

На правах рукописи

СОКОЛОВА

Татьяна Сергеевна

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА НА ФОНЕ ИНВАЗИИ
OPISTHORCHIS FELINEUS У ДЕТЕЙ

3.1.21. Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2021

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Федорова Ольга Сергеевна**

Официальные оппоненты:

Рычкова Любовь Владимировна - доктор медицинских наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, руководитель отдела педиатрии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Усенко Денис Валериевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник клинического отдела инфекционной патологии федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

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

Защита состоится «___» _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: Томская область, г. Томск, Московский тракт 2, 634050.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации <http://medlib.tomsk.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

Учёный секретарь
диссертационного совета

Саприна Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рост хронических неинфекционных болезней является ключевой проблемой здравоохранения, что определяет глобальные приоритеты в сфере охраны здоровья населения, в том числе в детском возрасте. Так, одной из стратегических областей политики Здоровье-2020 является снижение бремени неинфекционных и инфекционных болезней [ВОЗ, 2013]. Одним из важнейших факторов, определяющих состояние здоровья человека, является микробиота кишечника. Глобальная исследовательская инициатива привела к старту интегративного проекта «Микробиом человека» (HMP, Human Microbiome Project) в целях изучения микрофлоры человека и её клинического значения [В. А. Methé, 2012, S. Sayasone, 2017]. В настоящее время микробиота кишечника рассматривается как система, ответственная за поддержание метаболического и иммунологического гомеостаза организма. Изменение рациона питания, использование антибактериальных препаратов, элиминация хронических паразитарных инвазий и другие факторы могут привести к формированию микробиоты, не обладающей устойчивостью и достаточным разнообразием, которые необходимы для установления баланса между иммунологической толерантностью и воспалительными иммунными реакциями [Y. Belkaid, 2014]. Показано, что дисбаланс кишечной микробиоты связан с развитием ряда хронических неинфекционных заболеваний [F. Imhann, 2018, A. Nishida, 2018].

В связи с тем, что одной из наиболее значимых природно-очаговых гельминтных инвазий на территории Российской Федерации является описторхоз, вызываемый трематодой *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), становится актуальным исследование его влияния на микробиоту кишечника и, опосредованно, на здоровье населения в эндемичном регионе. Инвазия *O. felineus*, развиваясь в детском возрасте у населения эндемичных регионов, при длительном течении может приводить к развитию патологии желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы, наиболее серьезным осложнением которой является рак печени и желчных протоков у взрослых [O.S. Fedorova, 2017; Y.V. Kovshirina, 2019]. Хроническая форма описторхоза у детей ассоциирована с развитием функциональных и воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта [Л.А. Харитоновна, 2019]. В связи с этим становится актуальным изучение микробиоты кишечника как одного из факторов, способствующих развитию патологии пищеварительной системы на фоне инвазии *O. felineus* у детей.

Степень разработанности темы исследования. Результаты предыдущих исследований указывают о наличии дисбиоза кишечника у пациентов, страдающих хроническим описторхозом [М.И. Калюжина, 2000]. Однако, оценка микробиоты

проводилась с использованием культуральных методов, выявляющих в среднем от 1 до 10 % бактерий, населяющих кишечник. С появлением современных молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов стало возможным актуализировать и существенно расширить знания о кишечном микробиоме на фоне инвазии *O. felineus*. В настоящее время оценка состава микробиоты желчи в зависимости от наличия инвазии *O. felineus* проведена в двух исследованиях (у экспериментальных животных и пациентов с желчекаменной болезнью), в которых в качестве метода идентификации бактерий использовали секвенирование гена 16S рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) [И.В. Салтыкова, 2016, 2017]. В исследовании с участием взрослых пациентов, страдающих желчекаменной болезнью, показано, что наличие инвазии *O. felineus* приводит к изменению микробиотического состава желчи, в том числе к увеличению представленности бактерий, ассоциированных с абсцессом печени и холангитом (*Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus anginosus*) [И.В. Салтыкова, 2016]. По данным предыдущих исследований показано, что изменение микробиоты на фоне инвазии *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) ассоциировано с хроническим воспалением, которое способствует развитию фиброза [Chng K.R. et al., 2016, Sripra et al., 2012]. Согласно научной гипотезе, воздействие на кишечную микробиоту является одним из механизмов, с помощью которого гельминты влияют на иммунитет хозяина и способствуют развитию хронических заболеваний [Reynolds et al., 2014; Walk et al., 2010].

Цель исследования. Установить значение таксономического разнообразия микробиоты кишечника в развитии патологии пищеварительного тракта на фоне инвазии *Opisthorchis felineus* у детей и подростков.

Задачи исследования:

1. Актуализировать данные о распространенности и интенсивности инвазии *Opisthorchis felineus* у детей разных возрастных групп в эндемичном регионе (Томская область).
2. Охарактеризовать таксономический состав кишечной микробиоты у детей и подростков в зависимости от наличия и интенсивности инвазии *Opisthorchis felineus*.
3. Оценить влияние антигельминтной терапии на динамику клинических проявлений инвазии *Opisthorchis felineus* и состав микробиоты кишечника.
4. Изучить ассоциацию клинических форм инвазии *Opisthorchis felineus* с составом сообщества микроорганизмов кишечника у детей и подростков.

Научная новизна исследования. В результате исследования впервые за последние 10 лет актуализированы данные о распространенности и интенсивности инвазии *O.*

felineus у детей с использованием фундаментальных эпидемиологических подходов и современных паразитологических методов (микроскопия образцов стула с использованием концентраторов «PARASEP»). В рамках исследования впервые выполнено комплексное обследование детей и подростков, проживающих в эндемичном регионе. Установлено, что инвазия *O. felineus* ассоциирована с изменениями желчного пузыря в виде утолщения и неровности стенки, наличия экзогенного содержимого (OR = 1,9; 95 % CI 1,2–3,1; p = 0,012) и признаками перидуктального фиброза первой степени (OR = 3,1; 95 % CI 1,0–9,7; p = 0,04) по данным ультразвукового исследования.

Впервые в результате исследования с использованием технологии секвенирования по фрагменту V4 гена бактериальной 16S рРНК получены данные о составе микробиоты кишечника у детей, страдающих инвазией *O. felineus*, а также после антигельминтной терапии. Новыми являются данные о том, что микробиота кишечника у детей, страдающих инвазией *O. felineus*, до и после антигельминтной терапии, характеризуется столь же разнообразным таксономическим составом, что и микробиота детей без инвазии. Однако, выявлена положительная связь между интенсивностью инвазии *O. felineus*, измеряемой как количество яиц гельминта в одном грамме стула, и α -разнообразием кишечной микробиоты. При оценке β -разнообразия микробиоты выявлены различия между составом метагенома пациентов, страдающих инвазией *O. felineus*, и неинвазированных детей ($R^2 = 0,05$; p = 0,01), а также между образцами, полученными после дегельминтизации празиквантелом, и детей, не имеющих инвазии ($R^2 = 0,07$; p < 0,01). Получены новые данные об ассоциации инвазии *O. felineus* у детей с изменениями количественной представленности ряда микроорганизмов на разных таксономических уровнях, при этом изменения зависят от интенсивности инвазии и клинической формы описторхоза.

Приоритетными стали данные о вкладе микробиоты кишечника на фоне описторхоза у детей в развитие патологии пищеварительного тракта. Микробиота при инвазии *O. felineus* характеризуется увеличением представленности потенциально патогенных микроорганизмов (Proteobacteria, Enterobacteriaceae, *Escherichia-Shigella*) и снижением представленности комменсальных бактерий Firmicutes. Антигельминтная терапия приводит к изменению представленности микроорганизмов Firmicutes и Proteobacteria, а также представленности бутират-продуцирующих (увеличение *Faecalibacterium*, снижение *Roseburia*) и условно-патогенных бактерий (снижение *Synergistetes* и *Escherichia-Shigella*, *Howardella*, *Slackia*, повышение *Leuconostoc*, *Varibaculum*).

Сформирована база данных, содержащая метагеномные данные о составе

микробиоты кишечника у детей в зависимости от наличия инвазии *O. felineus* в эндемичном регионе (DOI:10.5281/zenodo.4304728).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные эпидемиологические данные о распространенности и интенсивности инвазии *O. felineus* у детей будут иметь важное практическое значение для планирования медицинской помощи детскому населению в эндемичных регионах. Указанные данные могут быть использованы для международных аналитических исследований распространенности трематодозов в различных регионах мира.

Теоретическую значимость представляет сформулированная гипотеза о вкладе таксономического разнообразия микробиоты кишечника на фоне инвазии *O. felineus* в развитие патологии пищеварительного тракта. Полученные новые фундаментальные знания открывают перспективу разработки новых превентивных стратегий в отношении социально значимых заболеваний у детей и подростков. Сформированная база данных (DOI:10.5281/zenodo.4304728), содержащая результаты метагеномного анализа, может быть использована при планировании последующих клинических исследований микробиоты человека.

Методология и методы исследования. В соответствии с поставленными целью и задачами исследование выполнено в три этапа: скрининговый, клиничко-фармакологический и исследование микробиоты кишечника. В работе использованы методы: клиничко-anamнестические, лабораторные методы, ультразвуковое исследование гепатобилиарной системы, микроскопия образцов стула, выделение бактериальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и секвенирование бактериальных генов 16S рРНК, биоинформатический и статистический анализ данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Инвазия *O. felineus* влияет на структуру заболеваемости детей и подростков в эндемичном регионе и вносит вклад в развитие патологии гепатобилиарной системы, увеличивая частоту воспалительных заболеваний желчного пузыря в 1,9 раз (OR = 1,9; 95 % CI 1,2–3,1; $p = 0,012$) и перидуктального фиброза в 3 раза (OR = 3,1; 95 % CI 1,0–9,7; $p = 0,04$) по данным ультразвукового исследования. В детском и подростковом возрасте преобладает низкая интенсивность инвазии (93,3 %). Инвазия *O. felineus* у детей и подростков, проживающих в эндемичном регионе, сопровождается изменением состава микробиоты, характеризующимся ассоциацией α -разнообразия с ростом интенсивности инвазии и вкладом в β -разнообразиие.
2. Микробиота кишечника детей и подростков, страдающих инвазией *O. felineus*, характеризуется увеличением представленности потенциально патогенных бактерий

(Proteobacteria) и снижением представленности комменсальных (Firmicutes), при этом изменения микробиоты варьируют в зависимости от интенсивности инвазии и клинической формы описторхоза. В течение трех месяцев после антигельминтной терапии происходит восстановление представленности микроорганизмов Firmicutes и Proteobacteria, а также изменение представленности бутират-продуцирующих (увеличение *Faecalibacterium*, снижение *Roseburia*) и условно-патогенных бактерий (снижение *Synergistetes* и *Escherichia-Shigella*, *Howardella*, *Slackia*, повышение *Leuconostoc*, *Varibaculum*).

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом выборки участников исследования, использованием современными методами исследования и корректными методами обработки данных.

Основные результаты исследования представлены в виде докладов и публикаций тезисов на международной конференции «Asian Neglected Tropical Diseases» (Таиланд, г. Кхонкен, 2017 г., 2019 г.), международном конгрессе паразитологов «International Congress of Parasitology» (Южная Корея, г. Тэгу, 2018), XXI конгрессе педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (г. Москва, 2019 г.), конкурсе молодых ученых XXI конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» - диплом I степени (г. Москва, 2019 г.), V конференция студентов и молодых ученых «Педиатрические чтения» (г. Москва, 2019 г.), конкурсе работ молодых ученых Общероссийского образовательного мероприятия «Эстафета вузовской науки – 2021» – диплом III степени (г. Москва, 2021 г.).

Внедрение результатов исследования. Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета и кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, а также в практическую деятельность детской клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и гастроэнтерологического отделения ОГАУЗ «Областная детская больница» (г. Томск).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 12 печатных работ, из них шесть публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе пять полнотекстовых статей. Четыре статьи опубликованы в журналах, входящих в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science, в том числе три статьи – в журналах 1–2 квартиля.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах

машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 283 источника, из них 47 отечественных и 236 иностранных публикаций. Диссертационная работа иллюстрирована 22 таблицами, 25 рисунками.

Личный вклад автора. Автором проведен аналитический обзор источников литературы по изучаемой проблеме, сформулированы цель и задачи исследования, выполнен набор пациентов для участия в исследовании и их клиническое обследование, проведены анализ и интерпретация полученных данных, сформулированы основные научные положения и выводы работы, публикация результатов. При личном участии автора выполнена пробоподготовка образцов для секвенирования, статистический анализ результатов.

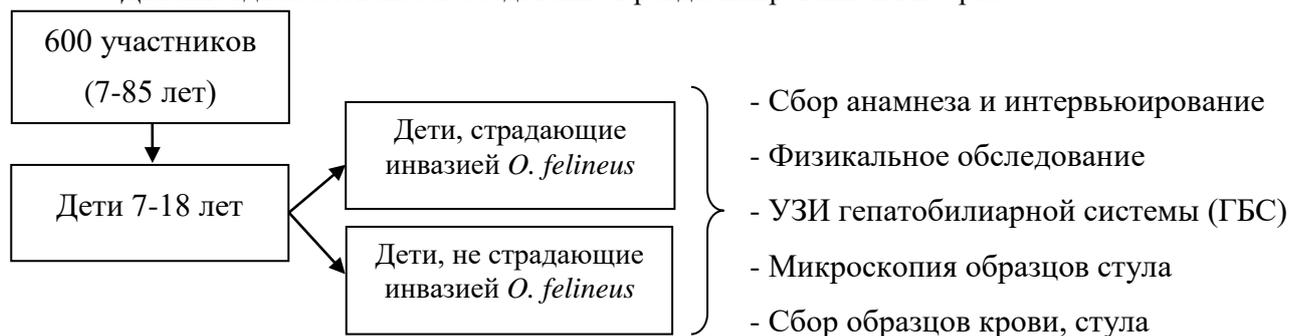
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клинические группы и методы исследования. Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в период 2016-2019 гг. при поддержке гранта РФФИ № 16-44-700148 «Фундаментальные подходы к оптимизации диагностики и терапии природно-очаговой инвазии *O. felineus* эндемичных регионах». В качестве клинических баз использованы: детская клиника ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий отделением канд. мед. наук Козырицкая Д.В.), ОГБУЗ «Областная детская больница» (главный врач канд. мед. наук Тимошина Е.Л.), ОГБУЗ «Шегарская районная больница» (главный врач Мазейна С.В.). Выделение бактериальной ДНК из образцов стула, а также биоинформатический и статистический анализ метагеномных данных, выполняли на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий д-р мед наук, профессор Е.В. Удут). Секвенирование образцов проводили на базе лаборатории института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН и ООО «Кномикс» (г. Москва). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение от 31 октября 2016 г., регистрационный номер 4981).

В соответствии с поставленными задачами исследование выполнено в три этапа. Первый этап (скрининговый) спланирован в дизайне одномоментного исследования в рандомизированной выборке жителей Шегарского района Томской области (в рамках «Эпидемиологического исследования распространенности инвазии *O. felineus* в Томской области»). Общая численность репрезентативной выборки жителей подворий 9 сельских населенных пунктов составила 600 человек, в том числе включены 85 детей в возрасте 7–18 лет (рис. 1).

I. Скрининговый этап

Дизайн: одномоментное исследование в рандомизированной выборке



II. Клинико-фармакологический этап

Дизайн: проспективное клинико-фармакологическое исследование «случай контроль»



III. Этап исследования микробиоты кишечника

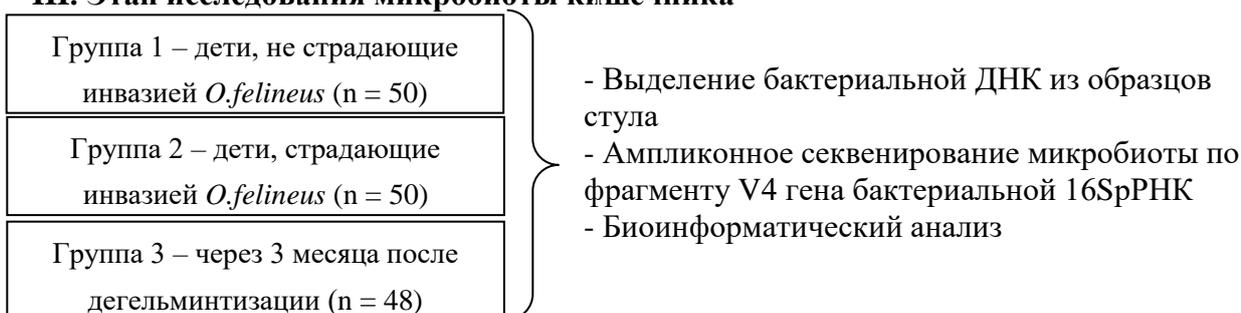


Рисунок 1 – Схема этапов и дизайн исследования

Критерии включения скринингового этапа: дети от 7 до 18 лет, проживающие в Шегарском районе Томской области. **Критерии исключения скринингового этапа:** наличие клинически значимых неконтролируемых состояний или заболеваний, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на участие пациента в исследовании и/или проведении каких-либо процедур и интерпретации результатов в рамках исследования; отказ от участия в исследовании. На данном этапе применены следующие методы исследования:

1. Клинико-anamнестические: интервьюирование по индивидуальному клиническому вопросу, содержащему разделы о демографических, социокультурных, медицинских данных; физикальное обследование; 2. Лабораторные: биохимическое исследование сыворотки крови (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Германия); 3. Инструментальные: ультразвуковое исследование гепатобилиарной системы (портативный ультразвуковой аппарат M7, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics, Co, Ltd). Степень перидуктального фиброза оценивали в соответствии с критериями, используемыми в эпидемиологических исследованиях в эндемичных по описторхозу районах: степень 0 - отсутствие эхо-сигналов в печени, степень 1 – эхо-сигнал в одном сегменте печени, степень 2 – эхо-сигнал в 2–3 сегментах печени и степень 3 - более чем в трех сегментах печени [B. Sripa, 2009]; 4. Микроскопия образцов стула с применением одноразовых концентраторов «PARASEP» (Diasys Ltd, Великобритания) и определением интенсивности инвазии (низкая – 0-999 яиц в одном грамме стула, средняя – 1000-9999, высокая – 10000 и более).

Второй этап (клинико-фармакологический) проведен в дизайне проспективного исследования «случай-контроль», в рамках которого включены 100 детей: группа 1 - дети, не страдающие инвазией *O. felineus*, а также не имеющие острых и хронических болезней (n = 50, средний возраст $10,3 \pm 2,8$ лет), группа 2 - дети, страдающие инвазией *O. felineus* (n = 50, средний возраст $11 \pm 3,4$ лет). Антигельминтная терапия проведена празиквантелом в дозе 60 мг/кг массы тела в три приема с интервалом четыре часа. Проспективное наблюдение включало в себя 6 визитов. Через три месяца после терапии проводили сбор образцов стула для контрольного паразитологического исследования, а также для выделения бактериальной ДНК.

Критерии включения в группу 1 (дети, не страдающие инвазией *O. felineus*): дети от 7 до 18 лет, проживающие в Томской области; отсутствие инвазии *O. felineus* по данным паразитологического и серологического исследования и/или другой гельминтной инвазии; отсутствие ранее установленных тяжелых хронических заболеваний. **Критерии включения в группу 2 (дети, страдающие инвазией *O. felineus*):** дети от 7 до 18 лет, проживающие в Томской области, с подтвержденной инвазией *O. felineus* (по результатам микроскопии стула); отсутствие ранее установленных тяжелых хронических заболеваний.

Критерии исключения для всех исследуемых групп: прием антибактериальных препаратов или других антимикробных средств в течение трех месяцев, предшествующих исследованию; длительный прием системных глюкокортикостероидных препаратов; прием эубиотиков в течение одного месяца до начала исследования; кишечные инфекции в течение одного месяца до начала исследования, наличие клинически значимых состояний или заболеваний, которые могут повлиять на участие пациента в исследовании и/или проведении процедур и интерпретации результатов в рамках исследования.

В рамках третьего этапа выполнено исследование микробиоты образцов стула с использованием метода 16S рРНК секвенирования в группах, сформированных в результате клинико-фармакологического этапа: 1 – дети, не страдающие инвазией *O. felineus* (n = 50), 2 – дети, страдающие инвазией *O. felineus* до антигельминтного лечения (n = 50) и группа 3 – пациенты через три месяца после дегельминтизации празиквантелом (n = 48). Для оценки вклада микробиоты в формирование клинической формы описторхоза дети, страдающие инвазией, стратифицированы на три подгруппы: группа 2А – клинически выраженная форма с явлениями холепатии (n = 22); группа 2В – клинически выраженная форма с явлениями гастродуоденопатии (n = 18); группа 2С – пациенты с латентной формой (n = 10).

Критерии включения в группу 3 (пациенты через три месяца после дегельминтизации): пациенты, страдающие инвазией *O. felineus*, после дегельминтизации празиквантелом и имеющие отрицательный результат при двукратной микроскопии образцов стула на наличие яиц *O. felineus* через три месяца после дегельминтизации.

На данном этапе применены следующие методы исследования: выделение бактериальной ДНК из образцов стула по стандартному протоколу к набору FastDNA® SPIN Kit for Soil (MPBio, США, www.mpbio.com) и ампликонное секвенирование микробиоты по маркерному фрагменту V4 гена бактериальной 16S рРНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq.

Статистические методы. Статистическую обработку клинико-anamнестических данных и лабораторно-инструментальных параметров проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows version 10.0». Для установления зависимости исхода от фактора рассчитывали отношение шансов, приведено в виде OR (95 % CI). Различия в клинических и параклинических параметрах между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни-Уилкоксона и критерия χ^2 , в связанных выборках (до и после лечения) использовали критерий Уилкоксона. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные - при нормальном распределении в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, при распределении, отличном от нормального - Mediana (Q25; Q75). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Биоинформатический анализ. Таксономический анализ прочтений секвенатора осуществляли с использованием программного обеспечения QIIME2 версия 2019.1.0. Для всех прочтений проводили фильтрацию по качеству с порогом в 30 баллов phred, дупликацию, а также de novo идентификацию и удаление химерных последовательностей. Пригодные прочтения кластеризовали по сходству (не менее 99 %) с базой данных SILVA 132 с использованием алгоритма q2-vsearch. Таксономическую классификацию кластеров

осуществляли с использованием плагина q2-feature-classifier в основе которого лежит использование наивного байесовского классификатора, обученным на области 515F / 806R последовательностей гена 16S рРНК из базы данных SILVA 132.

Статистический анализ данных состава кишечной микробиоты проводили с использованием языка программирования R версии 3.6.1. Анализ ассоциаций между альфа-разнообразием, наличием инвазии и влиянием терапии - линейная смешанная регрессия; связь между интенсивностью инвазии и индексами альфа-разнообразия - метод отрицательной биномиальной регрессии. Для определения достоверности попарного различия сообществ по составу микробиоты - парный пермутационный (перестановочный) дисперсионный анализ с оценкой значимости при 9999 перестановках. Анализ численности таксонов с использованием обобщенной линейной смешанной модели с предположением об отрицательном биномиальном распределении зависимой переменной – представленности бактерий. Все модели были проверены с помощью ANOVA II-типа; для значимых моделей расчет предельных средних значений и дополнительный анализ Тьюки. Поправка на множественное сравнение методом FDR, различия считались достоверными при $p < 0,05$ после применения поправки. Дополнительно анализ данных микробиоты выполнен с использованием платформы Knomics-Biota и доступен онлайн в виде интерактивных отчетов на сайте <https://biota.knomics.ru/opisthorchis-and-gut-microbiome-2019> [D. Efimova, 2018].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты скринингового этапа. В диссертационной работе представлены результаты обследования 85 детей (средний возраст 11 ± 3 лет), включенных в состав выборки «Эпидемиологического исследования распространенности инвазии *O. felineus* в Томской области». Доля мальчиков, включенных в исследование, была равна 41 % ($n = 35$), девочек - 59 % ($n = 50$).

Анализ результатов интервьюирования показал, что детское население не имеет достаточно знаний о способах заражения и профилактики инвазии *O. felineus*. Так, осведомленность об описторхозе детского населения составила 63,5 %, при этом в группе детей в возрасте 7–10 лет данный показатель статистически значимо ниже, чем в возрасте 11–18 лет – 47,4 и 76,3 % соответственно (OR = 3,6; 95 % CI 1,34–9,56; $p = 0,01$). В то же время осведомленность в группе детей почти в два раза ниже по сравнению со взрослыми (63,5 % против 98,6 %, OR 39,1; CI95 % 15,5–98,2). Большинство детей регулярно употребляют в пищу речную рыбу (76,5 %), в том числе в термически необработанном виде. Только 35,8 % респондентов указали, что употребление речной рыбы в термически необработанном виде является основной причиной описторхоза.

Инвазия *O. felineus* установлена у 17,6 % детей (11,6 % - в выборке детей 7–10 лет, 23,8 % - в выборке детей 11–18 лет; $p = 0,1$, табл. 1). Различий по гендерному признаку в зависимости от наличия инвазии *O. felineus* у детей не установлено. Интенсивность инвазии *O. felineus* варьировала в диапазоне 2–3800 яиц гельминта в грамме фекалий (среднее значение $321 \pm 969,2$), превалировала низкая интенсивность инвазии (≤ 999 яиц в грамме стула – 93,3 %). Таблица 1 - Характеристика участников скринингового этапа в зависимости от наличия инвазии *O. felineus*

Возраст	Всего (n = 85)		Дети, не имеющие инвазии <i>O. felineus</i> (n = 70)		Дети, страдающие инвазией <i>O. felineus</i> (n = 15)	
	n	%	n	%	n	%
7-10 лет	43	50,6	38	88,4	5	11,6
11-18 лет	42	49,4	32	76,2	10	23,8

По данным ультразвукового исследования печени и желчевыводящей системы у детей, страдающих описторхозом, в сравнении с неинфицированными участниками чаще выявляли следующие изменения: наличие эхогенного содержимого в желчном пузыре и утолщение и неровность его стенок (71,4 % и 37,1 % соответственно, OR = 1,9; 95 % CI 1,2–3,1; $p = 0,012$), перидуктальный фиброз внутрипеченочных протоков первой степени (26,7 % и 8,6 %, соответственно, OR = 3,1; 95 % CI 1,0–9,7; $p = 0,04$).

Результаты клинико-фармакологического этапа. В структуре клинических проявлений превалировал болевой синдром (боль в животе – 92 %, в том числе в правом подреберье – 56 %), диспепсические проявления (изжога – 8 %, тошнота – 52 %, нарушения стула – 50 %). По данным УЗИ печени и желчевыводящей системы изменения со стороны желчного пузыря значимо чаще регистрировали у детей, страдающих инвазией *O. felineus*, в сравнении с неинвазированными (42 % и 24 %, соответственно, OR = 1,8; 95 % CI 1,0–3,2; $p = 0,03$). По результатам эндоскопического обследования у 72 % детей выявлены умеренные и у 7 % выраженные проявления экссудативно-эритематозного дуоденита. Дуоденогастральный рефлюкс с признаками рефлюкс-гастрита регистрировали у 16 % детей. Проявления рефлюкс-эзофагита выявлены у 35 % пациентов.

Согласно результатам клинико-фармакологического исследования выявлено, что дегельминтизация празиквантелом в дозе 60 мг/кг имеет достаточно высокий профиль безопасности у пациентов детского возраста, с низкой частотой нежелательных реакций – только 14 % детей предъявляли жалобы в первые сутки после приема препарата, среди которых головная боль, слабость, снижение аппетита, тошнота и боль в животе. Все нежелательные явления относились к категории легких. Динамическое наблюдение детей после

антигельминтного лечения показало, что клиническое улучшение регистрируется через 3 месяца и выражается снижением частоты болей в животе (92 % против 40 %, $p < 0,01$), тошноты (52 % против 8 %, $p < 0,01$), зудящих высыпаний (24 % против 6 %, $p < 0,01$). По данным УЗИ после дегельминтизации через три месяца сохраняются изменения в гепатобилиарной системе в виде утолщения стенки желчного пузыря и неоднородности структуры паренхимы печени. Однако, у пациентов уже через три месяца значительно реже регистрировали наличие экзогенного содержимого в желчном пузыре (20 % и 32 %, соответственно, $p = 0,02$). Через один месяц после антигельминтного лечения положительные результаты паразитологического исследования отмечали у 8 % пациентов (среднее значение $6 \pm 6,8$ яиц *O. felineus* в грамме стула), через три месяца - дегельминтизация показала 100 % эффективность у детей.

Результаты метагеномного анализа микробиоты кишечника детей. В результате оценки альфа-разнообразия по индексам таксономического разнообразия Фэйта, Шеннона и observed OTUs выявлена тенденция к увеличению таксономического богатства у пациентов с инвазией *O. felineus* по сравнению с неинвазированными участниками, однако данные различия не были значимы (индекс Фэйта: $p = 0,73$; индекс Шеннона: $p = 0,44$; observed OTUs: $p = 0,76$). Состав кишечной микробиоты пациентов после лечения характеризовался таким же таксономическим разнообразием, как и до дегельминтизации и у детей группы сравнения.

У пациентов с описторхозом по результатам оценки трех индексов разнообразия (Фэйта: $R = 0,5$; $p < 0,01$; Шеннона: $R = 0,4$; $p < 0,01$; observed OTUs: $R = 0,3$, $p < 0,01$) выявлена положительная ассоциация между интенсивностью инвазии, выраженной количеством яиц на один грамм стула, и альфа-разнообразием (рис.2).

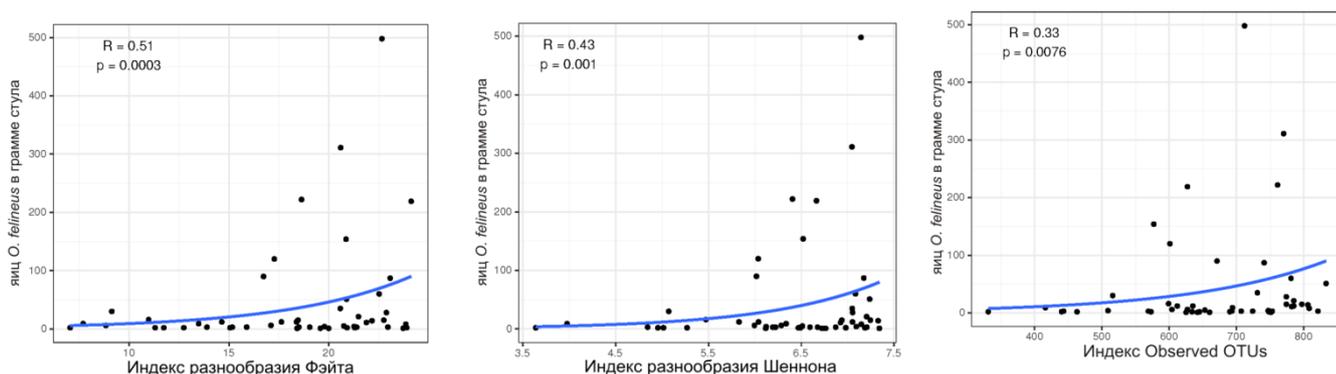


Рисунок 2 - Различия в таксономическом разнообразии микробиоты кишечника в зависимости от интенсивности инвазии *O. felineus*

Примечание – на рисунке графики представляют ассоциации между интенсивностью инвазии, измеренной как количество яиц *O. felineus* на один грамм фекалий, и индексами Фэйта, Шеннона и числом наблюдаемых OTU в группе детей, страдающих инвазией *O. felineus*.

В ходе исследования проведена оценка бета-разнообразия микробиоты. При оценке вклада статуса пациента в бета-разнообразии микробиоты выявлены различия между составом

метагенома у детей с инвазией *O. felineus* и группы детей, не страдающих инвазией ($R^2 = 0,05$; $p = 0,01$), а также между неинвазированными участниками и пациентами после лечения ($R^2 = 0,07$; $p < 0,01$). Не выявлено значимых различий по бета-разнообразию между образцами, полученными до и после дегельминтизации ($R^2 = 0,02$; $p = 0,18$).

Для детальной оценки состава микробиоты кишечника определены таксоны, которые встречаются более чем в 10 % образцов и составляют не менее 0,01 % от состава микробиома в каждом образце. Наиболее представленными типами в микробиоте кишечника исследуемых групп были Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes и Proteobacteria. Менее представленными типами во всех образцах были Verrucomicrobia, Tenericutes, Euryarchaeota, Cyanobacteria, Synergistetes. В среднем, соотношение Firmicutes/ Bacteroidetes у детей составило 7,5. На уровне семейств в микробиоте кишечника во всех группах преобладали Lachnospiraceae ($35,4 \pm 17$ %), Ruminococcaceae ($21,6 \pm 12,3$ %), Bifidobacteriaceae ($11 \pm 11,2$ %), Bacteroidaceae ($4 \pm 5,8$ %), Prevotellaceae ($3,7 \pm 7$ %). Всего идентифицировано 45 семейств с представленностью более 0,01 % от состава метагенома. Среди наиболее представленных бактериальных родов в структуре идентифицированных метагеномов определены *Blautia* ($13,1 \pm 9,9$ %), *Bifidobacterium* ($11,2 \pm 11,7$ %), *Faecalibacterium* ($6,7 \pm 6,8$ %), *Bacteroides* ($4,1 \pm 5,9$ %), *Agathobacter* ($3,2 \pm 3,5$ %), *Ruminococcus* ($2,7 \pm 3,4$ %) и *Prevotella* 9 ($3,1 \pm 6,3$ %), *Dorea* ($3,1 \pm 2,1$ %) и *Eubacterium hallii* group ($2,9 \pm 2,1$ %). Всего идентифицировано 138 родов, представленность которых была выше 0,01 %.

Влияние инвазии *O. felineus* и дегельминтизации на микробиоту кишечника. На уровне типов в микробиоте кишечника у пациентов с инвазией *O. felineus* выявлено уменьшение представленности бактерий типа Firmicutes и увеличение содержания Proteobacteria в сравнении с участниками без инвазии (табл. 2).

Таблица 2 – Различия в составе кишечной микробиоты на уровне типов

Тип	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p [#]
Proteobacteria	71,64 (14,31)	257,19 (54,49)*	96,67 (17,96)**	< 0,01
Firmicutes	3757,84 (118,74)	3287,1(102,87)*	3717,67(118,7)**	0,02
Synergistetes	0,37 (0,33)	0,59(0,51)	0,01 (0,01) ***	0,04

Примечание – данные представлены в виде $\text{emmean} \pm \text{SE}$; [#] различия в представленности таксонов статистически значимы при уровне $p < 0,05$ (ANOVA, значения p даны с поправкой FDR); * различия значимы при сравнении с Группой 1, $p < 0,05$; ** различия значимы при сравнении с Группой 2, $p < 0,05$; *** различия значимы при сравнении с Группой 1 и Группой 2, $p < 0,05$.

После дегельминтизации через три месяца отмечали увеличение содержания Firmicutes и снижение Proteobacteria относительно их представленности у пациентов с инвазией до лечения и, таким образом, были сопоставимы с уровнем в группе детей, не страдающих инвазией. В

образцах стула после лечения выявлено снижение представленности бактерий типа *Synergistetes* в сравнении с группой детей без инвазии и пациентами до лечения.

На уровне семейств в микробиоте кишечника пациентов с инвазией *O. felineus* в сравнении с группой детей, не страдающих инвазией, преобладали бактерии Enterobacteriaceae (табл. 3). Содержание Enterobacteriaceae в образцах, полученных после лечения, снижалось до уровня, сопоставимого с группой детей, не страдающих инвазией. Дегельминтизация привела к уменьшению представленности Atorobiaceae по сравнению с группой неинвазированных детей и пациентами с инвазией.

Таблица 3 – Различия в составе кишечной микробиоты на уровне семейств

Семейство микроорганизмов	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p [#]
Enterobacteriaceae	31,62 (9,94)	150,61(48,97)*	21,03 (6,76)**	< 0,01
Atorobiaceae	12,44(4,9)	6,69 (3,24)	0,57 (0,24) ***	< 0,01

Примечание – данные представлены в виде $\text{emmean} \pm \text{SE}$; [#] различия в представленности таксонов статистически значимы при уровне $p < 0,05$ (ANOVA, значения p даны с поправкой FDR); * различия значимы при сравнении с Группой 1, $p < 0,05$; ** различия значимы при сравнении с Группой 2, $p < 0,05$; *** различия значимы при сравнении с Группой 1 и Группой 2, $p < 0,05$.

Различия в представленности бактерий на уровне рода между исследуемыми группами представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Различия в составе кишечной микробиоты на уровне родов

Род микроорганизмов	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p [#]
<i>Escherichia-Shigella</i>	27,71 (9.21)	131,61 (45.48)*	18,66 (6.21)**	<0,01
<i>Lachnospira</i>	2,67 (0.78)	9,70 (2.83)*	4,04 (1.27)**	0,03
<i>Anaerospobacter</i>	0,18 (0.10)	1,50 (0.70)*	0,02 (0.02)**	<0,01
<i>Ruminiclostridium 6</i>	1,72 (0.73)	6,24 (2.33)*	1,69 (0.66)**	0,04
Группа <i>Eubacterium eligens</i>	3,42 (1.13)	13,00 (4.53)*	5,63 (1.73)	0,04
<i>Faecalitalea</i>	0,02 (0.02)	0,52 (0.29)*	1,21 (0.66)*	0,04
<i>Bacteroides</i>	105,37 (24.28)	238,04 (50.03)*	235,06 (51.92)*	0,04
<i>Barnesiella</i>	2,54 (0.81)	7,81 (2.80)*	8,97 (3.19)*	0,04
<i>Blautia</i>	789,02 (90.70)	444,76 (50.65)*	685,46 (79.62)**	0,02
Группа <i>Eubacterium hallii</i>	182,82 (22.52)	110,84 (13.55)*	123,77 (15.43)	0,04
<i>Lachnospiraceae</i> FCS020	13,90 (2.13)	6,96 (1.09)*	10,02 (1.57)	0,04
<i>Flavonifractor</i>	0,36 (0.16)	0,95 (0.33)	1,68 (0.57)*	0,03
<i>Leuconostoc</i>	0,12 (0.10)	0,52 (0.37)	4,60 (3.24)*	0,03
<i>Oscillibacter</i>	0,99 (0.26)	2,19 (0.53)	3,05 (0.88)*	0,04

Продолжение таблицы 4

Род микроорганизмов	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p [#]
Группа <i>Ruminococcus gnavreaii</i>	45,35 (9.55)	26,35 (5.86)	18,38 (4.13)*	0,04
<i>Howardella</i>	3,39 (1.10)	1,14 (0.39)	0,79 (0.28)*	0,04
<i>Slackia</i>	3,04 (0.87)	1,96 (0.57)	0,79 (0.25)*	0,04
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i>	11,35 (2.13)	18,14 (3.34)	6,23 (1.21)**	<0,01
<i>Lachnospiraceae ND3007</i>	6,15 (1.53)	7,86 (1.97)	3,04 (0.93)**	0,04
<i>Tyzzerella 4</i>	1,45 (0.74)	3,10 (1.54)	0,25 (0.14)**	0,03
<i>Prevotella 2</i>	2,14 (1.28)	11,62 (6.78)	0,75 (0.46)**	0,04
<i>Megasphaera</i>	16,96 (11.86)	18,52 (12.82)	0,04 (0.04)***	<0,01
<i>Roseburia</i>	54,37 (9.86)	53,60 (9.38)	27,8 (4.97)***	0,03
<i>Olsenella</i>	3,51 (1.42)	2,26 (0.91)	0,25 (0.12)***	<0,01
Группа <i>Rikenellaceae RC9</i>	2,31 (1.36)	2,70 (1.57)	0,13 (0.09)***	0,02
<i>Sellimonas</i>	1,49 (0.76)	1,08 (0.55)	19,4 (9.71)***	<0,01
<i>Faecalibacterium</i>	0,90 (0.32)	2,07 (0.61)	5,94 (1.79)***	<0,01
<i>Erysipelatoclostridium</i>	1,13 (0.45)	1,10 (0.37)	3,40 (1.38)***	0,04
<i>Varibaculum</i>	0,02 (0.02)	0,18 (0.10)	2,48 (1.22)***	<0,01
<i>Eisenbergiella</i>	1,18 (0.58)	0,88 (0.43)	9,40 (4.51)***	0,01
Примечание– данные представлены в виде $\text{emmean} \pm \text{SE}$; [#] различия в представленности таксонов статистически значимы при уровне $p < 0,05$ (ANOVA, значения p даны с поправкой FDR);* различия значимы при сравнении с Группой 1, $p < 0,05$; ** различия значимы при сравнении с Группой 2, $p < 0,05$; *** различия значимы при сравнении с Группой 1 и Группой 2, $p < 0,05$.				

Состояние микробиоты кишечника в зависимости от интенсивности инвазии. На уровне типов выявлено, что рост представленности Firmicutes ($R = 0,55$, $p < 0,01$) и Tenericutes ($R = 0,57$, $p = 0,02$) положительно связан с интенсивностью инвазии. Содержание бактерий, относящихся к типам Verrucomicrobia ($R = -0,4$, $p = 0,02$) и Proteobacteria ($R = -0,36$, $p = 0,04$), напротив, уменьшалось при увеличении интенсивности инвазии. На уровне семейств выявлена ассоциация интенсивности инвазии с представленностью Desulfovibrionaceae ($R = 0,33$, $p = 0,02$) и Erysipelotrichaceae ($R = 0,52$, $p < 0,01$), и отрицательная связь для Bifidobacteriaceae ($R = -0,55$, $p < 0,01$). Соответствующие тенденции отмечены на уровне родов: представленность бактерий родов *Desulfovibrio* ($R = 0,41$, $p = 0,01$), *Catenibacterium* ($R = 0,62$, $p = 0,03$), группы *Eubacterium coprostanoligenes* ($R = 0,3$, $p = 0,01$), *Mitsuokella* ($R = 0,48$, $p = 0,03$), группы *Rikenellaceae RC9* ($R = 0,57$, $p = 0,03$), *Ruminococcaceae UCG-003* ($R = 0,34$, $p = 0,03$), *Moryella* ($R = 0,42$, $p = 0,03$), *Olsenella* ($R = 0,46$, $p = 0,01$), *Candidatus Soleaferrea* ($R = 0,57$, $p = 0,03$), *Howardella* ($R = 0,52$, $p = 0,01$), *Enterorhabdus* ($R = 0,39$, $p = 0,04$), и *Senegalimassilia* ($R = 0,44$, $p = 0,03$) коррелировала

с интенсивностью инвазии *O. felineus*. Отрицательная ассоциация установлена между интенсивностью инвазии и представленностью родов *Erysipelatoclostridium* ($R = -0,51$, $p = 0,01$), *Bifidobacterium* ($R = -0,55$, $p = 0,01$), *Anaerostipes* ($R = -0,49$, $p = 0,01$), *Gordonibacter* ($R = -0,54$, $p = 0,01$), *Akkermansia* ($R = 0,4$, $p = 0,04$) и группы *Eubacterium hallii* ($R = -0,37$, $p = 0,01$).

Особенности микробиоты кишечника в зависимости от клинических проявлений инвазии *O. felineus*. В сравнительном аспекте у пациентов с клинически выраженной формой с явлениями холепатии (группа 2А) в образцах кишечной микробиоты зарегистрированы снижение представленности микроорганизмов семейства Methanobacteriaceae, рода *Senegalimassilia* и повышение Pasteurellaceae, Staphylococcaceae и рода *Holdemanella* в сравнении с группами 2В и 2С (табл.5). Образцы микробиоты кишечника пациентов группы 2В отличались более высоким содержанием бактерий рода *Lachnospiraceae* UCG-001 и снижением представленности Atorobiaceae в сравнении с группами 2А и 2С. В то же время, более высокие уровни Methanobacteriaceae, Atorobiaceae и рода *Senegalimassilia* зарегистрированы у пациентов с латентной формой.

Таблица 5 – Различия в составе метагенома между подгруппами пациентов с инвазией

Семейство/Род	Группа 2А	Группа 2В	Группа 2С	p [#]
Methanobacteriaceae	7,29(0,66)*	14,33(1,09)*	18,29 (1,04)*	<0,01
Staphylococcaceae	17,76 (8,7)	2,5(1,52)**	2 (1,03)**	0,04
Atorobiaceae	5,59(2,79)*	0,42(0,31)*	20,24 (9,94)*	0,01
Pasteurellaceae	4,35(2,1)	0,58 (0,39)**	0,47(0,28)**	0,04
<i>Holdemanella</i>	55,59 (1,81)*	25,33 (1,45)*	32,06 (1,37)*	<0,01
<i>Senegalimassilia</i>	6,59 (0,62)	9,42 (0,89)**	11,41 (0,82)**	<0,01
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-001	0,71 (0,35)***	16,58 (8,1)	0,76 (0,38)***	<0,01

Примечание – данные для каждого таксона в группе представлены в виде $M \pm SD$;[#] различия в представленности таксонов статистически значимы при уровне $p < 0,05$ (ANOVA, значения p даны с поправкой FDR); * различия значимы при сравнении между группами, $p < 0,05$; ** различия значимы при сравнении с Группой 2А, $p < 0,05$; *** различия значимы при сравнении с Группой 2В, $p < 0,05$.

Сравнение интенсивности инвазии, выраженной в количестве яиц *O. felineus* в одном грамме стула, в подгруппах показало, что пациенты с клинически выраженной формой с явлениями гастроуденопатии характеризуются более высоким уровнем интенсивности инвазии, чем дети с симптомами холепатии (коэффициент линейной модели $1,16 \pm 1,47$, $p = 0,03$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиота кишечника детей, страдающих инвазией *O. felineus*, характеризуется увеличением представленности бактерий с патогенным потенциалом, таких как Proteobacteria,

Enterobacteriaceae, *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides*, и снижением представленности комменсальных, с потенциальным противовоспалительным эффектом, Firmicutes (*Blautia*, *Eubacterium hallii*, *Lachnospiraceae* FCS020). По данным предыдущих исследований микробиоты кишечника подобные особенности состава ассоциированы с воспалительными заболеваниями гепатобилиарной системы и кишечника (в соответствии с результатами предыдущих исследований). На фоне инвазии *O. felineus* выявлено повышение содержания отдельных бактерий, участвующих в продукции короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и имеющих противовоспалительный потенциал (*Lachnospira*, *Ruminiclostridium* 6, *Eubacterium eligens*, *Faecalitalea*, *Barnesiella*), что демонстрирует возможности компенсаторного механизма микробиоты кишечника в поддержании гомеостаза при гельминтной инвазии.

Более высокая интенсивность инвазии связана с увеличением представленности бактерий с патогенным потенциалом (*Desulfovibrionaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Desulfovibrio*, *Candidatus Soleaferrea*, *Rikenellaceae* RC9, *Catenibacterium*), и снижением бактерий с потенциальными пробиотическими свойствами *Bifidobacterium* и *Akkermansia*, что сопряжено с увеличением риска развития аллергических и аутоиммунных болезней.

Через три месяца после антигельминтной терапии происходит восстановление представленности микроорганизмов Firmicutes и Proteobacteria, измененных на фоне инвазии *O. felineus*, и снижается представленность бактерий, ассоциированных с патологией гепатобилиарной системы (род *Megasphaera*) и некоторых бактерий с патогенным потенциалом (*Synergistetes*, *Atorobiaceae*, *Prevotella* 2, *Howardella*, *Slackia*). После терапии отмечается увеличение представленности важнейших продуцентов бутирата в кишечнике - бактерий рода *Faecalibacterium*.

Таким образом, инвазия *O. felineus* у детей и подростков в эндемичном регионе вносит вклад в особенности микробиоты кишечника, которые сопряжены с патологией пищеварительного тракта. Результаты проведенного исследования позволили сформулировать гипотезу о вкладе таксономического разнообразия микробиоты кишечника в развитие хронических неинфекционных заболеваний на фоне описторхоза (рисунок 3).

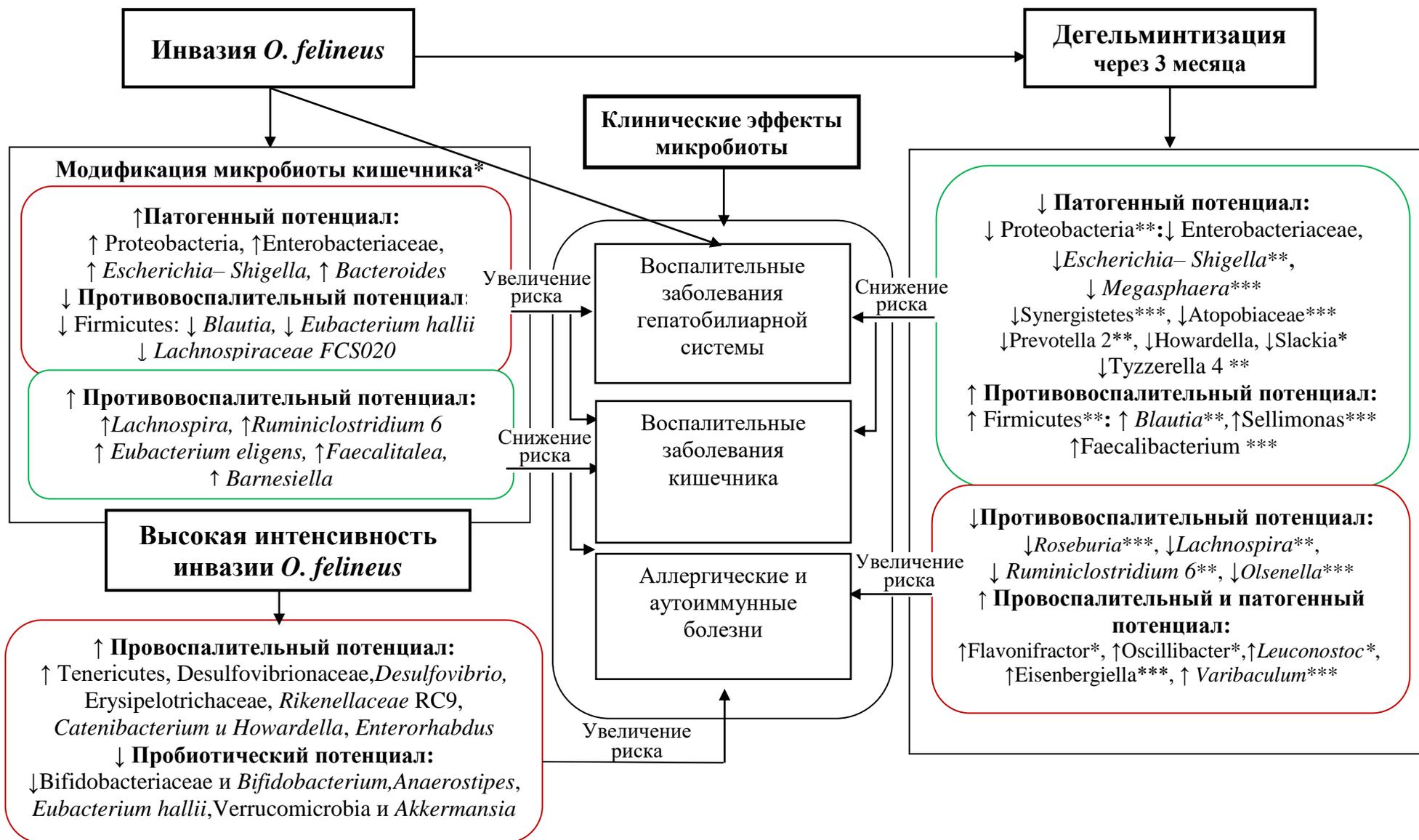


Рисунок 3 – Вклад особенностей состава микробиоты кишечника в зависимости от наличия и интенсивности инвазии *O. felinus* в развитии хронических неинфекционных заболеваний.

Примечание – * различия значимы при сравнении с Группой 1, $p < 0,05$; ** различия значимы при сравнении с Группой 2, $p < 0,05$; *** различия значимы при сравнении с Группой 1 и Группой 2, $p < 0,05$.

Выводы

1. Распространенность инвазии *O. felineus* у детей, проживающих в эндемичном регионе (Томская область), составляет 17,6 % и увеличивается с возрастом (11,6 % - в группе детей 7–10 лет, 23,8 % - у подростков). У детей и подростков преобладает низкая интенсивность инвазии (93,3 %). Инвазия *O. felineus* у детей ассоциирована с изменениями желчного пузыря в виде утолщения и неровности стенки, наличия экзогенного содержимого (OR = 1,9; 95 % CI 1,2–3,1; $p = 0,012$) и признаками перидуктального фиброза первой степени (OR = 3,1; 95 % CI 1,0–9,7; $p = 0,04$) по данным ультразвукового исследования.
2. Инвазия *O. felineus* вносит вклад в β -разнообразие кишечной микробиоты ($R^2 = 0,05$; $p = 0,01$). Выявлена положительная связь между интенсивностью инвазии *O. felineus*, измеряемой как количество яиц на грамм стула, и α -разнообразием кишечной микробиоты. Микробиота кишечника детей, страдающих инвазией *O. felineus*, характеризуется увеличением представленности бактерий с патогенным потенциалом (Proteobacteria, Enterobacteriaceae, *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides*), участвующих в продукции КЦЖК и противовоспалительным потенциалом (*Lachnospira*, *Ruminiclostridium* 6, *Eubacterium eligens*, *Faecalitalea*, *Barnesiella*) и снижением представленности комменсальных Firmicutes (*Blautia*, *Eubacterium hallii*, *Lachnospiraceae* FCS020).
3. Интенсивность инвазии *O. felineus* оказывает влияние на кишечную микробиоту, изменяя представленность бактерий на разных таксономических уровнях. Выявлена ассоциация с относительной численностью Desulfovibrionaceae (род *Desulfovibrio*), Erysipelotrichaceae, *Catenibacterium*, *Eubacterium coprostanoligenes*, *Senegalimassilia*, *Mitsuokella*, *Ruminococcaceae* UCG-003, *Enterorhabdus*, *Howardella*, *Olsenella*, *Moryella*, *Rikenellaceae* RC9 и отрицательная связь для Bifidobacteriaceae (род *Bifidobacterium*), *Akkermansia*, *Anaerostipes*, *Eubacterium hallii*, *Ruminococcus gnavus*, *Erysipelatoclostridium*, *Gordonibacter* в зависимости от интенсивности инвазии.
4. После дегельминтизации празиквантелом отмечается положительная клиническая динамика в виде снижения частоты болевого синдрома (92 % против 40 %, $p < 0,01$), тошноты (52 % против 8 %, $p < 0,01$), зудящих кожных высыпаний (24 % против 6 %, $p < 0,01$), а также значимое снижение признаков патологических изменений желчного пузыря в сравнении с исходными результатами по результатам УЗИ (28 % и 42 %, соответственно, $p = 0,03$). Антигельминтная терапия через три месяца приводит к изменению представленности комменсальных Firmicutes и провоспалительных Proteobacteria до значений, сопоставимых с уровнем данных таксонов у детей, не страдающих инвазией, а также к изменению численности отдельных бутират–продуцирующих (снижению *Roseburia* и увеличению *Faecalibacterium*), снижению условно–патогенных бактерий (*Synergistetes*, *Atopobiaceae* и др.) и повышению

некоторых потенциально провоспалительных бактерий (*Flavonifractor*, *Oscillibacter*, *Eisenbergiella*, *Varibaculum*). Изменения в некоторых микробиотических сообществах, выявленных у пациентов с инвазией, сохраняются в течение трех месяцев после дегельминтизации (*Barnesiella*, *Bacteroides*, *Faecalitalea*, группы *Eubacterium hallii* и *Eubacterium eligens*, *Lachnospiraceae* FCS020).

5. Клинически выраженная форма описторхоза с явлениями холепатии, ассоциирована с повышением представленности потенциально патогенных *Staphylococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Holdemanella*. Микробиота пациентов с латентной формой инвазии характеризуется более высоким содержанием *Methanobacteriaceae*, *Atopobiaceae*, *Senegalimassilia* в сравнении с другими формами. В образцах микробиоты пациентов с симптомами гастродуоденопатии выявлено повышение представленности *Lachnospiraceae* UCG-001.

6. Микробиота кишечника на фоне инвазии *O. felineus*, характеризуется увеличением представленности бактерий, ассоциированных с воспалительными заболеваниями гепатобилиарной системы и кишечника. Более высокая интенсивность инвазии связана с изменениями микробиоты, сопряженными с увеличением риска развития болезней пищеварительного тракта. Дегельминтизация приводит к снижению представленности бактерий, ассоциированных с развитием заболеваний гепатобилиарной системы.

Практические рекомендации

1. Для планирования объемов медицинской помощи в эндемичных по описторхозу регионах следует учитывать, что распространенность инвазии *Opisthorchis felineus* составляет 11,6 % в популяции детей 7–10 лет, 23,8 % - у подростков, в структуре интенсивности инвазии у детей преобладает низкая интенсивность инвазии (93,3 %).
2. В связи с недостаточной осведомленностью детского населения о механизмах передачи инвазии *Opisthorchis felineus* и мерах профилактики необходимы разработка и внедрение образовательных программ для детей и подростков.
3. Сформированная база данных, содержащая метагеномные данные о составе микробиоты кишечника (DOI:10.5281/zenodo.4304728) может быть использована для научно-исследовательских и клинических задач.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Opisthorchis felineus* in Shegarsky district, Western Siberia: preliminary results of a cross-sectional study / O.S. Fedorova, Y.V. Kovshirina, S.V. Mazeina, M.M. Fedotova, **T.S. Sokolova**, E.A. Golovach, A.E. Kovshirina, I.V. Saltykova, S.S. Gutor, L.M. Ogorodova, P. Odermatt // Материалы конференции NTDAAsia. – Таиланд, г. Кхонкен, 2017.
2. *Opisthorchis felineus* infection prevalence in Western Siberia: a review of Russian literature/ O.S. Fedorova, M.M. Fedotova, **T.S. Sokolova** [et al.] // **Acta Tropica**. – 2018. – N 178. – P. 196-204. ИФ Scopus: 4,6 (Q2)

3. Building control programs locally / O.I. Zvonareva, A.E. Kovshirina, O.S. Fedorova, E.A. Golovach, **T.S. Sokolova** // «ICOPA»: 14 международный конгресс паразитологов. – Южная Корея, г. Тэгу, 2018.
4. Фундаментальные подходы к оптимизации диагностики и терапии инвазии *Opisthorchis felineus* в эндемичных регионах: методология исследования / О.С. Федорова, Ю.В. Ковширина, М.М. Федотова, И.В. Салтыкова, **Т.С. Соколова**, Е.А. Головач, В.А. Петров, Ю.Б. Дорофеева // Вестник РФФИ. – 2018. – Том 100, N 4. – С. 67-69.
5. Современные данные о распространенности, факторах риска и клинических аспектах инвазии *Opisthorchis felineus* у детей в эндемичном регионе / **Т.С. Соколова**, Е.А. Головач, В.А. Петров, О.С. Федорова // **Фарматека**. – 2019. – Том 25, N 1. – С. 56-60. ИФ (РИНЦ): 0,265.
6. Взаимодействие гельминтов и микробиоты кишечника: значение в развитии и профилактике хронических неинфекционных заболеваний / **Т.С. Соколова**, О.С. Федорова, И.В. Салтыкова [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2019. – N 3. – С. 214-225. ИФ (РИНЦ): 0,757.
7. Современные данные о распространенности инвазии *Opisthorchis felineus* / **Т.С. Соколова**, О.С. Федорова, Е.А. Головач [и др.] // Сборник тезисов XXI конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». – Москва, 2019.
8. Таксономическое разнообразие кишечной микробиоты и его клиническое значение на фоне инвазии *Opisthorchis felineus* у детей / **Соколова Т.С.**, Петров В.А., Дорофеева Ю.Б. // **Педиатрическая фармакология**. – 2019. – N 1 – С. 44. ИФ (РИНЦ): 0,775.
9. *Opisthorchis felineus* infection in Western Siberia: update on prevalence, risk factors and impact on human health / O.S. Fedorova, M.M. Fedotova, L.M. Ogorodova., Y.V. Kovshirina, A.E. Kovshirina, **T.S. Sokolova**, S.V. Mazeina, V.A. Petrov, J. Hattendorf // Материалы конференции NTDAAsia. – Таиланд, г. Кхонкен, 2019.
10. Влияние инвазии *Opisthorchis felineus* на состояние здоровья детей в эндемичном регионе / **Соколова Т.С.**, Головач Е.А., Коновалова У.В. // Материалы V конференции студентов и молодых ученых «Педиатрические чтения». – Москва, 2019. – С. 50.
11. *Opisthorchis felineus* infection, risks, and morbidity in rural Western Siberia, Russian Federation / O.S. Fedorova, M.M. Fedotova, O.I. Zvonareva, S.V. Mazeina, Y.V. Kovshirina, **T.S. Sokolova**, E.A. Golovach, A.E. Kovshirina, U.V. Konovalova, I.L. Kolomeets, S.S. Gutor, V.A. Petrov, J. Hattendorf, L.M. Ogorodova, P. Odermatt // **PLOS Neglected Tropical Diseases**. – 2020. – Vol. 6, N 14. – P. e0008421. – DOI 10.1371/journal.pntd.0008421. ИФ Scopus: 7,1 (Q1)
12. The impact of *Opisthorchis felineus* infection and praziquantel treatment on the intestinal microbiota in children/ **T.S. Sokolova**, V.A. Petrov, I. V. Saltykova [et al.] // **Acta Tropica**. – 2021. – P. 105835. – DOI 10.1016/j.actatropica.2021.105835. ИФ Scopus: 5,1 (Q2)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения	кислота
ГБС – гепатобилиарная система	<i>O. felineus</i> - <i>Opisthorchis felineus</i>
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	<i>O. viverrini</i> - <i>Opisthorchis viverrini</i>
КЦЖК – короткоцепочные жирные кислоты	OR – odds ratio – отношение шансов
УЗИ – ультразвуковое исследование	CI – confidence interval – доверительный интервал
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая	

Подписано в печать «__» _____ 2021 г.

Усл.авт.листов 1.

Отпечатано в издательстве СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2
Заказ №1 Тираж 100 экземпляров