Это приводит к тому, что у больных детей преобладают бактерии способствующие распаду

кишечного барьера и повышение липополисахаридов, что положительно влияет на развитие метаболического синдрома. Из этого можно сделать вывод, что развитие метаболического синдрома связана с составом микробиоты кишечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования была проведена сравнительная характеристика микробиоты кишечника здоровых детей и детей с метаболическим синдромом. Результаты исследования показали, что микробиота кишечника детей с метаболическим синдромом значительно отличается от микробиоты кишечника здоровых детей.

Было выявлено, что у детей с метаболическим синдромом наблюдается значительное снижение разнообразия микробиоты кишечника, увеличение количества бактерий, продуцирующих липополисахариды, и бактерий, способствующих распаду желудочно-кишечного барьера. Эти нарушения микробиоты кишечника могут способствовать развитию и прогрессированию метаболического синдрома у детей.

Таким образом, результаты исследования подтверждают важность изучения микробиоты кишечника при диагностике и лечении метаболического синдрома у детей. Для предотвращения и лечения метаболического синдрома у детей необходимо обращать особое внимание на состояние микробиоты кишечника и применять комплексные подходы, включающие нормализацию питания и образа жизни, а также коррекцию микробиоты кишечника.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен, что видовой состав микробиоты кишечника детей с метаболическим синдромом значительно отличается от микробиоты кишечника здоровых детей.
2. У детей с метаболическим синдромом наблюдается значительное увеличение количества бактерий, продуцирующих липополисахариды, и бактерий, способствующих распаду желудочно-кишечного барьера. А именно *Staphylococcus spp.* 34%, *Escherichia spp.* 26%, *Enterococcus spp.* 23%, в то время как у здоровых частота встречаемости данных родов была равна *Staphylococcus spp.* 26 %, *Escherichia spp.* 16%, *Enterococcus spp.* 13%.
3. Нарушения микробиоты кишечника могут способствовать развитию и прогрессированию метаболического синдрома у детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова, И. Н. Метаболический синдром и неалкогольная жировая болезнь печени у детей / И. Н. Захарова, Л. А. Звенигородская, С.В. Яблочкова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – С.44-48.
2. Гурова, М.М. Микробиом человека — клинические аспекты формирования, новые механизмы взаимодействия и подходы к поддержанию здоровья. / М.М. Гурова // М. – 2016. – С.49-54.
3. Зверев, В. В. Микробиота кишечника и ее связь с ожирением / В. В. Зверев, О. В. Максимова, В. Б. Гервазиева // Инфекционные болезни. – 2014. – С.69–79.
4. Мазанкова, Л.Н. Микродисбиоз и эндогенные инфекции: руководство для врачей / Л.Н. Мазанкова, О.В. Рыбальченко, И.В. Николаева // М. ГЭОТАР-Медиа. – 2018. – С. 336.
5. Фролова, Н.А. Особенности формирования микробиоценоза у детей раннего возраста в зависимости от микробного пейзажа кишечника матери / Н.А. Фролова. // Смоленск. – 2001. – С.23.
6. Урсова, Н.И. Особенности формирования микробиоценоза у грудных детей и дисбактериоз кишечника / Н.И. Урсова // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium medicum. – 2005. – № 2. С. 56–59.
7. Урсова, Н.И. Микробиоценоз открытых биологических систем организма в процессе адаптации к окружающей среде / Н.И. Урсова // Русский медицинский журнал. — 2004. — № 16. — С. 957.
8. Нетребенко, О.К. Пробиотики и пребиотики в питании детей грудного возраста / О.К. Нетребенко // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2007. – Т.84. № 1. С. 80–87.
9. Сидорова И.С. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста / И.С. Сидорова, А.А. Воробьев, Е.И, Боровкова // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 2. С. 7–9.

10. Беляева, И.А. Эффективность использования пробиотиков у недоношенных детей / И.А. Беляева, М.Д. Митиш, Л.К. Катосова // Русский медицинский журнал. – 2009. Т. 17. № 15. С. 1000–1004.
11. Самойлова Ю.Г. Микробиота и метаболическое программирование ожирения у детей / Ю.Г. Самойлова, О.А. Олейник, Е.В. Саган, Н.С. Денисов, И.Н. Ворожцова, Д.А. Кудлай и др. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2020. – С. 156–160.
12. Iliis J. Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition / J.L. Iliis, J.P. Karl, A.M. Oliverio, X. Fu, J.W. Soares, B.E. Wolfe et al.. // Gut Microbes. – 2021. – P. 1–16.
13. LeBlanc J. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective / J.G. LeBlanc, C. Milani, G.S de Giori., F. Sesma, D. van Sinderen, M. Ventura // Curr Opin Biotechnol. – 2013. – P. 160–168.
14. Galland L. The gut microbiome and the brain / L. Galland // Med Food. – 2014. – P. 1261–1272.
15. Liu J. Functions of gut microbiota metabolites, current status and future perspectives / J. Liu, Y. Tan, H. Cheng, D. Zhang, W. Feng, C. Peng // Aging Dis. – 2022. – P. 1106–1126.
16. Makki K. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease / K. Makki, E.C. Deehan, J. Walter, F. Bäckhed // Cell Host Microbe. – 2018. – P. 705–715.
17. Rinninella E. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases / E. Rinninella, P. Raoul, M. Cintoni, F. Franceschi, G.D. Miggiano, A. Gasbarrini et al. // Microorganisms. – 2019. – P. 14.
18. Lucas C. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer / C. Lucas, N. Barnich, H.T. Nguyen // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – P. 1310.
19. Cotillard A. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness / A. Cotillard, S.P. Kennedy, L.C. Kong, E. Prifti, N. Pons, E. Le

Chatelier, M. Almeida, B. Quinquis, F. Levenez, N. Galleron et al. // *Nature*. – 2013. – P. 585–588.

20. David L. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome / L.A. David, C.F. Maurice, R.N. Carmody, D.B. Gootenberg, J.E. Button, B.E. Wolfe, A.V. Ling, A.S. Devlin, Y. Varma, M.A. Fischbach et al. // *Nature*. – 2014. – P. 559–563.

21. DiBaise J. Gut microbiota and its possible relationship with obesity / J.K. DiBaise, H. Zhang, M.D. Crowell et al. // *Mayo Clin Proc*. – 2008. – P. 460–469.

22. Verdam F. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity/ F.J. Verdam, S. Fuentes, C. de Jonge, E.G. Zoetendal, R. Erbil, J. Willem Greve et al. // *Obesity*. –2013. – P. 607–615.

23. Ley R. Obesity alters gut microbial ecology/ R.E. Ley, F. Backhed, P. Turnbaugh et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – P. 1070– 1075.

24. Pariza M. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid/ M.W. Pariza, Y. Park, M.E. Cook // *Prog Lipid Res*. – 2001. – P. 283–298.

25. Martin R. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut/ R. Martin, S. Langa, C. Riviriego et al. // *J Pediatr*. – 2003. – P. 754–758.

26. Arumugam M. Enterotypes of the human gut microbiome./ M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende et al. // *Nature*. – 2011. – P. 174–180.

27. Walker W. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense/ W.A. Walker // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. – 2007. – P. 2-7.

28. Mbakwa C. Gut Microbiota and Body Weight in School-Aged Children: The KOALA Birth Cohort Study/ C.A. Mbakwa, G.D. Hermes, J. Penders, P.H. Savelkoul, C. Thijs, P.C. Dagnelie et al. // *Obesity*. –2018. – P. 1767–1776.

29. Hou Y. Human gut microbiota associated with obesity in chinese children and adolescents/ Y.P. Hou, Q.Q. He, H.M. Ouyang, H.S. Peng, Q. Wang, J. Li et al. // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – P.56-62.
30. Chen X. Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing / X. Chen, H. Sun, F. Jiang, Y. Shen, X. Li, X. Hu et al. // *Peer J.*– 2020. – P. 41-44.
31. Zhong H. Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children / H. Zhong, J. Penders, Z. Shi, H. Ren, K. Cai, C. Fang et al. // *Microbiome.* – 2019.
32. Méndez-Salazar E. Altered gut microbiota and compositional changes in firmicutes and proteobacteria in Mexican undernourished and obese children / E.O. Méndez-Salazar, M.G. Ortiz-López, M.L. Granados-Silvestre, B. Palacios-González, M. Menjivar // *Front. Microbiol.* – 2018. – P.4-6.
33. Riva A. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations / A. Riva, F. Borgo, C. Lassandro, E. Verduci, G. Morace, E. Borghi et al. // *Environ. Microbiol.* – 2017. – P.2-4.
34. Rampelli S. Pre-obese children's dysbiotic gut microbiome and unhealthy diets may predict the development of obesity / S. Rampelli, K. Guenther, S. Turrone, M. Wolters, T. Veidebaum, Y. Kourides et al. // *Commun. Biol.* – 2018. – P. 2-3.
35. Whitt J. Disruption of epithelial HDAC3 in intestine prevents diet-induced obesity in mice / J. Whitt, V. Woo, P. Lee, J. Moncivaiz, Y. Haberman, L. Denson et al. // *Gastroenterology.* – 2019. – P. 1-3.
36. Schroeder B. Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration / B.O. Schroeder, G.M. Birchenough, M. Ståhlman, L. Arike, M.E. Johansson, G.C. Hansson et al. // *Cell Host Microbe.* – 2018. – P. 3-5.
37. Stojanović O. Microbiota guides insulin trafficking in beta cells / O. Stojanović, M. Trajkovski // *Cell Res.* – 2019.

38. Winer D.A. The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance / D.A. Winer, H. Luck, S. Tsai, S. Winer // *Cell Metab.* – 2016. – P. 413–426.
39. Qin J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes et al. // *Nature.* – 2010. – P. 59–65.
40. Orbe-Orihuela Y. High relative abundance of firmicutes and increased TNF α levels correlate with obesity in children / Y.C. Orbe-Orihuela, A. Lagunas-Martínez, M. Bahena-Román, V. Madrid-Marina, K. Torres-Poveda, E. Flores-Alfaro et al. // *Salud. Publica Mex.* – 2018. – P. 3-7.
41. Coppa G. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides / G.V. Coppa, S. Bruni, L. Morelli et al. // *J Clin Gastroenterol.* – 2004. – P.80–83.

СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

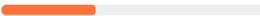
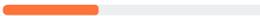
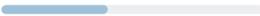
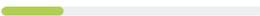
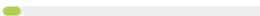
о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Галимов Тимур Рафитович
Самоцитирование
рассчитано для: Галимов Тимур Рафитович
Название работы: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ		35.62%	СОВПАДЕНИЯ		35.62%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		40.77%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		57.29%
ЦИТИРОВАНИЯ		23.61%	ЦИТИРОВАНИЯ		7.09%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 21.06.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 21.06.2024 10:15

Структура документа: Проверенные разделы: библиография с.43-48, основная часть с.4-42

Модули поиска: Переводные заимствования*; Кольцо вузов; ИПС Адилет; Цитирование; Шаблонные фразы; Коллекция НБУ; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); Публикации eLIBRARY; Библиография; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); СПС ГАРАНТ: аналитика; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования IEEE; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Перефразирования по Интернету; Переводные заимствования издательства Wiley; Перефразирования по коллекции IEEE; Перефразирования по Интернету (EN); Сводная коллекция ЭБС; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в

Работу проверил: Халитова Рита Камилевна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.