

И.А. Беляева<sup>1</sup>, Е.П. Бомбардинова<sup>1</sup>, Т.В. Турти<sup>1, 2</sup>, М.Д. Митиш<sup>1</sup>, Т.В. Потехина<sup>1</sup><sup>1</sup> Научный центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

# Кишечная микробиота у недоношенных детей — современное состояние проблемы (обзор литературы)

## Контактная информация:

Беляева Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, заведующая отделением для недоношенных детей ФГБНУ «Научный центр здоровья детей»

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-15-19, e-mail: belyaeva@nczd.ru

Статья поступила: 24.01.2015 г., принята к печати: 05.05.2015 г.

Проблема влияния микробиоты кишечника на состояние здоровья детей раннего возраста приобрела особую актуальность в последние годы. Это связано, с одной стороны, со значительным ухудшением экологии среды обитания человека, с другой — с высокой частотой расстройств пищеварения у детей, особенно родившихся преждевременно. Внедрение современных высокоинформативных молекулярно-генетических методов исследования (ПЦР-амплификация с секвенированием генов) позволило выявить начальный этап микробной колонизации человека еще в периоде внутриутробного онтогенеза и подробно расшифровать структуру микробиоты у новорожденных и младенцев 1-го года жизни. Установлено, что на количественную выраженность и качественный состав кишечной микробиоты влияет состав микробиоты матери, который зависит от наличия/отсутствия у нее не только воспалительных, но и метаболических болезней (ожирения). Обнаружено, что имеется достоверная связь состава микробиоты у младенцев со способом родоразрешения их матерей (более благоприятный состав после естественных родов), причем указанные различия сохраняются на протяжении нескольких месяцев после рождения. Один из основных факторов, влияющих на микробиоту с первых дней, — питание; большинство исследований убедительно подтверждают роль грудного вскармливания в становлении оптимального микробиоценоза у младенца. Антибактериальная терапия, получаемая матерью и/или ребенком, оказывает негативное воздействие на колонизацию кишечника микробами-симбионтами. Негативные внешние влияния на микробиоту особенно значимы у недоношенных детей, прежде всего у родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела. Онтогенез этих младенцев наиболее отягощен вредными факторами (инфекцией и необходимостью массивной антибактериальной терапии, гипоксией, оперативным родоразрешением, вынужденным искусственным вскармливанием) на фоне общей незрелости, в том числе несформированности защитных механизмов организма. Направленная коррекция микробиоты у недоношенных детей является важным условием профилактики и лечения таких грозных заболеваний, как сепсис и некротизирующий энтероколит. Именно поэтому использование препаратов-пробиотиков представляется одним из перспективных направлений практической неонатологии. В статье приводится пример исследования эффективности пробиотикотерапии у недоношенных детей с сочетанной перинатальной патологией.

**Ключевые слова:** недоношенные дети, вскармливание, кишечная микробиота, микробиом, пробиотики.

**(Для цитирования:** Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Турти Т.В., Митиш М.Д., Потехина Т.В. Кишечная микробиота у недоношенных детей — современное состояние проблемы (обзор литературы). *Педиатрическая фармакология*. 2015; 12 (3): 296–303. doi: 10.15690/pf.v12i3.1354)

I.A. Belyaeva<sup>1</sup>, E.P. Bombardirova<sup>1</sup>, T.V. Turti<sup>1, 2</sup>, M.D. Mitish<sup>1</sup>, T.V. Potekhina<sup>1</sup><sup>1</sup> Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russia<sup>2</sup> Pirogov National Research Medical University, Moscow, Russia

## Intestinal Microbiota in Premature Children — the Modern State of the Problem (Literature Analysis)

The problem of intestinal microbiota influencing the health of early aged children has become especially relevant over the past few years. On one hand, this is due to the significant worsening of the human environment ecology, on the other — due to the high prevalence of digestive disorders in children, especially premature ones. The introduction of modern high-informative molecular-genetic research methods (PCR-amplification with gene sequenation) made it possible to reveal the primary stage of human colonization by bacteria even at the stage of fetal ontogenesis and to thoroughly decode the microbiota structure in newborns and first-year babies. It is established, that the mothers microbiota has a direct effect on the quantity and quality of the child's microbiota. The mother's microbiota depends not only on her possessing inflammatory, but also metabolic diseases (obesity). There is also a direct correlation between the children's microbiota and the way they were born (microbiota is better in cases of natural birth), and these differences are prevalent after a number of months after birth. One of the main factors affecting microbiota after birth from the very first day is nutrition. Most studies earnestly confirm the role of breastfeeding in contributing to an optimal microbiocenosis in the child. Antibacterial therapy, being received by either the mother or the child has a negative effect on the colonization of the intestines by symbiont microbes. The negative impacts on the micro flora are especially significant for premature children especially those born with a very low and extremely low body mass. The ontogenesis of these children is most severed by malicious factors (infections followed by the necessity of a massive antibacterial therapy, hypoxia, surgical birth, forced artificial feeding) in connection with a general immaturity, including not yet fully-fledged body defense systems. Directive microbiota correction in premature children is an important condition for prevention and treatment of such severe diseases as sepsis necrotizing enterocolitis. For this reason, the usage of probiotics is considered as one of the promising practices of practical neonatology. The article contains an example of studying the effectiveness of probiotic therapy in premature babies with a combined perinatal pathology.

**Key words:** premature children, feeding, intestine microbiota, microbiom, probiotics.

**(For citation:** Belyaeva I.A., Bombardirova E.P., Turti T.V., Mitish M.D., Potekhina T.V. Intestinal microbiota in premature children — the modern state of the problem (literature analysis). *Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology*. 2015; 12 (3): 296–303. doi: 10.15690/pf.v12i3.1354)

## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Процессы онтогенеза в человеческой популяции определяются влиянием на генетический код макроорганизма факторов внутренней и внешней среды. К комплексу подобных факторов относятся взаимоотношения человека и микроорганизмов. Взаимосвязи подобных физиологических процессов изучены еще недостаточно; значительное разнообразие микроорганизмов, составляющих микробиоту, сложилось в ходе длительной эволюции баланса между иммунитетом хозяина и микробным ростом [1].

Под микробиотой человека подразумевают комплекс бактерий, колонизирующих поверхности и открытые полости организма — кожу, дыхательные пути, мочеполовую систему и желудочно-кишечный тракт. Кишечная микробиота является наиболее обширным микробным сообществом человека: в сравнении с общим количеством клеток и генов в организме человека в составе только кишечной микробиоты их больше в 10 и 150 раз, соответственно. В настоящее время многие микробиологи рассматривают совокупность всех микроорганизмов, населяющих тело человека, в качестве «суперорганизма» [2].

Установлено, что микробиота кишечника играет одну из ключевых ролей в поддержании здоровья человека через воздействие на метаболические и иммунологические процессы. Состав кишечной флоры у взрослого человека уникален: выделено 3 энтеротипа в зависимости от преобладания определенных видов микробов [3], что создает индивидуальную иммунологическую толерантность к «своим» бактериям.

Как установлено в последние годы, нарушения кишечной микробиоты приводят не только к патологии желудочно-кишечного тракта, но и косвенно связаны с заболеваниями сердечно-сосудистой и эндокринной системы (ожирение, сахарный диабет), atopической патологией и даже с онкологическими, психическими и аутоиммунными заболеваниями [4–8].

Особое значение приобретают нарушения формирования микробиоты у детей первых месяцев жизни, поскольку воздействия в критические периоды онтогенеза создают предпосылки для отсроченной патологии, связанной прежде всего с нарушениями созревания иммунной системы кишечника [9, 10]. Установлено, что снижение разнообразия микробиоты в раннем детстве повышает риск atopии [11], а также способствует нарушениям метаболического программирования через срыв регуляции роста эпителиоцитов [12].

До недавнего времени почти не было сведений о микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у детей с очень низкой массой тела при рождении, так как традиционными культуральными методами выявлялось лишь 20% микробов, его населяющих [13]. Достижения молекулярных технологий позволили существенно расширить знания о микробиоте человека, в том числе у новорожденных недоношенных детей.

Для недоношенных детей микробный мир гастроинтестинального тракта имеет решающее значение в поддержании целостности кишечного барьера, повреждение которого может привести к сепсису, некротическому энтероколиту (НЭК) и синдрому системной воспалительной реакции [14]. Отдаленные исходы повреждения органов при синдроме системной воспалительной реакции связаны с серьезными заболеваниями у недоношенных детей, в том числе с поражением головного мозга (перивентрикулярная лейкомаляция) и повреждением легких (хронические заболевания легких) [14]. Состав микрофлоры ЖКТ, связанный с оптимальным здоровьем, пока

неизвестен; однако, общий вывод исследований у младенцев с очень низкой массой тела (ОНМТ) — уменьшение разнообразия микробиоты ЖКТ и более высокая патогенная нагрузка [13, 15–18].

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА

В прошлом веке исследования микробиоты ЖКТ были основаны на культуральной методике с определением рода, вида и даже штамма при помощи комплекса морфологических и биохимических тестов. Тем не менее, до 80% кишечных микробов оставались за рамками идентификации культуральными методами [13]. В течение последнего десятилетия были разработаны молекулярно-генетические технологии, что стало революционным шагом в исследовании микробиома.

Высокопроизводительная методика секвенирования 16S гена рибосомальной РНК (рРНК) является наиболее распространенным подходом, применяемым для характеристики микробного сообщества. Участок с геном 16S рРНК, представляющий собой небольшую часть РНК, имеется у всех организмов и содержит области высококонсервативных последовательностей в сочетании с гипервариабельными регионами. Селективная амплификация этих гипервариабельных областей с последующим секвенированием является современным эффективным способом характеристики микробных сообществ [19].

Для получения информации о количестве и функциональной активности микробных сообществ помимо 16S рРНК-секвенирования все чаще используются метагеномные, метатранскриптомные, метапротеомные, метаболомные подходы [20]. Метагеном включает совокупность геномов всего сообщества, включая бактерии, грибы, вирусы и простейшие. С целью анализа метагенома извлекается ДНК. Два штамма любого данного вида бактерий могут отличаться по содержанию ДНК на целых 25%, что и определяет их свойства для макроорганизма — безвредные, комменсальные или патогенные.

Следующим шагом является определение не только присутствующих в микробиоме генов, но и экспрессии генов (метатранскриптомика) или белков (метапротеомика) в мРНК [20]. В настоящее время метатранскриптомный анализ микробиома ЖКТ ограничен в связи с присущей РНК нестабильности и трудностью экстракции из биологической среды. Метапротеомика в данном случае — привлекательная альтернатива, хотя также имеет ограничения, обусловленные аналитическими проблемами в связи с недостаточностью справочной базы данных. Метаболомный анализ проводится с использованием масс-спектрометрии или спектрометрии на основе магнитного резонанса для мониторинга в образце всего набора небольших молекул, произведенных микробами или клетками хозяина [20].

Благодаря использованию современных методик в ЖКТ взрослого человека были идентифицированы более 1000 видов бактерий, составляющих три основных фила: *Bacteroides*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*.

## КИШЕЧНАЯ МИКРОБИОТА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Основные представления о формировании микробиоты ЖКТ у новорожденных детей были получены при исследовании доношенных детей: лишь немногие работы включали недоношенных и маловесных новорожденных.

До недавнего времени считалось, что ЖКТ здорового доношенного новорожденного стерилен, однако новые

доказательства внутриутробной бактериальной транслокации [21] и наличие микробной рибосальной РНК (pРНК) в меконии новорожденных подтвердили, что кишечник младенца заселен еще до рождения [22, 23]. Выявление липополисахарида бактерий в пуповинной крови доношенных новорожденных свидетельствует о наличии процесса внутриутробной транслокации [24]. При оральном введении генетически маркированного *Enterococcus faecium* беременным мышам обнаружено его присутствие в меконии мышат, родившихся оперативным путем, что демонстрирует возможность пренатальной микробной передачи [21].

Активная колонизация ЖКТ новорожденного бактериями начинается сразу же после рождения. У здоровых доношенных новорожденных индигенные бактерии колонизируют поверхности слизистой оболочки и кишечник в типичной последовательности, включающей четыре фазы [25, 26].

**Фаза I** указывается в качестве начального этапа заселения и длится от рождения до 2 нед. Во время этой фазы стрептококки и бактерии кишечной группы, т.е. представители аэротолерантной флоры, преобладают в кишечнике. Грамположительные неспорообразующие анаэробы появляются позже и включают в основном бифидо- либо лактобактерии в зависимости от вида вскармливания — грудного или искусственного, соответственно. Обнаруживаются также *Clostridium* и *Bacteroides*, но в меньших количествах, чем на поздних этапах постнатального развития.

**Фаза II** включает период грудного вскармливания и продолжается с конца I фазы до начала введения в рацион твердой пищи. Во время фазы II постепенно увеличивается количество *Bacteroides*.

**Фаза III** занимает оставшееся время между началом прикорма и полным прекращением кормления грудью. Этот этап продолжается до тех пор, пока флора ребенка полностью не формируется (**IV фаза**) [27].

Младенческая микробиота более изменчива в своем составе и менее стабильна во времени по сравнению с микробиоценозом взрослого [13, 27–29]. Относительная стабильность взрослой микробиоты также была поставлена под сомнение в недавнем исследовании, подтверждающем, что изменение пищевого рациона в течение одной недели достаточно, чтобы повлиять на состав кишечной микробиоты [30].

Микробная колонизация у младенцев может быть подвержена значительному влиянию экзогенных факторов, включая способ родоразрешения, тип вскармливания, использование антибиотиков и особенности введения прикорма.

### **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА РОДРАЗРЕШЕНИЯ НА СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

Младенцы, рожденные посредством кесарева сечения, имеют различия в составе микробиоты ЖКТ по сравнению с детьми после естественных родов; некоторые из этих различий сохраняются в течение раннего детства [15, 28, 29, 31–33]. За сравнительно короткий период времени новорожденный после вагинальных родов формирует начальный кишечный микробиом, который состоит в основном из материнских вагинальных и кишечных микроорганизмов. В отличие от этого младенцы, рожденные путем кесарева сечения, подвергаются начальной контаминации бактериями из окружающей среды (флора медицинских работников и кожи матери) [34].

У доношенных детей после вагинальных родов в составе микробиоты ЖКТ отмечается бактериальное разнообра-

зие (количество разных видов) и равномерность распределения видов микроорганизмов [31, 32], при этом в количественном отношении выделяется больше микробов родов *Bacteroides* и *Bifidobacteria*, чем у младенцев после оперативных родов. Некоторые данные свидетельствуют о том, что дети, рожденные оперативным путем, сохраняют меньшее количество и разнообразие микробной флоры кишечника в возрасте 4 мес по сравнению с младенцами после естественных родов [32].

Состав кишечной микробиоты у детей, рожденных путем кесарева сечения (большой удельный вес анаэробов, в частности *Clostridium difficile*), по мнению многих специалистов, достоверно связан с повышенным риском развития у детей аллергических заболеваний — бронхиальной астмы и атопического дерматита, а также метаболических нарушений [11, 35].

В то же время в работе Azad и соавт. [32] показано, что *Escherichia* и *Shigella* недостаточно представлены, а тип *Bacteroidetes* не был обнаружен в 4 мес у младенцев, родившихся доношенными путем кесарева сечения, по сравнению с детьми после вагинальных родов. В противоположность вышеуказанным исследованиям, авторы не наблюдали различий в распространенности *C. difficile*, а также в относительном содержании *Bifidobacterium* или *Clostridium* в зависимости от способа родоразрешения.

### **ВЛИЯНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

Большинство детей, родившихся с ОНМТ, получают антибиотики широкого спектра действия в раннем неонатальном периоде, что приводит к неадекватной колонизации кишечника в I фазу [36] с наблюдаемой обратной корреляцией между продолжительностью курса антибактериальной терапии в 1-й мес после рождения и микробным разнообразием, а также общим количеством бактерий в кишечнике [37]. Исследования начальной микробиоты кишечника показали, что колонизация полезных бактерий, таких как *Lactobacillus*, при антибактериальной терапии значительно нарушена [38, 39], и что использование антибиотиков способствует росту *Staphylococcus*.

Совсем недавно в работе F. Fouhy и соавт. [40] было показано, что у доношенных младенцев, получавших ампициллин и гентамицин парентерально в течение первых 48 ч после рождения, отмечалось значительное снижение количества бактерий фила *Actinobacteria* (включая *Bifidobacterium*) и *Firmicutes* (в т.ч. *Lactobacillus*), при этом отмечен рост *Proteobacteria* (в т.ч. *Enterobacteriaceae*). Доминирование *Proteobacteria* и снижение микробного разнообразия сохранялись по крайней мере в течение 8 нед после воздействия антибиотиков.

В исследовании у взрослых пациентов лечение клиндамицином в течение 7 дней привело к снижению бактериального разнообразия, которое сохранялось на протяжении 2 лет [41]. Учитывая нестабильность микрофлоры ЖКТ новорожденного, можно ожидать, что воздействие антибиотиков вызовет глубокое изменение микробного сообщества с долгосрочными последствиями [41–43].

Французские врачи-неонатологи использовали два протокола лечения детей с подозрением на внутриутробную инфекцию [44]. Влияние антибиотиков на фекальную флору оценивалось в 3 группах новорожденных: 10 детей с подозрением на внутриутробную инфекцию получали амоксициллин и нетилмицин, 10 — амоксициллин, цефотаксим и нетилмицин, 10 детей контрольной группы не получали антибиотики. В 1-й группе выделены *Klebsiella oxytoca* и *Escherichia coli*, устойчивые к амокси-

циллин, *E. faecium*, коагулазонегативные стафилококки. Во 2-й группе отмечено однообразие кишечной флоры с быстрой колонизацией стафилококками и грибами рода *Candida*. Все свидетельствует о необходимости индивидуализации антибактериальной терапии.

### **ВЛИЯНИЕ ХАРАКТЕРА ВСКАРМЛИВАНИЯ НА СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

Здоровые доношенные новорожденные первоначально колонизируются большим количеством *Enterobacter* и *Streptococcus* независимо от типа кормления [27]. Предполагается, что эти бактерии отвечают за подготовку среды в ЖКТ, способствующей колонизации анаэробами *Bacteroides*, *Bifidobacterium* и *Clostridium* с 4-й по 7-й день жизни. Было показано, что у здоровых доношенных новорожденных, получающих грудное вскармливание, к 7-му дню жизни в составе микробиоты преобладают полезные бифидо- и лактобактерии [45].

В первые часы и дни постнатальной жизни происходит активная адаптация ребенка к энтеральному вскармливанию, поэтому характер питания в это время — основной фактор становления особенностей кишечной микробиоты. У детей на грудном вскармливании количество бифидобактерий вдвое больше, чем у младенцев на искусственном, в течение нескольких недель бифидофлора становится доминирующей. Отмечается также разнообразие флоры: наряду с *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* выделяются энтерококки, энтеробактерии, вейлонеллы. У детей на искусственном вскармливании наряду с бифидобактериями выделяют бактероиды, клостридии, энтеробактерии, стрептококки [46].

Более взрослый тип микрофлоры [33, 36, 47] наряду с обилием потенциально патогенных бактерий (*C. difficile* и кишечная палочка) [17, 45] является распространенным при искусственном вскармливании. В последних исследованиях Azad и соавт. [32] сообщили о снижении бактериального разнообразия микробиоты у 4-месячных детей, получавших молочные смеси, по сравнению с детьми на грудном вскармливании; в дальнейшем у детей на искусственном вскармливании увеличилось представительство *C. difficile* в отличие от детей на грудном вскармливании.

Аналогичные данные получены другими авторами [48], отметившими, что дети на грудном вскармливании имеют в составе микробиоты почти в два раза больше бактериальных клеток, чем сверстники, получающие молочные смеси, у которых обнаружены более высокие количества *Atopobium* на фоне снижения *Bifidobacterium* и повышения относительного количества *Bacteroides*.

Различия в колонизации кишечника у детей на грудном вскармливании, по сравнению с младенцами, получающими молочные смеси, как полагают, могут быть обусловлены наличием в грудном молоке собственного богатого микробиома и олигосахаридов, которые выборочно стимулируют рост и/или активность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [49]. Было показано, что при грудном вскармливании бактерии из ротовой полости ребенка попадают в молочные протоки грудной железы и вносят свой вклад в микробиоту грудного молока [50]. Даже после дезинфицирования груди раствором йода выделение гена 16S рРНК из грудного молока подтверждает наличие микробной флоры в молоке [49, 51].

Еще одним механизмом колонизации грудного молока и различий в составе микробиоты детей, получающих различные виды вскармливания, является способность бактерий или их компонентов активно мигрировать

из кишечника матери по пути макрофагов или дендритных клеток в молочную железу и грудное молоко [52].

Современные исследования указывают, что особенности материнского фенотипа и способ родоразрешения могут влиять на состав и разнообразие микробиоты в грудном молоке.

Так, в исследовании R. Cabrera-Rubio и соавт. [49] изучалась микробиота грудного молока в три временные точки периода лактации у матерей, имевших различия в индексе массы тела (ИМТ), увеличении веса во время беременности, а также в способе родоразрешения.

Установлена взаимосвязь ИМТ матери и состава микробиоты ее грудного молока. Высокие показатели ИМТ у матерей были связаны с повышенным количеством *Lactobacillus* в молозиве. Аналогично повышение количества *Staphylococcus* и меньшее количество *Bifidobacterium* в грудном молоке через 6 мес после родов были связаны с более высоким ИМТ у матери.

Избыточный набор веса во время беременности сопровождался увеличением количества бактерий рода *Staphylococcus* (в т.ч. золотистого стафилококка) в грудном молоке у женщин в течение первого месяца лактации, а также более высоким количеством *Lactobacillus* и меньшим количеством *Bifidobacterium* в грудном молоке через 6 мес лактации.

Выявлено, что на характер кишечной микрофлоры новорожденного и ребенка первых 6 мес жизни существенное влияние оказывает наличие у матери эндокринных нарушений — индекс массы тела перед беременностью и неадекватная прибавка в весе за период вынашивания. Установлено, что между индексом массы тела женщины, прибавкой веса во время беременности и количеством бактероидов, клостридий и стафилококков в кишечной микробиоте у новорожденного существует достоверная прямая корреляция; в то же время эти особенности матери находятся в обратной связи с уровнем бифидобактерий у ребенка.

Выраженные различия в таксономическом составе бактерий грудного молока были обнаружены у матерей, родивших естественным родовым путем, по сравнению с женщинами, перенесшими роды при помощи кесарева сечения. Матери после оперативных родов имели значимое изменение микрофлоры грудного молока с уменьшением количества *Leuconostocaceae* и повышенным количеством *Carnobacteriaceae* по сравнению с женщинами, родившими естественным путем. Это различие присутствует уже в молозиве и сохраняется в грудном молоке в 1 и 6 мес лактации.

Количество бактерий в молозиве не имело различий после плановых и экстренных оперативных родов. Переходное и зрелое грудное молоко матерей, родивших путем экстренного кесарева сечения, имело композиционный состав, сходный с молоком матерей, родивших естественным путем.

Таким образом, результаты исследования R. Cabrera-Rubio и соавт. показывают, что соматометрические данные (ИМТ) женщины до и во время беременности связаны с таксономическим составом и разнообразием микробиоты грудного молока. Молозиво и грудное молоко в первый месяц лактации у страдающих ожирением женщин показали более низкое бактериальное разнообразие, чем у матерей с нормальным весом, хотя эта разница исчезала по достижении ребенком возраста 6 мес.

Учитывая, что бактерии грудного молока являются практически первыми бактериальными клетками, поступающими в гастроинтестинальный тракт младенца, изменение их состава в молоке может быть фактором, способствующим передаче сдвигов в бактериальной флоре

от матерей к младенцам. Таким образом, представленные результаты могут указывать на дополнительный механизм, объясняющий повышенный риск ожирения у детей, рожденных женщинами с ожирением или избыточным весом. Кроме того, результаты исследования R. Cabrerá-Rubio и соавт. показали, что грудное молоко матерей, родивших путем планового кесарева сечения, имело значительные композиционные отличия в сравнении с грудным молоком женщин после экстренного оперативного родоразрешения или родов *per vias naturales*. Различия определяются уже в молозиве и сохраняются в грудном молоке в 1 и 6 мес лактации, указывая, что сдвиги в бактериальной композиции имеют долгосрочный эффект. Предполагается, что физиологические (например, гормональные) изменения, происходящие в организме матери во время родов, могут повлиять на состав микробиоты. Младенцы, получающие смешанное вскармливание, имеют особенности микробного сообщества кишечника, приближающиеся к составу микробиоты детей на искусственном вскармливании, когда дети начинают получать прикорм [53].

Данные многочисленных исследований подтверждают, что грудное вскармливание влияет на формирование и развитие кишечной микрофлоры у младенцев, а грудное молоко служит одним из наиболее важных факторов в послеродовой период, который модулирует метаболическое и иммунологическое программирование и оказывает долгосрочное влияние на здоровье ребенка. Последние работы открыли новые данные о формировании микробиоты в грудном молоке, количество бактерий в которой составляет от  $10^3$  до  $10^4$  КОЕ/мл [54].

Грудное молоко женщин после преждевременных родов имеет особый состав, характеризующийся более высоким содержанием олигосахаридов, которые могут оказывать влияние на рост микробов [55].

В течение первого года жизни у доношенных новорожденных кишечник последовательно заселяется микробами, количество которых составляет около  $10^{14}$  КОЕ/мл кишечного содержимого. Большинство анаэробов располагается в дистальном отделе тонкой и в толстой кишке, подверженных аноксии, где способны выживать только анаэробы и факультативные бактерии. Однако, некоторые анаэробы и аэробы также могут колонизировать верхние отделы пищеварительного тракта. Микробиом доношенного младенца формируется в течение первых 3 лет жизни, прежде чем приобретает состав, соответствующий взрослому [15, 46].

### **КОЛОНИЗАЦИЯ КИШЕЧНИКА НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ОНМТ И ЕЕ СВЯЗЬ С ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**

Колонизация гастроинтестинального тракта детей, родившихся с ОНМТ, зависит от ряда факторов: способа родоразрешения, использования антибиотиков у матери или ребенка, длительности безводного периода, применения парентерального питания, задержки с введением энтерального питания, удлинения транзита пищи, гестационного возраста, веса при рождении, продолжительности пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии, контаминации госпитальной патогенной флорой при отсутствии контакта кожа-к-коже с матерью, микробиома грудного молока матери [13, 15–18, 31, 36, 52].

Исследования с использованием молекулярных методов у новорожденных детей с ОНМТ, в том числе развившими НЭК, позволили выявить существенные различия в составе кишечной микробиоты недоношенных детей по сравнению с доношенными: снижение бактериального разнообразия, увеличение патогенной флоры, потенци-

ально связанной с развитием НЭК, увеличение эукариотического и вирусного разнообразия [15, 18, 42].

Особенности кишечной микробиоты у недоношенного новорожденного определяются многими факторами: помимо вышеуказанных (способ родоразрешения, характер материнской патологии и вид вскармливания, получаемая терапия), важное значение имеет фактор незрелости — сниженный гестационный возраст к моменту рождения, который реализуется в повышенной проницаемости кишечного барьера, что приводит к высокому риску транслокации бактерий за пределы кишечника [56]. Для недоношенных, особенно для детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела, характерна незрелость как местного, так и общего иммунитета, что приводит к высокому риску развития сепсиса и НЭК. Как уже упоминалось ранее, современные методы молекулярной микробиологии (ПЦР-амплификация) позволили выявить внутриутробную бактериальную колонизацию околоплодных вод (при сохранении целостности плодных оболочек) и мекония плода; при этом для недоношенных детей исходно характерно меньшее разнообразие микроорганизмов, снижение числа бифидо- и лактобактерий, преобладание стафилококков и энтеробактерий. Установлены прямые корреляции между степенью исходной микробной колонизации кишечника и гестационным возрастом [13].

Согласно современным представлениям, сообщество микроорганизмов (микробиота) находится на слизистой оболочке кишечника в виде бактериальной биопленки, сбалансированной по видовому составу, и постоянно изменяется (вытеснение одних видов другими). Нарушения микроэкологии вследствие незрелых иммунных механизмов в свою очередь негативно влияют на последние: вследствие утраты способности макроорганизма распознавать систему «свой–чужой» происходит замена состава микрофлоры на смешанные полимикробные биопленки условно-патогенной микрофлоры — полирезистентные штаммы стафилококка, энтеробактера, клебсиеллы, эшерихии, псевдомонасы, акцинетобактера и т.п. [57]. Для недоношенных младенцев, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии и стационарах 2-го этапа, эти возбудители имеют этиологическую значимость в развитии инфекционно-воспалительного процесса и обычно расцениваются как внутрибольничная инфекция.

Недоношенные с ОНМТ, по сравнению с доношенными детьми, формируют очень разный, «разреженный» микробиом. Эта немногочисленная микрофлора имеет очень низкое содержание анаэробных бактерий, с коагулазонегативными *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* и дрожжами — преобладающими видами микроорганизмов [58].

Таким образом, недоношенные с ОНМТ демонстрируют задержку в становлении микрофлоры по сравнению с доношенными детьми. Различия и изменения колонизации в начале жизни могут способствовать развитию гастроинтестинальных заболеваний и сдвигам в иммунном балансе, которые приводят к атопии и развитию заболеваний нервной системы в детском возрасте и у взрослых [59].

Недавнее продольное исследование у двух недоношенных детей с ОНМТ обнаружило, что микробиом кишечника формируется под влиянием микроорганизмов, колонизировавших организм младенцев в отделении интенсивной терапии, устойчивых к антибактериальным препаратам [15]. Гены, придающие устойчивость к антибиотикам, могут передаваться между микробами, в том числе патогенными микроорганизмами. В другом продольном исследовании у ребенка с ОНМТ, рожденного путем кесарева сечения,

в 9 образцах стула, взятых в течение 3-й нед жизни, показан сдвиг в сторону облигатных анаэробов (превысили содержание одного из наиболее распространенных видов микроорганизмов — *E. coli*) [60].

Одно из последних исследований описывает микробную последовательность у 58 новорожденных с ОНМТ, сгруппированных по гестационному возрасту: < 26 нед; 26–28 нед; > 28 нед [61]. По мере роста и развития младенцев были изучены проспективно 922 фекальных образца. Полученные результаты подтвердили запрограммированную и неслучайную преемственность в процессе развития микрофлоры — от *Bacillus* к *Gammaproteobacteria*, далее к *Clostridia* с доминирующей колонизацией анаэробов к 33–36-й нед постконцептуального возраста.

Отмечены частые и резкие непредсказуемые изменения в динамике состава микробиоты под влиянием внешних факторов, таких как вскармливание грудным молоком, использование антибактериальных препаратов и способ родоразрешения. Такие исследования приобретают особую значимость при анализе дальнейшего развития детей: например, позволяют выявить, как особенности формирования микробиома связаны с ранним развитием болезней детского возраста.

Большой интерес представляют сведения о продукции нормальными представителями кишечной микробиоты некоторых сигнальных молекул, влияющих на синаптогенез в головном мозге. Недавнее исследование показало, что кишечный микробиом может регулировать развитие нейронных сетей мозга [62]. Это регулирование имеет временные ограничения, с критическим окном в раннем постнатальном периоде, во время которого микрофлора кишечника может модулировать синаптогенез через изменение экспрессии генов, чьи продукты влияют на модуляцию нейротрансмиссии в нервной системе. Процесс микробной колонизации модулирует сигнальные механизмы, которые влияют на нейронные сети, ответственные за контроль реагирования на сигналы стресса.

Не только микрофлора оказывает значительное влияние на функции головного мозга, верно и обратное. Мозг может изменить состав микробиоты через модуляцию кишечной секреции, проницаемости и моторики, удаление избыточного количества бактерий из просвета кишки и профилактику бактериального роста [63]. Сигнальные молекулы высвобождаются в просвет кишки из клеток в собственной пластинке слизистой оболочки, которые находятся под контролем центральной нервной системы и могут привести к изменениям в моторике и секреции, а также кишечной проницаемости, влияя таким образом на условия существования бактерий в гастроинтестинальной среде.

Таким образом, особую актуальность проблема состояния кишечной микробиоты и коррекции ее нарушений приобретает в отношении новорожденных детей, организм которых находится в постоянном динамическом изменении и в фазе наибольшей пластичности (так называемое критическое окно) [9]. Применяемые в этот период способы воздействия на микрофлору могут иметь не только urgentные, но и отсроченные эффекты, снижать риск отдаленных метаболических расстройств и даже способствовать повышению уровня когнитивного развития.

### **ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ, В ТОМ ЧИСЛЕ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ**

Первыми в истории пробиотиками следует признать разработанные И. И. Мечниковым штаммы лактобацилл и термофильного стрептококка, на основе которых он создал и предложил использовать в лечебных целях молочнокислый продукт. Современные пробиотики могут

быть условно разделены на следующие группы: преимущественно содержащие лактобактерии, бифидобактерии, прочие кислomолочные бактерии (стрептококки, энтерококки) и некислomолочные микроорганизмы.

Наиболее важным свойством бактерий-пробиотиков является обеспечение колонизационной резистентности кишечника за счет антагонизма (конкурентной адгезии) с микробами условно-патогенного и патогенного спектра и участия в локальной и системной иммунной защите. Иммунологические механизмы действия пробиотиков включают активацию функции презентации антигенов макрофагами, повышение продукции секреторного иммуноглобулина А, изменение цитокиновых профилей, что индуцирует толерантность к пищевым аллергенам. Помимо этого, пробиотики создают неблагоприятную среду для адгезии патогенных микробов (изменяют локальный pH), продуцируют бактериоцины, подавляющие их рост, стимулируют продукцию эпителиальной слизи и инактивируют токсины патогенных микробов, что усиливает барьерную функцию кишечника [64].

В большинстве препаратов-пробиотиков для детей раннего возраста содержится всего несколько видов хорошо изученных производственных штаммов микроорганизмов — *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 и *Streptococcus thermophilus*.

Начало применения препаратов-пробиотиков в клинической неонатологии (в 80-х гг. XX в. появился первый отечественный пробиотик Бифидумбактерин) совпало по времени со сменой спектра микробных возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных (расширение участия грамотрицательной флоры). На этом фоне к началу XXI столетия многочисленные исследования продемонстрировали клиническую эффективность пробиотиков в комплексном лечении различной патологии у детей — острых и хронических заболеваний ЖКТ, аллергических болезней [64].

В последние годы значительное количество публикаций посвящено профилактике и лечению НЭК у недоношенных, в том числе родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела. Так, использование комбинированного перорального пробиотика у детей с ОНМТ (рандомизированное контролируемое исследование) позволило обеспечить снижение частоты НЭК в 4 раза (по сравнению с контролем) и предупредить летальные исходы, связанные с НЭК [65].

У недоношенных обычно применяют пробиотики, содержащие *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Кохрановский метаанализ 20 рандомизированных и нерандомизированных исследований ( $n > 5$  тыс. детей) показал, что введение пробиотиков недоношенным детям достоверно сокращает и общую летальность [относительный риск 0,65 (0,52–0,81)], и частоту НЭК [относительный риск 0,43 (0,33–0,56)] [66]. Преимущественно сокращаются частота тяжелого НЭК, непереносимости энтерального питания, а также длительность госпитализации.

В других мультицентровых исследованиях, посвященных детям, было показано, что комбинированный пробиотик, содержащий *B. bifidum* и *Lactobacillus acidophilus*, позволил сократить частоту НЭК в 3,5 раза, а летальность от него — в 5 раз. Было установлено, что использование пробиотиков снижает также частоту любых инфекционно-воспалительных заболеваний, прежде всего сепсиса, у глубоко недоношенных детей, способствует более раннему введению энтерального питания у них [67].

В целом, публикации большинства метаанализов свидетельствуют о том, что пробиотики значимо снижают риск развития НЭК II и выше степени тяжести, ускоряют перевод ребенка на полное энтеральное питание, спо-

способствуют общему снижению неонатальной летальности, прежде всего среди недоношенных детей; при этом, однако, указывалось, что риск развития позднего неонатального сепсиса достоверно не снижался. У недоношенных детей наиболее значимыми механизмами саногенетической эффективности препарата являются супрессия патогенной микрофлоры, модуляция иммунного ответа, индукция барьерной функции кишечника, улучшение кровотока. Реализация иммуномодулирующего действия пробиотиков осуществляется через контакт их лигандов с Toll-подобными рецепторами клеток макроорганизма.

В отделении для недоношенных детей Научного центра здоровья детей проведено исследование эффективности комбинированного пробиотика, содержащего *B. lactis* Bb-12 ( $10^8$  КОЕ) и *S. thermophilus* TH-4 ( $10^7$  КОЕ), при формировании ранних адаптационных механизмов и профилактике функциональных нарушений ЖКТ у недоношенных детей с сочетанной перинатальной патологией. В открытое продольное исследование было включено 25 детей, родившихся при сроке  $\leq 34$  нед, в постнатальном возрасте 5–6 дней, с антибиотикассоциированным дисбиозом, риском развития НЭК и имеющих функциональные нарушения пищеварения. Методом слепой выборки детей разделили на получавших пробиотики ( $n = 15$ ) и группу сравнения ( $n = 10$ ). Проводилось комплексное клинико-бактериологическое исследование пациентов в динамике. По результатам исследования, в обеих группах отмечена удовлетворительная среднесуточная прибавка массы тела, однако в группе детей, получавших пробиотик, зафиксировано более быстрое восстановление первоначальной массы тела и несколько более раннее появление сосательного рефлекса. У большинства пациентов этой группы к 7–9-му дню лечения были ликвидированы функциональные нарушения пище-

варения, нормализовались данные копрологического анализа; при оценке микробного пейзажа достоверноросло количество бифидо- и лактобактерий и снизилась концентрация выделяемого энтерококка [68]. Все свидетельствует о достаточной пробиотической эффективности комбинации данных штаммов, представленной в России пробиотическим комплексом для детей с первых дней жизни Бифиформ Эбби. Препарат удобен при использовании в условиях стационара для маловесных и недоношенных детей, поскольку экономит трудовые затраты медицинского персонала, применяется 1 раз в день в виде суспензии. Суточная доза пробиотика уже отмечена на мерной пипетке.

Таким образом, безопасность изученных штаммов пробиотиков в неонатологии практически не вызывает сомнений; в отношении других пробиотических препаратов необходимы дальнейшие исследования.

Обзор современных исследований, посвященных изучению становления и коррекции микробиоты у новорожденных, в том числе недоношенных детей, родившихся с ОНМТ, свидетельствует, что состояние микробиоты недоношенного ребенка — один из важнейших факторов, определяющих его здоровье как в период новорожденности, так и на последующих возрастных этапах. Дальнейшее углубленное изучение становления и возрастной динамики микробиоты с использованием современных молекулярно-генетических методов позволит разработать направленную профилактику ближайших и отдаленных последствий перинатальной патологии у недоношенных детей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Статья подготовлена при поддержке компании Пфайзер.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dishaw L.J., Cannon J.P., Litman G.W., Parker W. Immune-directed support of rich microbial communities in the gut has ancient roots. *Dev Comp Immunol.* 2014; 47: 36–51.
- Friedrich M.J. Genomes of microbes inhabiting the body offer clues to human health and disease. *JAMA.* 2013; 309: 1447–1449.
- Pfeiffer J.K., Sonnenburg J.L. The intestinal microbiota and viral susceptibility. *Front Microbiol.* 2011; 2: 92.
- Kuzniewicz M.W., Wi S., Qian Y., Walsh E.M., Armstrong M.A., Croen L.A. Prevalence and neonatal factors associated with autism spectrum disorders in preterm infants. *J Pediatr.* 2014; 164: 20–25.
- Thompson A.L. Developmental origins of obesity: early feeding environments, infant growth, and the intestinal microbiome. *Am J Hum Biol.* 2012; 24: 350–360.
- Vrieze A., Van Nood E., Holleman F., Salojarvi J., Kootte R.S., Bartelsman J.F., Dallinga-Thie G.M., Ackermans M.T., Serlie M.J., Oozeer R., Oozeer R., Derrien M., Druenes A., van Hylckama Vlieg J.E., Bloks V.W., Groen A.K., Heilig H.G., Zoetendal E.G., Stroes E.S., de Vos W.M., Hoekstra J.B., Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology.* 2012; 143: 913–916. e917.
- Ahn J., Sinha R., Pei Z. et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1907–11.
- Vaarala O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol.* 2012; 90: 271–6.
- Lucas A. Long-term programming effects of early nutrition — implications for the preterm infant. *J Perinatol.* 2005; 25 (Suppl. 2): S2–6.
- Plagemann A., Harder T., Schellong K., Schulz S., Stupin J.H. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26: 641–53.
- Penders J., Thijs C., van den Brandt P.A. et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut.* 2007; 56: 661–7.
- Young V.B. The intestinal microbiota in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012; 28: 63–9.
- Mshvildadze M., Neu J. The infant intestinal microbiome: friend or foe? *Early Hum Dev.* 2010; 86 (Suppl. 1): 67–71.
- Neu J., Douglas-Escobar M., Lopez M. Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract.* 2007; 22: 174–82.
- Brooks B., Firek B.A., Miller C.S. et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome.* 2014; 2: 1.
- Cotten C.M., Taylor S., Stoll B. et al. NICHD Neonatal Research Network. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 2009; 123: 58–66.
- Penders J., Thijs C., Vink C. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006; 118: 511–21.
- Schwartz A., Gruhl B., Lobnitz M., Michel P., Radke M., Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 2003; 54: 393–9.
- Mshvildadze M., Neu J., Mai V. Intestinal microbiota development in the premature neonate: establishment of a lasting commensal relationship? *Nutr Rev.* 2008; 66: 658–63.
- Morowitz M.J., Poroyko V., Caplan M., Alverdy J., Liu D.C. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 2010; 125: 777–85.
- Jimenez E., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez J.M. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008; 159: 187–193.
- Ardisson A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G., Rechcigl K.T., Li N., Drew J.C., Murgas-Torrazza R., Sharma R., Hudak M.L., Triplett E.W., Neu J. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One.* 2014; 9: e90784.

23. Moles L., Gomez M., Heilig H. et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013; 8: e66986.
24. Martinez-Lopez D.G., Funderburg N.T., Cerissi A., Rifaie R., Aviles-Medina L., Llorens-Bonilla B.J., Sleasman J., Luciano A.A. Lipopolysaccharide and soluble CD14 in cord blood plasma are associated with prematurity and chorioamnionitis. *Pediatr Res*. 2014; 75: 67–74.
25. Uhlig H.H., Powrie F. The role of mucosal T lymphocytes in regulating intestinal inflammation. *Springer Semin Immunopathol*. 2005; 27: 167–180.
26. Chen Y., Chou K., Fuchs E. et al. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 14338–14343.
27. Mackie R., Sghir A., Gaskins R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69: 1035S–1045S.
28. Gronlund M.M., Lehtonen O.P., Eerola E., Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28: 19–25.
29. Salminen S., Gibson G.R., McCartney A.L., Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*. 2004; 53: 1388–9.
30. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014; 505: 559–63.
31. Huurre A., Kalliomaki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E. Mode of delivery — effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008; 93: 236–40.
32. Azad M.B., Konya T., Maughan H. et al. CHILD Study Investigators. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013; 185: 385–94.
33. Sakata H., Yoshioka H., Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985; 144: 186–90.
34. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 11971–11975.
35. Thavagnanam S., Fleming J., Bromley A., Shields M.D., Cardwell C.R. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 629–633.
36. Sherman P.M., Cabana M., Gibson G.R. et al. Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, June 27–28, 2008. *J Pediatr*. 2009; 155: S61–70.
37. Gewolb I.H., Schwalbe R.S., Taciak V.L., Harrison T.S., Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 1999; 80: F167–73.
38. Hall M.A., Cole C.B., Smith S.L., Fuller R., Rolles C.J. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child*. 1990; 65: 185–8.
39. Westerbeek E.A., van den Berg A., Lafeber H.N., Knol J., Fetter W.P., van Elburg R.M. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr*. 2006; 25: 361–8.
40. Fouhy F., Guinane C.M., Hussey S. et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 5811–20.
41. Jernberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J*. 2007; 1: 56–66.
42. Madan J.C., Salari R.C., Saxena D. et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012; 97: F456–62.
43. Mai V., Torrazza R.M., Ukhanova M. et al. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PLoS One*. 2013; 8: e52876.
44. Bonnemaïson E., Lanotte P., Cantagrel S., Thionio S., Quentin R., Chamboux C., Laugier J. Comparison of Fecal Flora following Administration of Two Antibiotic Protocols for Suspected Materno-fetal Infection. *Biol Neonate*. 2003; 84: 304–310.
45. Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C. et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30: 61–7.
46. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007; 5: e177.
47. Balmer S.E., Wharton B.A. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch Dis Child*. 1989; 64: 1672–7.
48. Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G.W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*. 2011; 17: 478–482.
49. Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96: 544–51.
50. Ramsay D.T., Kent J.C., Owens R.A., Hartmann P.E. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*. 2004; 113: 361–7.
51. Hunt K.M., Foster J.A., Forney L.J. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 2011; 6: e21313.
52. Perez P.F., Dore J., Leclerc M. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 2007; 119: e724–32.
53. Guaraldi F., Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 94.
54. Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M.L., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez J.M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2003; 143: 754–758.
55. De Leoz M.L., Gaerlan S.C., Strum J.S., Dimapasoc L.M., Mirmiran M., Tancredi D.J., Smilowitz J.T., Kalanetra K.M., Mills D.A., German J.B., Lebrilla C.B., Underwood M.A. Lacto-N-tetraose, fucosylation, and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm. *J Proteome Res*. 2012; 11: 4662–4672.
56. Neu J., Walker W.A. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011; 364: 255–64.
57. Бондаренко В.М. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике различных форм пробиотических препаратов. *Фарматека*. 2012; 3: 1–11.
58. Adlerberth I., Wold A.E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr*. 2009; 98: 229–238.
59. Weng M., Walker W.A. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis*. 2013; 4: 203–214.
60. Brown C.T., Sharon I., Thomas B.C., Castelle C.J., Morowitz M.J., Banfield J.F. Genome resolved analysis of a premature infant gut microbial community reveals a *Varibaculum cambriense* genome and a shift towards fermentation-based metabolism during the third week of life. *Microbiome*. 2013; 1: 30.
61. La Rosa P.S., Warner B.B., Zhou Y., Weinstock G.M., Sodergren E., Hall-Moore C.M., Stevens H.J., Bennett W.E. Jr., Shaikh N., Linneman L.A., Hoffman J.A., Hamvas A., Deych E., Shands B.A., Shannon W.D., Tarr P.I. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 12522–12527.
62. Diamond B., Huerta P.T., Tracey K. et al. It takes guts to grow a brain: increasing evidence of the important role of the intestinal microflora in neuro- and immune-modulatory functions during development and adulthood. *Bioessays*. 2011; 33: 588–591.
63. Diaz H.R., Wang S., Anuar F. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 3047–3052.
64. Isolauri E., Kirjavainen P.V., Salminen S. Probiotics: role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gat*. 2002; 50 (3): 154–59.
65. Lin H.C., Su B.H., Chen A.C., Lin T.W., Tsai C.H., Yeh T.F. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2005; 115: 1–4.
66. Al Faleh K., Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 4: CD005496.
67. Szajewska H., Gwandali S., Morelli L., van Goudoever J.B., Walker A. Effect of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Supplementation in Preterm Infants: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *JPGN*. 2010; 51: 203–209.
68. Беляева И.А., Митиш М.Д., Катосова Л.К. Эффективность использования пробиотиков у недоношенных детей. *Русский медицинский журнал*. 2009; 17 (15): 1000–1004.