

**ВЛИЯНИЕ ВИДА ВСКАРМЛИВАНИЯ НА ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ
КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА И УРОВНИ ТРЕФОИЛОВЫХ
ФАКТОРОВ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

© 2023 г. А. В. Шестопапов^{1, 2, 3}, И. М. Колесникова^{1, *}, Д. В. Савчук^{4, 5},
Е. Д. Теплякова⁴, В. А. Шин⁴, Т. В. Григорьева⁶,
Ю. Л. Набока⁴, А. М. Гапонов^{2, 7}, С. А. Румянцев^{1, 2}

¹Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

²ООО “Центр молекулярного здоровья”, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁴Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

⁵Детская городская больница № 1, Ростов-на-Дону, Россия

⁶Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁷НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, Россия

*E-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Изменения в кишечном микробиоме признаются важным компонентом развития ожирения как у взрослых, так и у детей. Одним из значимых факторов формирования кишечной микробиоты в период новорожденности является вид вскармливания, который может оказывать и пролонгированный эффект на микробное сообщество. Кроме того, грудное молоко способствует формированию толерантности к микробиоте кишечника мукозального барьера, одним из компонентов которого являются трефоиловые факторы (TFF2 и TFF3). Целью работы стало изучение состава кишечной микробиоты и содержания трефоиловых факторов в крови у детей и подростков с ожирением в зависимости от типа вскармливания на первом году жизни. Обследовано 93 ребенка без ожирения (Группа 1) и 92 с ожирением (Группа 2). Проводилось исследование уровня TFF2 и TFF3 в сыворотке крови, а также определение таксономического состава микробиома кала методом метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. В целом состав кишечной микробиоты у Группы 1 и 2 был схож. Однако для Группы 2 была характерна меньшая представленность [*Prevotella*], *Epulopiscium* и *Haemophilus* и большая – *Clostridium* и *Catenibacterium*. Ни ожирение, ни вид вскармливания на первом году жизни не оказали влияния на сывороточную концентрацию TFF2 и TFF3. При этом вид вскармливания оказывает пролонгированное влияние на кишечную микробиоту, причем у детей Группы 2 такое влияние было менее выражено. В Группе 1 естественный тип вскармливания на первом году жизни привел к формированию у детей полной толерантности мукозального барьера к микробиому, чего не происходило при смешанном и искусственном вскармливании. В Группе 2 большая часть ассоциаций “TFF–кишечный микробиом” носила положительный характер, что указывает на неблагоприятное взаимодействие кишечной стенки и микробиома. Таким образом, тип вскармливания представляется слабым, но значимым фактором формирования кишечного микробиома у

детей и подростков, который также оказывает влияние на становление толерантности мукозального барьера к кишечной флоре.

Ключевые слова: дети, ожирение, тип вскармливания, кишечный микробиом, треоиловые факторы TFF2 и TFF3

DOI: 10.31857/S0869813923050096, **EDN:** XRFVGC

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день ожирение в детском возрасте является одной из серьезных проблем здравоохранения, носит глобальный характер и затрагивает как развивающиеся, так и развитые страны [1]. Несмотря на то, что известно достаточно много причин и факторов, способствующих развитию ожирения, поиск новых взаимосвязей, в том числе влияние микробиоты кишечника, является перспективным направлением научных исследований [2]. При этом большинство исследований фокусируют свое внимание на изменениях таксономического состава микробиома на уровне филумов. Вместе с тем более подробное исследование микробиома на уровне семейств и родов позволит получить детальную информацию о закономерностях изменений микробного сообщества.

В последнее время человеческий организм рассматривают как метаболическую химеру (суперорганизм, холоорганизм), в котором кишечная микробиота является важнейшим “метаболическим органом” [3]. Поэтому очевидно, что изменение таксономического состава микробного сообщества кишечника приведет к изменению метаболической активности микробиоты и соответственно всего “суперорганизма” [4]. Важным компонентом в формировании системы “суперорганизма” является слизистая оболочка кишечника, барьерные и иммунные механизмы которой обеспечивают симбиотическое взаимодействие макроорганизма с микробиотой.

Одним из компонентов мукозального барьера являются треоиловые факторы (trefoil factors, TFFs), которые представляют собой группу пептидов, синтезирующихся и выделяющихся эпителием слизистых оболочек [5]. Была обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии TFFs и заболеваниями желудочно-кишечного и урогенитального трактов [6, 7]. В частности, содержание TFFs взаимосвязано с уровнями лептина и грелина у детей с эрозивным гастродуоденитом [8].

На процесс формирования “суперорганизма” значительное влияние оказывает вскармливание грудным молоком в период новорожденности. Грудное молоко является не только источником микробиоты с высоким разнообразием, но и создает среду для формирования нормального микробного сообщества кишечника [9]. В формировании таксономического состава микробиома кишечника новорожденных значительную роль играют компоненты грудного молока, такие как олигосахариды, иммунные факторы, бактерии и бактериальные метаболиты, нутриенты [10]. Учитывая, что олигосахариды и секреторный иммуноглобулин А грудного молока обеспечивают формирование периферической толерантности к микробному сообществу [10, 11], то вероятно, тип вскармливания влияет и на выработку факторов мукозального барьера, в том числе треоиловых пептидов. При этом вскармливание оказывает очень длительный эффект, вплоть до подросткового возраста, что было показано на примере микробиоты ротовой полости [12].

Таким образом, детальное исследование микробного сообщества и треоиловых факторов у детей с ожирением представляет особый интерес.

Целью настоящей работы стала характеристика особенностей состава микробиоты толстого кишечника на уровне семейств и родов, а также содержания треоиловых факторов в крови детей и подростков с ожирением в зависимости от типа вскармливания на первом году жизни.

Таблица 1. Характеристика обследуемых групп

Показатель	Группа 1	Группа 2
Пол, ♂/♀	60.2%/39.8%	47.8%/52.2%
Возраст, лет	13.0 [11.0–15.0]	13.0 [11.0–15.0]
Индекс массы тела, кг/м ²	20.2 [19.4–21.1]	27.0 [25.8–28.7]*
Естественное вскармливание	19 (20.4%)	28 (30.4%)
Смешанное вскармливание	40 (43.0%)	51 (55.4%)
Искусственное вскармливание	34 (36.6%)	13 (14.1%)*

* – различия достоверны по сравнению с Группой 1 ($p < 0.05$).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено проспективное одномоментное исследование на базе Детской городской больницы № 1, г. Ростов-на-Дону; ООО “Центр Молекулярного Здоровья”, г. Москва; Казанского (Приволжского) федерального университета и Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова в период 2019–2020 гг. Были обследованы 185 детей от 10 до 18 лет, средний возраст которых составил 13.1 ± 4.1 лет. Критерии включения: подписанное родителями добровольное информированное согласие и отсутствие приема анти-, про- и пребиотических препаратов за 3 мес. до включения в исследование. Критерии исключения: тяжелые соматические заболевания (хроническая сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая почечная недостаточность), любые заболевания желудочно-кишечного тракта, а также все острые патологии. На основании клинических рекомендаций “Ожирение у детей” [13] у 92 детей было диагностировано ожирение I–III степени. Таким образом, были сформированы две клинические группы: Группа 1, состоящая из 93 детей без ожирения, и Группа 2, включавшая 92 ребенка с ожирением. В обеих группах обязательно учитывался тип вскармливания на первом году жизни. Характеристика исследуемых групп приведена в табл. 1.

У всех обследуемых было проведено изучение анамнеза, жалоб на момент обращения, общеклинический осмотр и отбор образцов кала и крови. В сыворотке крови проводилось определение содержания трефоиловых факторов 2-го и 3-го типов (TFF2 и TFF3 соответственно) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов Cloud-Clone Corp (США).

Метагеномный анализ сообщества кишечника осуществляли на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета. ДНК из образцов кала выделяли с использованием набора QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN GmbH, Германия). Секвенирование переменного участка v3–v4 гена 16S рРНК проводили на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США). Полученные последовательности генов 16S рРНК были проанализированы с помощью программы QIIME v.1.9.1 (Knight and Caporaso labs., США) с использованием референсной базы данных Greengenes v.13.8 (Second Genome, Inc., США) с 97.0%-ным порогом сходства между последовательностями. Относительная представленность бактериальных таксонов в общем пуле ридов указана в долях (от 0 до 1), которые были рассчитаны на основе количества картированных ридов для каждого таксона. В последующий статистический анализ были включены идентифицированные семейства и роды, выделенные у 25.0% и более детей хотя бы одной из исследуемых групп.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Полученные массивы данных были провере-

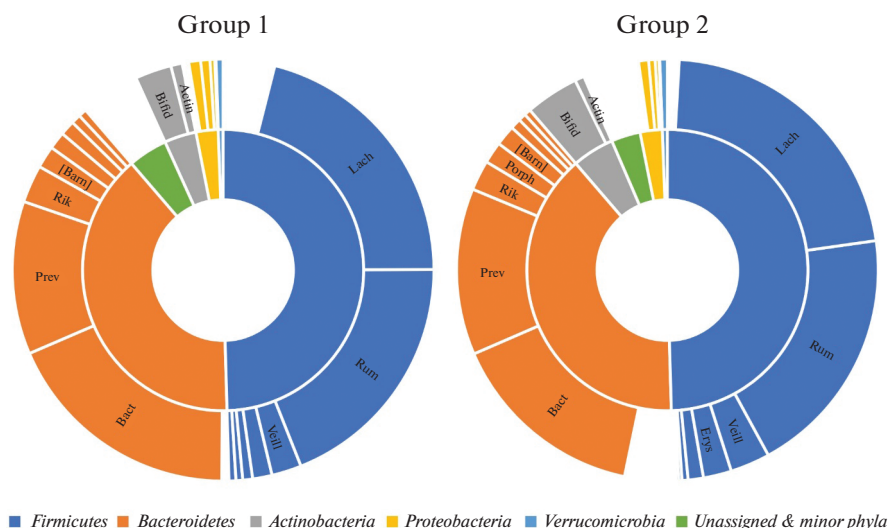


Рис. 1. Таксономический состав кишечного микробиома на уровне филумов и их основных семейств. Actin – Actinomycetaceae; Bifid – Bifidobacteriaceae; [Barn] – [Barnesiellaceae]; Porph – Porphyromonadaceae; Rik – Rikenellaceae; Prev – Prevotellaceae; Bact – Bacteroidaceae; Erys – Erysipelotrichaceae; Veill – Veillonellaceae; Rum – Ruminococcaceae; Lach – Lachnospiraceae.

ны на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Преимущественно полученные данные не подчинялись нормальному распределению, в связи с чем для их описания были использованы медианы [25; 75 перцентили]. Для сравнения содержания трефоиловых факторов и долей отдельных таксонов между исследуемыми группами использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение трех подгрупп (в зависимости от типа вскармливания) выполняли с использованием теста Крускала–Уоллиса, а в случае его положительного результата ($p < 0.05$) проводился апостериорный тест по Коноверу. Кроме того, сравнивали частоту выделения ДНК отдельных таксонов из образцов кала методом Хи-квадрат анализа. Выявление взаимосвязи между долями таксонов кишечного микробиома и содержания трефоиловых факторов в сыворотке проводилось с расчетом коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Коэффициенты корреляции принимались во внимания, если они по модулю были более 0.3 (умеренный уровень связи по шкале Чэддока) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В микробном сообществе кишечника детей и подростков была идентифицирована ДНК, принадлежащая к 83 семействам и 142 родам. При этом ДНК лишь 35 семейств и 50 родов выделялась более чем у 25.0% детей Группы 1 и/или Группы 2. Однако на долю исследуемых 35 семейств приходилось 0.919 [0.893; 0.934] у Группы 1 и 0.928 [0.897; 0.949] у Группы 2, что указывает на полноту описания микробного сообщества. Основными семействами кишечного микробиома у детей обеих групп были Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae и Prevotellaceae, суммарно на долю которых в Группе 1 приходилось 0.721 [0.643; 0.722] и 0.708 [0.634; 0.780] в Группе 2 (рис. 1).

В целом таксономический состав кишечного микробиома был схож у детей исследуемых групп. Однако сравнение долевого содержания семейств и родов у здо-

Таблица 2. Изменения в содержании отдельных таксонов кишечного микробиома у детей исследуемых групп

Филумы	Семейства	Группа 1		Группа 2	
		%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)
Bacteroides	[Odoribacteraceae]	100	5.00 [3.00; 9.00]	98.9	4.00 [2.00; 7.00]*
Firmicutes	Clostridiaceae	98,9	5.00 [3.00; 10.00]	98.8	8.00 [5.00; 13.00]*
Proteobacteria	Pasteurellaceae	67.7	0.14 [0.00; 0.50]	48,9*	0.00 [0.00; 0.38]*
	Роды	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)
Bacteroides	[<i>Prevotella</i>]	31.2	0.00 [0.00; 0.07]	18.5*	0.00 [0.00; 0.00]*
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	96.8	1.80 [1.10; 2.90]	96.7	2.40 [1.60; 4.60]*
	<i>Epulopiscium</i>	29.0	0.00 [0.00; 0.07]	5.4*	0.00 [0.00; 0.00]*
	<i>Catenibacterium</i>	16.1	0.00 [0.00; 0.00]	30.4*	0.00 [0.00; 2.40]*
Proteobacteria	<i>Haemophilus</i>	66.7	0.14 [0.00; 0.44]	47.8*	0.00 [0.00; 0.36]*

Примечание. *Здесь и далее:* для удобства восприятия данные по долям отдельных таксонов в общем пуле бактериальной ДНК микробиома кишечника $\times 10^3$. % – частота выделения ДНК таксона из образцов; * – $p \leq 0.05$.

ровых детей и детей с ожирением были выявлены статистически значимые изменения в содержании ряда семейств и родов (табл. 2).

Большинство выявленных различий демонстрировали снижение доли отдельных таксонов в микробной популяции у детей с ожирением. Снижение родов [*Prevotella*] (семейство [Paraprevotellaceae]), *Epulopiscium* (семейство Lachnospiraceae) и *Haemophilus* (семейство Pasteurellaceae) было результатом более редкого выявления ДНК данных таксонов в образцах от детей Группы 2. Подобное может быть следствием меньшего разнообразия кишечного микробиома, характерного для детей с ожирением [14]. При этом у детей Группы 2 чаще выделялась ДНК *Catenibacterium* (семейство Erysipelotrichaceae) из образцов кала. У детей с ожирением также была повышена доля, приходящаяся на семейство Clostridiaceae и его род *Clostridium*. Было показано, что *Clostridium* позитивно взаимосвязано с высокими уровнями липидов сыворотки, мочевой кислоты, артериального давления, объемом талии и индексом массы тела у взрослых [15]. Следует отметить, что в исследование были включены только здоровые дети без признаков метаболических нарушений. Возможно, выявленное у детей повышение *Clostridium* является одним из первых “маркеров” перерождения микробной флоры, характерное для метаболических нарушений [16].

Анализ содержания трефоиловых факторов у детей и подростков исследуемых групп показал, что ожирение у них не сопровождается изменением сывороточного TFF2, однако у таких пациентов присутствовала тенденция к снижению TFF3 в сыворотке крови ($p = 0.10$) (рис. 2).

Известно, что TFF2 синтезируется слизистой оболочкой желудка и 12-перстной кишки [17]. Он стабилизирует муциновый слой, вступая во взаимодействие с муцином Muc6 и повышая его вязкость, тем самым обеспечивая эффективную защиту от соляной кислоты желудочного сока [17, 18]. TFF3 синтезируется преимущественно бокаловидными клетками толстого кишечника, но также и слизистой бронхов и урогенитального тракта, слюнными, поджелудочной и щитовидной железами, макрофагами и лимфоидной тканью. Он взаимодействует с иммуноглобулин-G-связываю-

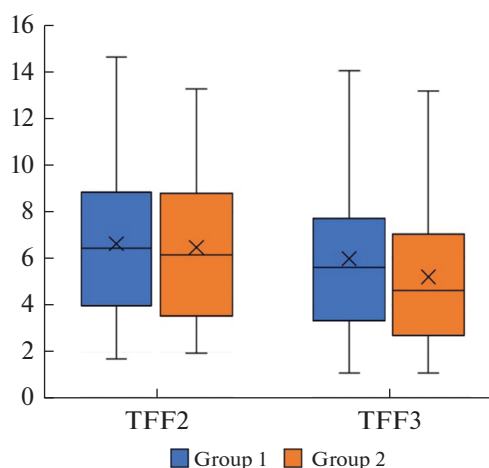


Рис. 2. Содержание трефоиловых факторов в сыворотке у исследуемых групп, нг/мл.

щим белком (IgG-Fc-binding protein, FCGBP), и комплекс TFF3–FCGBP принимает участие в мукозальном иммунном барьере, обеспечивая связывание и клиренс различных микроорганизмов [19]. Оба пептида способны связываться с хеморецепторами CXCR4 и CXCR7, активируя хемотаксис, играют роль в регуляции пролиферации и апоптоза клеток, реституции слизистых оболочек, в ангиогенезе и являются частью хронического воспалительного ответа [5].

Отмеченная нами тенденция к снижению уровня TFF3 в сыворотке крови на первый взгляд не согласуется с результатами исследований, демонстрирующими повышение TFF3 при метаболическом синдроме, сахарном диабете II типа и его осложнениях [20]. Кроме того, было показано, что инсулин и глюкоза усиливают экспрессию TFF3 [21]. Учитывая, что у обследуемых нами детей с ожирением отсутствовали гипергликемия, метаболический синдром, почечные и печеночные нарушения, становится понятным отсутствие повышения концентрации TFF3 в сыворотке.

De Giorgio и соавт. показали, что у мышей, нокаутированных по гену *tff2*, отмечается более низкий уровень лептина в сыворотке и повышенная транскрипция Агути-подобного белка в гипоталамусе [22]. Эти животные характеризовались повышенными аппетитом, расходом энергии и фекальной экскрецией триглицеридов, локомоторной активностью, были устойчивы к индуцированному диетой ожирению, что проявлялось меньшей прибавкой в массе тела и сниженным отложением жира [22]. Напротив, животные, нокаутированные по гену *tff3* характеризуются повышенной чувствительностью к развитию колита и определенным двигательным дефицитом. Если предположить, что сниженный уровень TFF3 в сыворотке крови у детей и подростков с ожирением является результатом низкой конститутивной экспрессии гена *tff3* у этих детей, то данный факт можно расценивать как элемент их наследственной предрасположенности к ожирению.

Несмотря на схожее содержание трефоиловых факторов у детей в обеих группах, у детей с ожирением наблюдались изменения во взаимоотношениях “TFFs–таксоны кишечной микробиоты” (табл. 3). У здоровых детей отсутствовали значимые ассоциации “TFF2–кишечная микробиота”, тогда как при ожирении у детей была отмечена негативная корреляция с долей, приходящейся на семейство Cerasicoccaceae.

Интересно также, что выявленные у здоровых детей и подростков взаимосвязи таксонов кишечного микробиома с TFF3 носили негативный характер. При ожи-

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоиловых факторов в сыворотке и отдельными семействами и родами кишечной микробиоты

	Группа 1	Группа 2
TFF2	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$, $p \leq 0.05$)	Cerasicoccaceae ($r_s = -0.466$, $p = 0.038$, $n = 20$)
TFF3	Clostridiaceae ($r_s = -0.326$, $p = 0.002$, $n = 92$) Cerasicoccaceae ($r_s = -0.426$, $p = 0.034$, $n = 25$) Christensenella ($r_s = -0.459$, $p = 0.032$, $n = 22$)	Coprobacillus ($r_s = 0.521$, $p = 0.027$, $n = 18$) Slackia ($r_s = 0.442$, $p = 0.027$, $n = 25$)

рении, напротив, все выявленные корреляции между TFF3 и кишечным микробиомом носили позитивный характер. С чем связано изменение знака во взаимоотношении “TFF3—кишечный микробиом” у Группы 2 неясно, но, возможно, это отражает негативные изменения в мукозальном барьере у детей с ожирением [23]. Негативная ассоциация *Christensenella* с уровнем TFF3 согласуется с данными Niirpala и соавт., показавшими, что содержание TFF3 в кале отрицательно коррелирует с представленностью Christensenellaceae [24].

Была проанализирована взаимосвязь типа вскармливания и таксономического состава кишечного микробиома у обследуемых групп. Примечательно, что характер вскармливания в грудном возрасте оказал пролонгированный эффект на микробиоту кишечника (на уровне родов и семейств) детей и подростков с нормальной массой тела и с ожирением. У здоровых детей из Группы 1 вид вскармливания в грудном возрасте, не затронув основные доминантные семейства и роды, оказал влияние на содержание минорных таксономических групп (табл. 4). Достаточно неожиданным фактом является значительное число различий между искусственным и смешанным вскармливанием, а естественный тип вскармливания занимал в большинстве случаев “промежуточное” положение между смешанным и искусственным.

Группа детей с естественным вскармливанием отличалась от остальных групп только значимо меньшим содержанием [*Eubacterium*], принадлежащего к семейству Erysipelotrichaceae. Было показано, что высокие уровни Erysipelotrichaceae характерны для лиц с ожирением и ассоциированы с дислипидемией [25]. Кроме того, [*Eubacterium*] *biforme* отрицательно коррелирует с уровнем физической активности у здоровых взрослых [26]. Таким образом, меньшее содержание [*Eubacterium*] можно рассматривать как потенциально благоприятный фактор, снижающий риск развития ожирения у детей после естественного вскармливания.

У детей и подростков без ожирения, находившихся на первом году жизни на смешанном типе вскармливания, наблюдалось критическое снижение *Veillonella* в кишечном микробиоме. Значение этого явления однозначно трактовать не представляется возможным, так как, с одной стороны, была показана высокая представленность этого рода у взрослых с ожирением [26], а с другой — его увеличение после длительной физической нагрузки и положительная ассоциация с выносливостью спортсмена [27].

Искусственный тип вскармливания приводил к меньшей “заселяемости” желудочно-кишечного тракта представителями *Butyricimonas* и практически полному отсутствию Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*). Содержание *Butyricimonas* также может оказывать влияние на метаболический профиль, поскольку Lee и соавт. показали, что пребиотическое применение *B. virosa* способствует снижению массы тела, уровня глюкозы и резистентности к инсулину [28]. При этом уменьше-

Таблица 4. Выявленные различия в содержании отдельных таксонов у детей Группы 1 в зависимости от типа вскармливания в первый год жизни

Таксоны	Естественное вскармливание ($n = 19$)		Смешанное вскармливание ($n = 40$)		Искусственное вскармливание ($n = 34$)		H^1
	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	
Семейства							
Christensenellaceae	78.9	0.64 [0.09; 1.95]	82.5	0.94* [0.11; 4.20]	67.6	0.21* [0.00; 1.87]	6.03
Methanobacteriaceae	36.8	0.00 [0.00; 0.14]	47.5	0.00* [0.00; 1.34]	14.7	0.00* [0.00; 0.00]	7.40
Pasteurellaceae	63.2	0.07 [0.00; 1.33]	52.5	0.07* [0.00; 0.22]	57.9	0.35* [0.07; 0.74]	11.75
Verrucomicrobiaceae	57.9	0.42 [0.00; 2.04]	60.0	0.93* [0.00; 10.70]	38.2	0.00* [0.00; 0.29]	6.14
Роды							
<i>Butyricimonas</i>	94.7	2.43 [0.98; 4.77]	97.5	2.73 [1.50; 4.55]	79.4	1.48[†] [0.29; 2.42]	11.73
<i>Methanobrevibacter</i>	36.8	0.00 [0.00; 0.14]	45.0	0.00 [0.00; 1.28]	8.8	0.00[†] [0.00; 0.00]	8.24
<i>Veillonella</i>	73.7	0.07 [0.02; 0.34]	40.0	0.00[†] [0.00; 0.21]	73.5	0.14 [0.00; 0.63]	8.54
[<i>Eubacterium</i>]	68.4	0.14[†] [0.00; 0.37]	72.5	0.32 [0.00; 8.15]	82.4	0.63 [0.14; 4.90]	6.22
<i>Haemophilus</i>	63.5	0.07 [0.00; 1.30]	52.5	0.07* [0.00; 0.22]	85.3	0.34* [0.07; 0.66]	10.19
<i>Akkermansia</i>	57.9	0.42 [0.00; 2.04]	60.0	0.93* [0.00; 10.70]	38.2	0.00* [0.00; 0.29]	6.14

Примечание. % – частота выделения ДНК таксона из образцов; ¹ – H -критерий Краскела–Уоллиса; * – различия в доле данного таксона, обнаружены между отмеченными типами вскармливания ($p \leq 0.05$); [†] – доля таксона при отмеченном типе вскармливания отличается его долей при двух других типах вскармливания ($p \leq 0.05$).

ние представителей домена Archaea – Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*) после искусственного вскармливания может играть протективную роль в развитии ожирения, так как было показано, что метан-продуцирующие археи способствуют ожирению у мышей [29].

Также у детей после искусственного вскармливания наблюдалось большое содержание Pasteurellaceae (*Haemophilus*) по сравнению с детьми, имеющими смешанный тип вскармливания в анамнезе. Было показано, что обилие *Haemophilus* в кишечнике детей негативно коррелирует с уровнем инсулина и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR у детей с тяжелым ожирением [30]. Таким образом, большее обилие *Haemophilus* и меньшее – Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*) как результат искусственного вскармливания может рассматриваться в качестве факторов, потенциально снижающих риск развития ожирения у таких детей.

У здоровых детей и подростков, находившихся на первом году жизни на искусственном типе вскармливания, наблюдалось снижение Christensenellaceae, Verrucomicrobiaceae (*Akkermansia*) и *Butyricimonas* в сравнении с группой смешанного вскармливания, что потенциально можно рассматривать как факторы, повышающие риск развития ожирения. Было показано, что обилие Christensenellaceae в ки-

Таблица 5. Выявленные различия в долях отдельных таксонов у Группы 2 в зависимости от типа вскармливания в первый год жизни

Таксоны	Естественное вскармливание ($n = 28$)		Смешанное вскармливание ($n = 51$)		Искусственное вскармливание ($n = 13$)		H^1
	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	
Семейства							
<i>Turicibacteraceae</i>	53.6	0.07 [0.00; 0.27]	78.4	0.22 [†] [0.07; 1.02]	38.5	0.00 [0.00; 0.91]	6.72
<i>Christensenellaceae</i>	67.9	0.21 [†] [0.00; 1.64]	74.5	1.29 [0.02; 3.69]	92.3	1.34 [0.14; 4.25]	6.33
<i>Alcaligenaceae</i>	100	8.80 [†] [4.08; 14.20]	96.1	3.78 [2.19; 7.46]	100	2.89 [1.82; 8.74]	9.13
Роды							
<i>Turicibacter</i>	53.6	0.07 [0.00; 0.27]	78.4	0.22 [†] [0.07; 1.02]	38.5	0.00 [0.00; 0.91]	6.72
<i>Anaerotruncus</i>	25.0	0.00 [†] [0.00; 0.04]	47.1	0.00 [0.00; 0.14]	53.9	0.07 [0.00; 0.16]	4.80
<i>Sutterella</i>	100	8.43 [†] [3.97; 13.70]	94.1	3.51 [2.01; 7.24]	100	2.82 [1.82; 8.74]	9.29

Примечание. % – частота выделения ДНК таксона из образцов; ¹ – H -критерий Краскела–Уоллиса; [†] – доля таксона при отмеченном типе вскармливания отличается его долей при двух других типах вскармливания ($p \leq 0.05$).

шечнике положительно взаимосвязано с меньшим объемом висцеральной жировой ткани, благоприятным метаболическим профилем и обратно пропорционально индексу массы тела [31, 32]. Представитель рода *Akkermansia* – *A. muciniphila* на сегодняшний день признается одним из основных таксонов кишечной флоры, участвующим в регуляции углеводного и липидного обменов, иммунного ответа, чье содержание негативно ассоциировано с индексом массы тела [33]. Выявленные изменения могут обусловить большую подверженность детей после искусственного вскармливания к развитию ожирения и метаболических нарушений [34].

У детей и подростков с ожирением влияние типа вскармливания в грудном возрасте также оказывало влияние на таксономический состав микробиома (табл. 5). Однако количество таксонов, которые различались у детей Группы 2 в зависимости от типа вскармливания, было меньше, чем в Группе 1. Такое различие понятно, так как у таких детей присутствует более “свежий” и актуальный фактор, влияющий на кишечный микробиом, – ожирение.

В настоящее время активно обсуждается возможное влияние грудного вскармливания на развитие ожирения у детей, и есть основания полагать, что такой тип вскармливания (при условии отсутствия избытка белка в грудном молоке) представляет собой фактор, потенциально способный снижать риск развития ожирения у детей [35].

У детей с ожирением, которые находились в первый год жизни на естественном вскармливании, было отмечено снижение *Christensenellaceae* и *Anaerotruncus* и, напротив, увеличение *Alcaligenaceae* (*Sutterella*). Учитывая, что обилие кишечных *Christensenellaceae* взаимосвязано с меньшим объемом висцеральной жировой ткани и более низкими значениями индекса массы тела [31, 32], их недостаточное содержание в кишечнике после естественного вскармливания можно рассматривать как фактор риска развития ожирения у детей и подростков. Недавно было показано, что содержание *Anaerotruncus* в кишечнике обратно пропорционально индексу массы тела [36]. Полученные нами данные показывают, что недостаточная обсемененность кишечни-

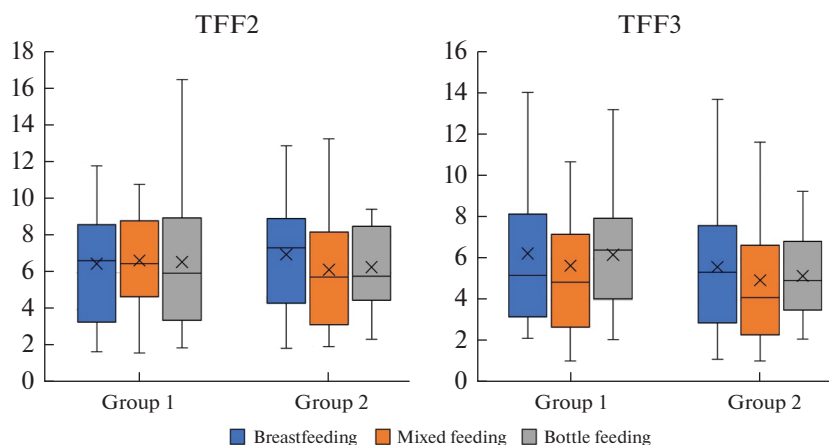


Рис. 3. Содержание треофиловых факторов в сыворотке у исследуемых групп при различных типах вскармливания в первый год жизни, нг/мл.

ка представителями данного таксона после грудного вскармливания может рассматриваться как фактор риска развития ожирения в детском и подростковом возрасте.

Интересным также выглядит в 2.5 раза большая представленность представителей рода *Sutterella* семейства *Alcaligenaceae* у детей с ожирением, которые в младенчестве находились на естественном вскармливании. Было показано, что *Sutterella* обладает легкой провоспалительной активностью в желудочно-кишечном тракте [37], с другой стороны, ряд работ демонстрируют положительное влияние этого таксона на метаболизм глюкозы [38].

Особенностью детей с ожирением после смешанного вскармливания в грудном возрасте было больше содержание семейства *Turicibacteraceae* и его рода *Turicibacter*. Обращает внимание, что его частота выявления из образцов кала детей после смешанного вскармливания была в 1.5 раза выше, чем после естественного вскармливания, и почти в 2 раза выше, чем после искусственного. Создается впечатление, что дополнительные питательные компоненты при смешанном вскармливании и последующее избыточное потребление калорий, приведшее к развитию ожирения, способствовали закреплению *Turicibacter* в кишечном микробиоме.

Тип вскармливания не оказал статистически значимого влияния на уровень треофиловых пептидов в сыворотке крови ни у здоровых детей и подростков, ни у детей с ожирением (рис. 3).

Однако изменился спектр корреляций уровня треофиловых пептидов с содержанием в микробиоме отдельных семейств и родов (табл. 6).

У детей без ожирения после естественного вскармливания отсутствовали взаимосвязи “кишечный микробиом–TFF”, что может указывать на сформировавшуюся толерантность мукозального барьера желудочно-кишечного тракта к микробной флоре. Вероятно, поступающие с грудным молоком многочисленные противовоспалительные пептиды [39] предотвращают иммунный ответ на микробную контаминацию и формируют толерантность кишечной стенки как в верхних, так и нижних отделах желудочно-кишечного тракта.

При этом у детей и подростков без ожирения со смешанным и искусственным вскармливанием в анамнезе появляются единичные ассоциации “TFF2–таксоны кишечного микробиома”, что может указывать на определенное снижение толерантности мукозального иммунитета к отдельным представителям микробного со-

Таблица 6. Выявленные корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоиловых факторов в сыворотке и отдельными семействами и родами кишечной микробиоты у исследуемых групп при различных типах вскармливания

	Группа 1	Группа 2
Естественное вскармливание		
	<i>n</i> = 19	<i>n</i> = 28
TFF2	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)	Mogibacteriaceae ($r_s = -0.471, p = 0.027, n = 22$) Prevotellaceae ($r_s = -0.402, p = 0.047, n = 25$) Prevotella ($r_s = -0.402, p = 0.047, n = 25$) Bifidobacteriaceae ($r_s = 0.370, p = 0.053, n = 28$) Bifidobacterium ($r_s = 0.370, p = 0.053, n = 28$) Clostridium ($r_s = 0.578, p = 0.002, n = 27$)
TFF3	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)	Oxalobacter ($r_s = -0.857, p = 0.014, n = 7$)
Смешанное вскармливание		
	<i>n</i> = 40	<i>n</i> = 51
TFF2	S24-7 ($r_s = 0.406, p = 0.055, n = 23$) Odoribacter ($r_s = -0.361, p = 0.026, n = 38$)	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)
TFF3	Barnesiellaceae ($r_s = -0.456, p = 0.004, n = 39$) Clostridiaceae ($r_s = -0.407, p = 0.009, n = 40$) SMB53 ($r_s = -0.394, p = 0.038, n = 28$) Odoribacteraceae ($r_s = -0.343, p = 0.031, n = 40$) Victivallaceae ($r_s = -0.457, p = 0.057, n = 18$) Pasteurellaceae ($r_s = 0.491, p = 0.024, n = 21$) S24-7 ($r_s = 0.401, p = 0.058, n = 23$) Haemophilus ($r_s = 0.491, p = 0.024, n = 21$)	Rikenellaceae ($r_s = 0.324, p = 0.020, n = 51$) Streptococcaceae ($r_s = 0.320, p = 0.025, n = 49$) Streptococcus ($r_s = 0.322, p = 0.0242, n = 49$) Slackia ($r_s = 0.662, p = 0.010, n = 14$) Coprobacillus ($r_s = 0.700, p = 0.017, n = 11$)
Искусственное вскармливание		
	<i>n</i> = 34	<i>n</i> = 13
TFF2	Coprobacillus ($r_s = 0.661, p = 0.038, n = 10$)	Anaerotruncus ($r_s = 0.750, p = 0.052, n = 7$)
TFF3	Clostridiaceae ($r_s = -0.353, p = 0.044, n = 33$) Turicibacteraceae ($r_s = -0.395, p = 0.051, n = 25$) Turicibacter ($r_s = -0.395, p = 0.051, n = 25$)	Lachnospira ($r_s = 0.629, p = 0.028, n = 12$)

общества. Интересно, что у детей Группы 1, в анамнезе которых был смешанный тип вскармливания, присутствовала негативная взаимосвязь TFF2 и *Odoribacter*. Учитывая, что синтез TFF2 стимулируется провоспалительными цитокинами, появление подобной взаимосвязи может быть следствием противовоспалительного действия *Odoribacter splanchnicus* на кишечную стенку [40–42]. Также у детей после смешанного вскармливания наблюдалась положительная корреляция с обилием S24-7 (*Muribaculaceae*). Представители данного семейства являются основными потребителями муцинов [43], что может объяснить появление позитивной ассоциации с TFF2 – стабилизатором муцинового слоя.

Также смешанный и искусственный типы вскармливания, по-видимому, не приводят к формированию полной толерантности в нижних отделах желудочно-кишечного тракта и связаны с появлением взаимосвязи “TFF3–кишечный микробиом”. Сле-

дует отметить, что в основном такие связи носили негативный характер, это указывает на протективное действие кишечной флоры на мукозальный барьер.

Обращает на себя внимание, что у детей и подростков с ожирением с естественным типом вскармливания в анамнезе, напротив, наблюдались многочисленные корреляции TFF2 с таксонами кишечной флоры, носящие как положительный, так и отрицательный характер.

С одной стороны, возможно предполагать, что у этих детей изначально после естественного вскармливания сформировались физиологические толерантные взаимоотношения между микрофлорой верхних отделов желудочно-кишечного тракта и мукозальной системой желудка и тонкой кишки. Однако в процессе развития ожирения избыток высококалорийной пищи вызвал синдром избыточного бактериального роста, развивающийся у 72.4% детей с ожирением [44], и тонкий кишечник контаминировала флора, к которой в процессе грудного вскармливания толерантность не была сформирована.

Возможен второй сценарий, при котором в силу различных причин естественное вскармливание не привело к формированию толерантности. К таким причинам могут относиться перенесенные кишечные инфекции, особенности пищевого поведения матери и химического состава грудного молока – дефицит в нем фукоолигосахаридов, секреторных иммуноглобулинов или избыток белка, который не только способствует развитию ожирения [35], но и оказывает заметное влияние на микробиом кишечника [45].

У детей с ожирением, имеющих в анамнезе смешанный и искусственный типы вскармливания, выявленные взаимосвязи “TFF3–кишечный микробиом” носили позитивный характер. Подобные взаимоотношения могут свидетельствовать о потенциально неблагоприятном взаимодействии кишечной микрофлоры с мукозальным барьером толстой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, таксономический состав кишечной микробиоты детей и подростков с ожирением схож с детьми без ожирения. Однако для детей с ожирением характерна меньшая представленность таких минорных родов, как [*Prevotella*], *Epulopiscium* и *Haemophilus* и большая – *Clostridium* и *Catenibacterium*.

Нами не обнаружено изменений в содержании трефоиловых пептидов у детей и подростков с ожирением. Подобное наблюдение может указывать на то, что детское ожирение без метаболических нарушений не сопровождается нарушениями мукозальных барьеров желудочно-кишечного тракта.

Тип вскармливания не оказывал значимого влияния на содержание трефоиловых факторов у здоровых детей и подростков вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Однако вид вскармливания оказывает пролонгированное влияние на кишечную микробиоту вплоть до подросткового возраста. У детей и подростков без ожирения с искусственным вскармливанием в анамнезе специфические изменения таксономического состава микрофлоры кишечника потенциально способны повышать риск развития ожирения. При этом у детей и подростков с ожирением тип вскармливания продемонстрировал меньшее влияние на кишечный микробиом, по-видимому, вследствие наличия у них более актуального влияющего фактора – ожирения.

Естественный тип вскармливания у детей с нормальной массой тела приводил к формированию полной толерантности мукозального барьера к микробной флоре, на что указывает отсутствие ассоциаций “кишечный микробиом–трефоиловые пептиды”. При этом для детей, имеющих смешанный или искусственный типы вскармливания в анамнезе, подобные взаимосвязи были характерны. У детей без

ожирения отсутствие связи “кишечный микробиом—трефоиловые пептиды”, очевидно, указывает на протективное действие кишечной флоры в отношении мукозального барьера. На фоне ожирения у детей большая часть выявленных корреляционных связей “ТФФ—кишечный микробиом”, напротив, носила положительный характер, что свидетельствует о неблагоприятном взаимодействии кишечной стенки и бактериальной флоры.

Таким образом, тип вскармливания представляется слабым, но значимым фактором формирования кишечного микробиома у детей и подростков, который также оказывает влияние на становление толерантности мукозального барьера к кишечной флоре.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено Российским национальным исследовательским медицинским университетом им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019) и Ростовским государственным медицинским университетом Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников и их родителей было получено добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.В.Ш., С.А.Р., А.М.Г., В.А.Ш.); планирование эксперимента (А.В.Ш., С.А.Р., А.М.Г., Т.В.Г., Е.Д.Т.), сбор данных (Д.В.С., И.М.К., Е.Д.Т., В.А.Ш.), обработка данных (И.М.К., Д.В.С.), написание манускрипта (А.В.Ш., И.М.К., Д.В.С., Ю.Л.Н.), редактирование манускрипта (С.А.Р., А.М.Г., Т.В.Г., Е.Д.Т., В.А.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lobstein T, Jackson-Leach R, Moodie ML, Hall KD, Gortmaker SL, Swinburn BA, James WPT, Wang Y, McPherson K* (2015) Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *Lancet* (London, England) 385: 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)
2. *Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R* (2019) Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 3–15. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1543023>
3. *Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG* (2014) Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 28: 1221–1238. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
4. *Шестопалов АВ, Шатова ОП, Комарова ЕФ, Румянцев СА* (2020) Особенности метаболического сопряжения в системе “СУПЕРОРГАНИЗМА” (хозяин—микробиота). *Крымск журн exper клин мед* 10: 95–103. [*Shestopalov AV, Shatova OP, Komarova EF, Rumyantsev SA* (2020) Features of metabolic coupling in the “SUPERORGANISM” system (host—microbiota) *Krymsk J Exper Klin Med* 10: 95–103. (In Russ)]. <https://doi.org/10.37279/2224-6444-2020-10-2-95-103>
5. *Шестопалов АВ, Дворников АС, Борисенко ОВ, Тутельян АВ* (2019) Трефоиловые факторы — новые маркеры мукозального барьера желудочно-кишечного тракта. *Инфекция и иммунитет* 9: 39–46. [*Shestopalov AV, Dvornikov AS, Borisenko OV, Tutelyan AV* (2019) Trefoil factors — new markers of gastrointestinal mucosal barrier. *Infekciya i immunitet* 9: 39–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-39-46>

6. Шестопалов АВ, Трофименко ОВ, Шестопалова МА (2012) Уровень трефоиловых пептидов (TFF-1 и TFF-2) у детей с хроническими гастроудоденитами. *Фундамент исследований* 10: 363–366. [Shestopalov AV, Trofimenko OV, Shestopalova MA (2012) Level trefoil peptides (TFF-1 and TFF-2) in children with chronic gastroduodenitis. *Fundament Issledovan* 10: 363–366. (In Russ)].
7. Шестопалов АВ, Мирошниченко ЮА, Рымашевский АН (2013) Содержание муцинов (MUC 5 АС, MUC 6) и трефоилового пептида-3 (TFF-3) в эндометрии и цервико-вагинальном секрете у женщин с физиологической беременностью. *Фундамент исследований* 12: 104–106. [Shestopalov AV, Miroshnichenko YA, Rymashevskiy AN (2013) The concentration of mucin (MUC 5 ac, MUC 6) and trefoil peptide-3 (TFF-3) in the endometrium and cervico-vaginal secretions of women with physiological pregnancy. *Fundament Issledovan* 12: 104–106. (In Russ)].
8. Шестопалов АВ, Румянцев СА, Шестопалова МА, Сапрыкина ЕА, Шумилов ПВ (2014) Влияние *H. pylori* на уровень трефоиловых факторов и адипокинов у детей с гастроудоденитами. *Педиатрия. Журн им ГН Сперанского* 93: 6–10. [Shestopalov AV, Rumyantsev SA, Shestopalova MA, Saprykina EA, Shumilov PV (2014) Effect of *H. pylori* on the level of trefoil factors and adipokines in children with gastroduodenitis. *Pediatriya. Zhurn im GN Speranskogo* 93: 6–10. (In Russ)].
9. Ford SL, Lohmann P, Preidis GA, Gordon PS, O'Donnell A, Hagan J, Venkatachalam A, Balderas M, Luna RA, Hair AB (2019) Improved feeding tolerance and growth are linked to increased gut microbial community diversity in very-low-birth-weight infants fed mother's own milk compared with donor breast milk. *Am J Clin Nutr* 109: 1088–1097. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz006>
10. Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS (2018) Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front Immunol* 9: 361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>
11. Donald K, Petersen C, Turvey SE, Finlay BB, Azad MB (2022) Secretory IgA: Linking microbes, maternal health, and infant health through human milk. *Cell Host Microbe* 30: 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.005>
12. Eshriqui I, Viljakainen HT, Ferreira SRG, Raju SC, Weiderpass E, Figueiredo RAO (2020) Breastfeeding may have a long-term effect on oral microbiota: results from the Fin-HIT cohort. *Int Breastfeed J* 15: 42. <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00285-w>
13. Peterkova VA, Bezlepkinina OB, Bolotova NV, Bogova EA, Vasyukova OV, Girsh YV, Kiyayev AV, Kostrova IB, Malievskiy OA, Mikhailova EG, Okorokov PL, Petryaykina EE, Taranushenko TE, Khranova EB (2021) Clinical guidelines “Obesity in children”. *Probl Endocrinol* 67: 67–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.14341/probl12802>
14. Chen X, Sun H, Jiang F, Shen Y, Li X, Hu X, Shen X, Wei P (2020) Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *Peer J* 8: e8317. <https://doi.org/10.7717/peerj.8317>
15. Zeng Q, Li D, He Y, Li Y, Yang Z, Zhao X, Liu Y, Wang Y, Sun J, Feng X, Wang F, Chen J, Zheng Y, Yang Y, Sun X, Xu X, Wang D, Kenney T, Jiang Y, Gu H, Li Y, Zhou K, Li S, Dai W (2019) Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Sci Rep* 9: 13424. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49462-w>
16. Гапонов АМ, Волкова НИ, Ганенко ЛА, Набока ЮЛ, Маркелова МИ, Синягина МН, Харченко АМ, Хуснутдинова ДР, Румянцев СА, Тутельян АВ, Макаров ВВ, Юдин СМ, Шестопалов АВ (2021) Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья). *Журн микробиол, эпидемиол и иммунобиол* 98: 44–155. [Gaponov AM, Volkova NI, Ganenko LA, Naboka YL, Markelova MI, Sinyagina MN, Kharchenko AM, Khusnutdinova DR, Rumyantsev SA, Tutelyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Shestopalov AV (2021) Features of the colon microbiome in obese patients with its various phenotypes (original article). *Zhurn microbiol, epidemiol and immunobiol* 98: 44–155. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>
17. Heuer F, Stürmer R, Heuer J, Kalinski T, Lemke A, Meyer F, Hoffmann W (2019) Different Forms of TFF2, A Lectin of the Human Gastric Mucus Barrier: *In Vitro* Binding Studies. *Int J Mol Sci* 20(23): 5871. <https://doi.org/10.3390/ijms20235871>
18. Hoffmann W (2015) TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol* 47: 806–816. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3090>
19. Hoffmann W (2020) Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci* 21(12): 4535. <https://doi.org/10.3390/ijms21124535>

20. Yang Y, Lin Z, Lin Q, Bei W, Guo J (2022) Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death Dis* 13: 62. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04504-6>
21. Roa JB, Tortolero GS, Gonzalez E (2013) Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *J Heal Sci* 3: 1–12. <https://doi.org/10.17532/jhsci.2013.26>
22. De Giorgio MR, Yoshioka M, Riedl I, Moreault O, Cherizol R-G, Shah AA, Blin N, Richard D, St-Amand J (2013) Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21: 1389–1395. <https://doi.org/10.1002/oby.20165>
23. Paone P, Cani PD (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69: 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
24. Heitkemper MM, Cain KC, Shulman RJ, Burr RL, Ko C, Hollister EB, Callen N, Zia J, Han CJ, Jarrett ME (2018) Stool and urine trefoil factor 3 levels: associations with symptoms, intestinal permeability, and microbial diversity in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes* 9: 345–355. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0059>
25. Kaakoush NO (2015) Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 84. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
26. Palmas V, Pisanu S, Madau V, Casula E, Deledda A, Cusano R, Uva P, Vascellari S, Loviselli A, Manzin A, Velluzzi F (2021) Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci Rep* 11: 5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>
27. Scheiman J, Lubner JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham L-D, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, Yang Z, Hattab MW, Avila-Pacheco J, Clish CB, Lessard S, Church GM, Kostic AD (2019) Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 25: 1104–1109. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
28. Lee H, An J, Kim J, Choi D, Song Y, Lee C-K, Kong H, Kim SB, Kim K (2022) A Novel Bacterium, *Butyricimonas virosa*, Preventing HFD-Induced Diabetes and Metabolic Disorders in Mice via GLP-1 Receptor. *Front Microbiol* 13: 858192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858192>
29. Conway de Macario E, Macario AJL (2009) Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 299: 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.011>
30. Yuan X, Zhang Y, Lin X, Yang X, Chen R (2023) Association of gut microbiota and glucose metabolism in children with disparate degrees of adiposity. *Pediatr Obes* 18(4): e13009. <https://doi.org/10.1111/ijpo.13009>
31. Waters JL, Ley RE (2019) The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol* 17: 83. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0699-4>
32. Tavella T, Rampelli S, Guidarelli G, Bazzocchi A, Gasperini C, Pujos-Guillot E, Comte B, Barone M, Biagi E, Candela M, Nicoletti C, Kadi F, Battista G, Salvioli S, O'Toole PW, Franceschi C, Brigidi P, Turroni S, Santoro A (2021) Elevated gut microbiome abundance of Christensenellaceae, Porphyromonadaceae and Rikenellaceae is associated with reduced visceral adipose tissue and healthier metabolic profile in Italian elderly. *Gut Microbes* 13: 1–19. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1880221>
33. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y (2020) Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front Microbiol* 11: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00219>
34. Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP (2014) The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 14: 1267. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>
35. Verduci E, Gianni ML, Vizzari G, Vizzuso S, Cerasani J, Mosca F, Zuccotti GV (2021) The Triad Mother-Breast Milk-Infant as Predictor of Future Health: A Narrative Review. *Nutrients* 13(2): 486. <https://doi.org/10.3390/nu13020486>
36. Lv Y, Qin X, Jia H, Chen S, Sun W, Wang X (2019) The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing. *Br J Nutr* 122: 986–995. <https://doi.org/10.1017/S0007114519001909>

37. Hiippala K, Kainulainen V, Kalliomäki M, Arkkila P, Satokari R (2016) Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Front Microbiol* 7: 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01706>
38. Wang C, Zhang H, Liu H, Zhang H, Bao Y, Di J, Hu C (2020) The genus *Sutterella* is a potential contributor to glucose metabolism improvement after Roux-en-Y gastric bypass surgery in T2D. *Diabetes Res Clin Pract* 162: 108116. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108116>
39. Chatterton DEW, Nguyen DN, Bering SB, Sangild PT (2013) Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1730–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.028>
40. Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, Bowers JR, Lemmer D, Engelthaler DM, Eklund KK, Facciotti F, Satokari R (2020) Novel *Odoribacter splanchnicus* Strain and Its Outer Membrane Vesicles Exert Immunoregulatory Effects *in vitro*. *Front Microbiol* 11: 575455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575455>
41. Hoffmann W (2021) Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Links to Inflammation: A Re-evaluation and New Medical Perspectives. *Int J Mol Sci* 22(9): 4909. <https://doi.org/10.3390/ijms22094909>
42. Lima SF, Gogokhia L, Viladomiu M, Chou L, Putzel G, Jin W-B, Pires S, Guo C-J, Gerardin Y, Crawford CV, Jacob V, Scherl E, Brown S-E, Hambor J, Longman RS (2022) Transferable Immunoglobulin A-Coated *Odoribacter splanchnicus* in Responders to Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis Limits Colonic Inflammation. *Gastroenterology* 162: 166–178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.09.061>
43. Pereira FC, Wasmund K, Cobankovic I, Jehmlich N, Herbold CW, Lee KS, Sziranyi B, Vesely C, Decker T, Stocker R, Warth B, von Bergen M, Wagner M, Berry D (2020) Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nat Commun* 11: 5104. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18928-1>
44. Налетов АВ, Пушкарук ВВ (2022) Состояние кишечной микробиоты у детей с ожирением. *Child Med North-West* 10: 70–74. [Nalyotov AV, Pushkaruk VV (2022) The state of the intestinal microbiota in obese children. *Child Med North-West* 10: 70–74. (In Russ)].
45. Dong TS, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Woo S-L, Dreskin BW, Katzka W, Chang C, Zhou Y, Arias-Jayo N, Yang J, Ahdoot A, Li Z, Pisegna JR, Jacobs JP (2020) A High Protein Calorie Restriction Diet Alters the Gut Microbiome in Obesity. *Nutrients* 12(10): 3221. <https://doi.org/10.3390/nu12103221>

Influence of the Infant Feeding on the Taxonomy of the Gut Microbiome and the Trefoil Factors Level in Children and Adolescents

A. V. Shestopalov^{a, b, c}, I. M. Kolesnikova^{a, *}, D. V. Savchuk^{d, e}, E. D. Teplyakova^d, V. A. Shin^d, T. V. Grigoryeva^f, Yu. L. Naboka^d, A. M. Gaponov^{b, g}, and S. A. Roumiantsev^{a, b}

^a*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^b*Center for Molecular Health, Moscow, Russia*

^c*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia*

^d*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia*

^e*Children's City Hospital № 1 in Rostov-on-Don, Rostov-on-Don, Russia*

^f*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

^g*Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com*

Changes in the gut microbiome are recognized as an important component of obesity in both adults and children. One factor in the gut microbiome formation is the infant feeding type, which may also have a prolonged effect on the microbial community. Breast milk contributes to the formation of mucosal tolerance to the intestinal microbiota. In turn, trefoil factors (TFF2 and TFF3) are important components of the mucosal barrier. The aim was to study the composition of the gut microbiota and the trefoil factors level in the blood of children and adolescents with obesity, depending on the infant feeding

type. The study included 93 non-obese children (Group 1) and 92 obese children (Group 2). Serum TFF2 and TFF3 levels were determined by enzyme immunoassay in each study participant. The taxonomic composition of the fecal microbiome was determined by metagenomic sequencing of the 16S rRNA gene. In general, the taxonomic composition of the gut microbiota in Groups 1 and 2 was similar. However, Group 2 had less by [*Prevotella*], *Epulopiscium* and *Haemophilus* and more by *Clostridium* and *Catenibacterium*. Neither obesity nor the infant feeding type influenced the serum concentration of TFF2 and TFF3. However, the infant feeding has a prolonged effect on the gut microbiota, and in Group 2 this effect was less pronounced. In Group 1, breastfeeding led to the formation of a complete mucosal tolerance to the microbiome, which did not occur with mixed and bottle feeding. In Group 2, most of the “TFFs–gut microbiome” associations were positive, indicating an unfavorable interaction between intestinal wall and microbiome in obese children and adolescents. Thus, infant feeding type seems to be a weak but significant factor in the gut microbiome formation in children and adolescents, which also affects the formation of mucosal tolerance to the intestinal microbiota.

Keywords: children, obesity, infant feeding, gut microbiome, trefoil factors TFF2 and TFF3