

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИШЕЧНЫХ МЕТАГЕНОМОВ ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИЕЙ ПО СИГНАТУРНЫМ ГЕНАМ *Faecalibacterium prausnitzii* НА ШТАММОВОМ УРОВНЕ

© 2025 г. О. В. Аверина¹*, А. С. Ковтун¹, В. Н. Даниленко¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: olgavr06@mail.ru

Поступила в редакцию 10.09.2024 г.

После доработки 07.10.2024 г.

Принята к публикации 10.10.2024 г.

С использованием двух различных методических подходов, биоинформатического и количественного ПЦР-анализа, был проведен сравнительный анализ кишечных метагеномов пациентов с депрессией и здоровых добровольцев по представленности сигнатурных бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты для продукции метаболитов, биомаркерных для депрессии, комплементарных генам из геномов комменсальной бактерии *Faecalibacterium prausnitzii*. С использованием *in silico* подхода была выявлена штаммовая специфичность этих биомаркерных генов, проведена их кластеризация на группы и исследовано распространение представителей различных групп в 36 метагеномах пациентов с депрессией и 38 здоровых добровольцев. К ряду генов из наиболее распространенных групп были подобраны праймеры, с использованием которых был проведен количественный ПЦР-анализ 15 метагеномов от пациентов с депрессией и 15 метагеномов от здоровых добровольцев. Сравнительный анализ полученных данных выявил статистически значимое снижение уровня представленности генов, кодирующих глутаматсинтазу GltB, аспарагинсинтазу AsnA, серин-гидроксиметилтрансферазу в кишечных метагеномах пациентов с депрессией. На основе полученных данных можно рекомендовать эти гены как биомаркеры для разработки тест-систем для диагностики клинической депрессии по кишечному микробиому.

Ключевые слова: кишечный микробиом, депрессия, сигнатурные гены, штаммы, биомаркеры, метагеномы.

DOI: 10.31857/S0016675825020043 **EDN:** UVNIPJ

Депрессивные расстройства различной природы имеют устойчивую тенденцию к нарастанию как в России, так и во всем мире. Пандемия COVID-19 и другие глобальные угрозы человечеству являются теми факторами, которые приводят к депрессивным состояниям у людей различных возрастных групп. Депрессия существенно снижает качество жизни пациентов, служит одной из наиболее частых причин суицида и относится к социально-значимым заболеваниям. Депрессивные симптомы наблюдаются при онкологии, аутоиммунных заболеваниях и системных инфекциях, сопровождающихся хроническим воспалением [1]. Но наибольшее внимание уделяется изучению клинической депрессии, известной как тяжелое депрессивное расстройство (ТДР) (*major depressive disorder (MDD)*). Это распространенное психическое заболевание, которым страдают более 350 миллионов человек по всему миру. Число

недиагностированных людей, страдающих субклиническими депрессивными симптомами, может быть выше [2]. Поэтому возрастает внимание научного и медицинского сообщества к изучению механизма патогенеза этого заболевания с целью поиска путей ранней диагностики и лечения.

На сегодняшний день известно, что механизмы патогенеза депрессии многофакторные и охватывают изменения в эндокринной, иммунной, метаболической, желудочно-кишечной и центральной нервной системах. Кишечная микробиота (КМ) в настоящее время рассматривается как еще один важный механизм патогенеза депрессии. Было показано, что после трансплантации кишечной флоры от пациентов с ТДР животные приобретают депрессивный фенотип [3]. Различные клинические и экспериментальные данные на животных моделях свидетельствуют о влиянии КМ на широкий спектр поведенческих аспектов, включая социальное,

эмоциональное и тревожное поведение. Механизмы коммуникации микробиоты с ЦНС реализуются через ее метаболиты и поверхностные структуры, воздействующие на: блуждающий нерв, прямую связывающий различные части кишечника с мозгом; чувствительные нервные окончания периферической нервной системы; хемосенсоры просветного эпителия; энтерохромаффинные клетки; клетки иммунной системы кишечника [4]. Бактерии КМ способны продуцировать нейроактивные соединения, которые коррелируют с депрессией [5, 6]. Ранее в КМ пациентов с депрессией по сравнению со здоровыми добровольцами при использовании технологий секвенирования следующего поколения (NGS), позволяющих исследовать полногеномную ДНК, нами были выявлены дисбиотические нарушения в таксономическом составе в сторону снижения представленности полезных бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты: *F. prausnitzii*, *Roseburia intestinalis*, *Coprococcus* spp., и увеличение числа провоспалительных условно-патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Ruthenibacterium lactatiformans* [7]. С использованием разработанных алгоритма поиска и каталога ортологов генов — биомаркеров депрессии [5, 7] в кишечном микробиоме пациентов с депрессией было выявлено снижение представленности бактериальных генов, участвующих в продукции аргинина, аспарагина, глутамата, глицина, мелатонина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), спермидина и в конъюгации линолевой кислоты, входящих в сигнатурную пару с *F. prausnitzii* [7]. Эти данные указывают на диагностический потенциал *F. prausnitzii* и их метаболитов в качестве биомаркеров депрессивного расстройства, которые можно использовать для разработки различных диагностических тест-систем на основе молекулярно-генетических методов.

В последнее время комменсальные бактерии кишечника человека *F. prausnitzii* являются объектом повышенного внимания и как важные продуценты масляной кислоты и как бактерии с высокими противовоспалительными свойствами. У штамма *F. prausnitzii* ATCC 27766 после введения крысам были выявлены анксиолитический и анти-депрессивноподобный эффекты [8]. *F. prausnitzii* стали рассматривать в качестве потенциального психобиотика, который можно использовать для снижения депрессивных симптомов у людей.

Поскольку функциональные свойства *F. prausnitzii* штаммо-специфичны, в настоящей работе мы ставили задачу изучить уровень представленности биомаркерных сигнатурных генов [7] из различных групп штаммов в кишечной микробиоте пациентов с ТДР в сравнении со здоровым контролем. Для этого были использованы разработанные ранее биоинформатические алгоритмы поиска генов в метагеномах [7] и количественный

ПЦР-анализ метагеномной ДНК. Отобранная линейка биомаркерных генов может быть рекомендована для разработки тест-систем для диагностики клинической депрессии по кишечному микробиому.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический анализ геномов Faecalibacterium prausnitzii

Для анализа из базы данных NCBI Assembly были загружены все доступные сборки геномов различных штаммов бактерий вида *F. prausnitzii*. Всего было загружено 405 геномов, доступных в мае 2023 г., с уровнями завершенности сборки от “contigs” до “complete” (Приложение 1).

Геномные сборки были проанализированы при помощи программы blastx [9] с использованием каталога аминокислотных последовательностей, кодируемых генами, участвующими в синтезе и метаболизме нейроактивных соединений, а также биомаркеров депрессии. Данный каталог был создан нами ранее и использовался при анализе метагеномов пациентов с депрессией и контрольной группы [7]. Каталог насчитывает 1031 последовательность гомологов для 101 гена.

Фильтрация результатов blastx проводилась по следующим порогам: минимальная гомология 60%, разница между длиной выравнивания и длиной исходного гена из каталога не более 10%. Итоговые нуклеотидные последовательности гомологов генов из каталога, найденных в штаммах *F. prausnitzii*, были извлечены из геномов при помощи BEDTools getfasta [10]. Кластеризация найденных последовательностей гомологов генов выполнялась при помощи blastn [7] с порогом по минимальной гомологии 90% и разницей по длине последовательностей не более 10%. Один кластер представляет собой группу штаммов с близкими по составу нуклеотидов последовательностями целевых генов. Данная группировка проводилась для каждого гена по отдельности. Таким образом, был получен каталог генов, участвующих в синтезе и метаболизме нейроактивных соединений и биомаркеров депрессии в штаммах *F. prausnitzii*.

Анализ метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника человека при депрессии на штаммовом уровне

С применением полученного каталога генов штаммов *F. prausnitzii* был проведен анализ метагеномных данных микробиоты кишечника пациентов с депрессией и контрольной группы из Москвы и Московской области. Для этого использовались образцы для секвенирования, указанные в работе A.S. Kovtun и соавт. [7]. Всего исследуемая когорта насчитывает 74 образца: 36 из группы пациентов

с депрессией и 38 из контрольной группы. Определение наличия штаммов *F. prausnitzii* в метагеномах проводилось при помощи программы blastn. Для этого нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания из метагеномных образцов, для которых ранее программой Kraken2 [11] было определено бактериальное происхождение из вида *F. prausnitzii* [7], были выровнены на каталог генов. Фильтрация выравниваний проводилась по порогам гомологии 90% и разницы по длине последовательностей не более 10%. Штаммовое происхождение генов определялось по кластерам генов в каталоге: если последовательность, найденная в метагеноме, близка по нуклеотидному составу к определенному кластеру, значит ген содержится в штамме, входящем в данный кластер. Группы штаммов, включающие в себя менее 10 последовательностей, исключались из дальнейшего рассмотрения.

Подбор праймеров

Для создания специфических пар праймеров были использованы последовательности генов, участвующих в продукции аргинина (аргининосукцинатлиаза), аспарагина (аспарагинсинтетаза AsnA), глутамата (GltB субъединица глутаматсинтазы), глицина (серин-гидроксиметилтрансфераза), и 405 геномов *F. prausnitzii* из базы данных NCBI, содержащих последовательности этих генов.

Алгоритм отбора генов для подбора праймеров включал выявление степени гомологии нуклеотидной последовательности генов из геномов различных штаммов внутри отобранной группы с использованием программы Clustal Omega [12]. Далее к консервативной части нуклеотидной последовательности генов подбирались праймеры с использованием программы Primer3Plus [13] с заданными основными критериями: размер продукта не более 250 пар нуклеотидов (пн) и температура отжига 58°C или 60°C. Специфичность отобранных праймеров далее оценивалась с помощью blastn для всех депонированных последовательностей ДНК с настройками по умолчанию.

Количественный ПЦР-анализ

Анализировались ДНК от проб кишечной микробиоты, полученных от участников исследований, описанных в работе A.S. Kovtun и соавт. [7]. Для выделения ДНК использовали коммерческий набор QIAamp PowerFecal ProDNA Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Измерение концентраций выделенной ДНК проводили с использованием набора Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя на флуориметре Qubit (Invitrogen, США). Амплификацию ДНК проводили на приборе CFX96 Touch thermal cycler

(Bio-Rad, США). ПЦР-смеси (конечный объем 25 мкл) содержали 5 мкл готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), 1 мкл ДНК (236 мкг/мл), 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров и воду деионизированную, свободную от нуклеаз, до 25 мкл. Для ПЦР использовалась программа: 95°C в течение 5 мин, 45 циклов (30 с при 94°C, 30 с при 58 или 60°C) и далее 72°C в течение 7 мин. В каждом прогоне были включены отрицательные контроли без ДНК для каждого набора праймеров и положительный контроль с известной ДНК. Качество полученных ПЦР-продуктов проверяли по кривой плавления и визуализации с помощью электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле. Для ПЦР-анализа использовали одинаковое количество метагеномной ДНК.

Для статистической обработки данных количественной ПЦР использовали расчет критерия Манна–Уитни. Стандартное отклонение определяли с использованием Excel-ресурса. Разницу в представленности гена в метагеномах сравниваемых когорт определяли по формуле $2^{\Delta Ct}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ представленности сигнатурных генов F. prausnitzii в исследуемой кишечной микробиоте на уровне штаммов

В настоящей работе впервые исследовалась корреляция представленности различных групп штаммов *F. prausnitzii* с ТДР.

Первоначальный биоинформатический анализ геномов 405 штаммов *F. prausnitzii*, доступных в международной базе NCBI Assembly, позволил выявить встречаемость исследуемых сигнатурных генов, кодирующих аргининосукцинатлиазу, аспарагинсинтетазу AsnA, глутаматсинтазу GltB и GltD, серин-гидроксиметилтрансферазу, изомеразу линолевой кислоты (табл. 1). Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности выявил высокую гетерогенность у исследуемых генов. На основе полученных результатов был составлен каталог ортологов сигнатурных генов. Файл с нуклеотидными последовательностями каталога в формате FASTA доступен на ресурсе Github по ссылке: “https://github.com/Alexey-Kovtun/Fprausnitzii_catalog”. Далее при помощи программы blastn была проведена кластеризация последовательностей генов из данного каталога на уровне штаммов с распределением их в различные группы по степени гомологии не менее 90%. Полученные группы для исследуемых генов также доступны по ссылке “https://github.com/Alexey-Kovtun/Fprausnitzii_catalog/tree/main/Strain%20groups” и в табл. 2. Стоит отметить, что в таблицу вошли только те группы, которые содержали более 11 гомологичных последовательностей генов, поскольку

Таблица 1. Встречаемость ферментов, кодируемых исследуемыми генами, в геномах различных штаммов *F. prausnitzii*

№	Фермент	Число геномов, в которых найден фермент	% от общего числа геномов
1	Аргининосукцинатлиаза	356	88
2	Аспарагинсинтетаза AsnA	212	52
3	Глутаматсинтаза GltB	281	69
4	Глутаматсинтаза GltD	305	75
5	Серин-гидроксиметилтрансфераза	252	62
6	Изомераза линолевой кислоты	343	85

Таблица 2. Групповая кластеризация ферментов, кодируемых сигнатурными генами, от различных штаммов *F. prausnitzii* по степени гомологии не менее 90%

Фермент	№ группы	Количество гомологичных последовательностей в группе
Аргининосукцинатлиаза	1059	17
	1156	101
	1164	19
	1167	91
	1169	120
Аспарагинсинтетаза AsnA	471	15
	474	39
	527	70
	528	120
Глутаматсинтаза GltB	569	55
	572	11
	573	93
	629	56
Глутаматсинтаза GltD	336	106
	338	78
	339	64
	340	39
Серингидроксиметилтрансфераза	342	17
	371	27
	372	108
	381	40
	384	42

Таблица 2. Окончание

Фермент	№ группы	Количество гомологичных последовательностей в группе
Изомераза линолевой кислоты	1065	75
	1072	169
	1174	55
	1179	210
	1180	118
	1183	503
	1185	129
	1186	155
	1187	86
	1188	41
	641	11
	833	15
	835	48
	871	19

ставилась задача исследования распространения в метагеномах наиболее часто встречаемых штаммов, что необходимо для разработки диагностикомов. Наибольшее количество групп формируют гены изомеразы линолевой кислоты (14 групп). Остальные сигнатурные гены образуют по 4, 5 групп, включающих различное количество гомологичных последовательностей генов.

После этого метагеномные контиги, которые ранее были нами описаны как принадлежащие к виду *F. prausnitzii*, были анализированы при помощи нового каталога для определения их принадлежности к группам штаммов. Результаты сигнатурного анализа метагенома микробиоты кишечника пациентов с депрессией и здоровых добровольцев на уровне групп штаммов и отдельных штаммов показаны в табл. 1 и 2 Приложения 1. Эти данные указывают на снижение в метагеномах пациентов с депрессией представленности для ряда штаммов и групп штаммов генов, кодирующих глутаматсинтазу GltB, аспарагинсинтазу AsnA, аргининосукцинатлиазу, серин-гидроксиметилтрансферазу, изомеразу линолевой кислоты. Ряд генов, численность которых была ниже в метагеномах с депрессией, были использованы для отбора праймеров.

Отбор праймеров к сигнатурным генам

В результате сравнительного *in silico* анализа исследуемых метагеномов (табл. 1 и 2 Приложения 1) были отобраны сигнатурные гены как на уровне

штаммов, так и групп с наименьшей представленностью в метагеномах пациентов с депрессией в сравнении со здоровым контролем. Это гены, кодирующие аргининосукцинатлиазу (штамм SRR19721636_bin.2_metawrap_v1.3_MAG, группа 1169), аспарагинсинтазу AsnA (штамм COPD317, группа 527; штамм COPD323, группа 528), глутаматсинтазу GltB (штаммы ERR1995237_bin.37_CONCOCT_v1.1_MAG и SL3/3, CNCMI4541, группа 572; штамм L1 007 000M1 dasL1 007 000M1, группа 569), серин-гидроксиметилтрансферазу (штамм L3 114 360G1 dasL3 114 360G1 concost 22, группа 381; штамм COPD326, группа 384), изомеразу линолевой кислоты (штамм SL3/3, группа 1180; штаммы CNCMI4541 и MTG241 bin.48. fa, группа 1188). К гомологичным участкам генов, входящих в общую группу, были подобраны пары праймеров, которые позволят выявлять в метагеномах только представителей этой группы. В табл. 3 представлены девять пар праймеров к сигнатурным генам штаммов, представляющих определенную группу (номер группы в обозначении праймера). Была выявлена распространенность нуклеотидных последовательностей, образованных этими праймерами (табл. 3) в метагеномах сравниваемых двух когорт, включающих 36 пациентов с депрессией и 38 здоровых добровольцев контрольной группы. Полученные данные, представленные в табл. 4, указывают на широкое распространение исследуемых участков генов в метагеномах от контрольной группы и снижение представленности в метагеномах

Таблица 3. Праймеры, используемые в исследованиях

№	Обозначение праймера	Продукт гена	Олигонуклеотиды	Размер продукта, пн
1	AL1169 F	Аргининосукцинатлиаза	AGGGTCTGCTCCACAAAGGT	216
2	AL1169 R		CAACTCCTCCATCCGCTTC	
3	GS4541 F	Глутаматсинтаза GltB	TCGATGCCCTTGCTCAC	164
4	GS4541 R		TGAAGCTGTTCGAGGTGGT	
5	GS572 F	Глутаматсинтаза GltB	ATGCGGTCGTAATCGTAAGG	204
6	GS572 R		GAAGTGGGACTTCTACCAG	
7	GS569 F	Глутаматсинтаза GltB	GCCCTTGATGGTGTTCATCT	161
8	GS569 R		ACGATCTGCGCCTGTTCTAC	
9	SH381 F	Серин-гидроксиметилтрансфераза	GACAACCACCTGATGCTCCT	244
10	SH381 R		TCTCGTCGTAGTGCCAGATG	
11	AS527 F	Аспарагинсинтетаза AsnA	GAAGACCGGAACGAGACGTA	210
12	AS527 R		CTCCTTGACGATGGCATTCT	
13	AS528 F	Аспарагинсинтетаза AsnA	CCAGCAGCAGCATAACAG	235
14	AS528 R		ACGACGACTGGGATCTGAAC	
15	LI1180 F	Изомераза линолевой кислоты	GAGCACGTCCATGTGTTTGA	203
16	LI1180 R		GTCCTCCTTGTTTCAGCCAGT	
17	LI1188 F	Изомераза линолевой кислоты	GCGAGATGGACAACCACTTT	195
18	LI1188 R		CCCTTATCAGACAGGCCGAA	

Таблица 4. Распространение исследуемых последовательностей генов в метагеномах из различных когорт

Фермент / штамм	Группа штаммов гена	Здоровые	Пациенты с депрессией
Аргининосукцинатлиаза / SRR19721636_bin.2_metawrap_v1.3_MAG	1169	37	33
Аспарагинсинтетаза AsnA / COPD317	527	38	22
Аспарагинсинтетаза AsnA / COPD323	528	38	26
Глутаматсинтаза GltB / ERR1995237_bin.37_CONCOCT_v1.1_MAG; SL3/3	572	33	19
Глутаматсинтаза GltB / L1 007 000M1 dasL1 007 000M1	569	36	25
Глутаматсинтаза GltB / CNCMI4541	572	35	22
Изомераза линолевой кислоты / SL3/3	1180	38	32
Изомераза линолевой кислоты / CNCMI4541; MTG241 bin.48. fa	1188	38	28
Серин-гидроксиметилтрансфераза / L3 114 360G1 dasL3 114 360G1 concoct 22	381	37	27
Серин-гидроксиметилтрансфераза / COPD326	384	29	17

от пациентов с депрессией. Для количественного ПЦР-анализа были использованы те пары праймеров, представленность продуктов которых была ниже в метагеномах пациентов с депрессией и встречались минимум в 30 метагеномах.

Выявление количественной представленности генов к сигнатурным метаболитам в исследуемых метагеномах

С помощью отобранных группоспецифических праймеров (табл. 3) определяли количественное содержание исследуемых генов в метагеномной ДНК от 15 пациентов с депрессией и от 15 здоровых добровольцев. В табл. 5 представлены среднестатистические данные количественного ПЦР-анализа исследуемых метагеномов на содержание пяти различных генов *F. prausnitzii*, представляющих различные группы. В метагеномах пациентов с депрессией в сравнении со здоровым контролем статистически достоверное значительное снижение представленности ($p < 0.05$) показали гены, кодирующие аспарагинсинтетазу AsnA из геномов штаммов группы 527 (в 9.06 раз), глутаматсинтазы GltB из геномов штаммов группы 569 (в 3.55 раз) и серин-гидроксиметилтрансферазу из геномов штаммов группы 381 (в 11.63 раза). Более чем в 2 раза снижена представленность генов, кодирующих аргининосукцилатлиазу из геномов штаммов группы 1169, глутаматсинтазы GltB из генома штамма GS4541 группы 572, однако эти данные статистически незначимы ($p > 0.05$). И не выявлялась значимая разница в представленности генов, кодирующих изомеразу линолевой кислоты из геномов штаммов группы 1180 и группы 1188 (табл. 5), а также генов, кодирующих аспарагинсинтетазу AsnA из геномов штаммов группы 528 и глутаматсинтазы

GltB из геномов штаммов группы 572. Однако эти данные статистически незначимы.

Таким образом, количественный ПЦР-анализ позволил выявить из девяти исследуемых генов только три гена из различных групп, кодирующих ферменты, участвующие в продукции аспарагина, глутамата и глицина со статистически достоверным снижением в составе метагеномной ДНК пациентов с депрессией.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования кишечной микробиоты в корреляции с депрессией, проведенные в различных лабораториях мира, показали, что количество *F. prausnitzii* в кишечнике пациентов с депрессией значительно снижено. В исследовании A.S. Kovtun и соавт. [7] эта бактерия вошла в сигнатурную пару с генами, кодирующими ферменты, участвующие в метаболизме нейрометаболитов — биомаркеров депрессии.

F. prausnitzii является одним из наиболее распространенных видов бактерий в толстой кишке здоровых взрослых, на его долю приходится более 5% от общей популяции бактерий [14–16]. *F. prausnitzii* очень чувствительны к изменениям в кишечной среде, которые могут ограничить их распространение, особенно в пораженном кишечнике. Поэтому изменения в разнообразии и численности популяции этого вида часто наблюдаются при различных кишечных расстройствах [17]. У представителей вида *F. prausnitzii* выявлено штаммовое разнообразие, и на основе сравнений геномного сходства штаммы распределили в разные генно-видовые группы. Сначала в пределах этого вида были описаны две филогруппы. Представители филогруппы

Таблица 5. Количественная представленность сигнатурных генов в исследуемых кишечных метагеномах

Показатель	Аргинино-сукцилат-лиаза	Глутаматсинтаза GltB			Серин-гидрокси-метил-трансфераза	Аспарагин-синтетаза AsnA		Изомераза линолевой кислоты	
	1169*	572(4541)	572	569	381	527	528	1180	1188
Пациенты с депрессией, $n = 15$	16.78 ± 2.45	16.90 ± 2.30	16.42 ± 1.8	15.71 ± 1.22	19.96 ± 2.29	17.75 ± 3.54	14.94 ± 1.79	15.59 ± 1.78	17.87 ± 2.39
Здоровые добровольцы, $n = 15$	15.37 ± 1.65	15.59 ± 1.69	15.64 ± 1.71	13.88 ± 1.45	16.42 ± 1.7	14.57 ± 2.6	14.08 ± 1.71	15.15 ± 1.38	17.21 ± 1.61
p -value	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Разница в представленности гена	2.6	2.47	1.65	3.55	11.63	9.06	1.81	1.35	1.58

Примечание. * — группа штаммов гена.

И чаще демонстрировали разницу в количестве (в сторону снижения) в составе микробиоты когорт пациентов с кишечными заболеваниями по сравнению со здоровыми людьми [18].

Пока фактическое разнообразие у *F. prausnitzii* до конца не выяснено в связи со сложностью культивирования этих бактерий как строгих анаэробов. Однако у *F. prausnitzii* уже выявлено большое разнообразие генетических профилей и функций, и поэтому неоднократно были сделаны попытки кластеризации штаммов. L. Benevides и соавт. [19] сообщили о существовании семи различных групп у этого вида, основываясь на средние значения нуклеотидной идентичности 16S рРНК у 17 штаммов *F. prausnitzii*. Впоследствии С.В. Fitzgerald и соавт. [15] обновили таксономию вида, проанализировав геномы 35 штаммов *F. prausnitzii*, и разделили штаммы на восемь групп.

С учетом 95%-ной средней нуклеотидной идентичности (ANI) геномы *Faecalibacterium* были разделены на 11 кластеров на уровне видов [16]. На основе однокопийных генов и последовательностей 16S рРНК, а также состава пангенома Z. Bai и соавт. [20] провели различные филогенетические анализы 84 штаммов *F. prausnitzii*, которые показали генетическое разнообразие среди них. После анализа пангеномов 136 штаммов *Faecalibacterium*, собранных в десяти странах, бактерии были распределены на 11 кластеров. И только пять из них были охарактеризованы и получили соответствующую номенклатуру [21]. Исследователи также выявили у здоровых людей значительное увеличение представленности девяти кластеров *Faecalibacterium* по сравнению с пациентами с сахарным диабетом II типа [21].

Разные группы штаммов содержат разные наборы генов [15], что позволяет предположить, что они обладают разными свойствами с точки зрения взаимодействия с хозяином. Для классификации вида *F. prausnitzii* на штаммовом уровне были предложены альтернативные генные маркеры и был разработан многообещающий метод qPCR для отдельного количественного определения каждой группы генов [22].

Поскольку истощение этого вида не является одинаковым при различных кишечных заболеваниях, возникает необходимость в изучении представленности отдельных групп штаммов в микробиоте в корреляции с определенным заболеванием. В наших исследованиях мы впервые выявляли разницу в групповой представленности *F. prausnitzii* в кишечнике пациентов с депрессией в сравнении со здоровыми добровольцами. Для этого использовали два подхода: биоинформатический анализ и количественный ПЦР-анализ исследуемых метагеномов. Был проведен широкомасштабный анализ геномов 405 штаммов *F. prausnitzii*, доступных в международной базе NCBI Assembly, на наличие

исследуемых шести биомаркерных сигнатурных генов. Из-за штаммовой многочисленности по каждому гену штаммы были сгруппированы, чтобы облегчить анализ представленности штаммов в исследуемых метагеномах. Из-за высокой гетерогенности было получено очень много различных групп. Поэтому для количественного ПЦР-анализа метагеномов были отобраны только представители наиболее многочисленной группы.

Надо отметить, что для метагеномного анализа КМ людей российской популяции были использованы последовательности генов из геномов различных штаммов *F. prausnitzii*, имеющих происхождение из различных популяций мира. Поэтому для анализа была использована степень гомологии не более 90%. Тем интереснее кажутся результаты, которые указывают на наличие сигнатурных генов с высокой гомологией в составе кишечной микробиоты у людей из различных популяций мира.

Для исследований было разработано девять группоспецифичных пар праймеров, нацеленных на последовательности пяти сигнатурных генов. Количественный ПЦР-анализ позволил дать оценку целевым группам штаммов в составе сравниваемых групп метагеномов по различиям в количестве и распространенности и способствовал более детальному пониманию влияния популяций *F. prausnitzii* на групповом уровне на здоровье человека. Также важными являются результаты по выявлению корреляции биомаркерных метаболитов аспарагина, глутамата и глицина бактериального происхождения с депрессией. Уже было показано, что дисфункция аминокислотной нейромедиаторной системы играет существенную роль в патофизиологии депрессии. Несколько исследований продемонстрировали потенциал аминокислот как источник нейро-специфических биомаркеров, которые могут быть использованы в будущей диагностике депрессии [23]. Для аспарагина, глутамата и глицина в ряде исследований крови пациентов с депрессией [24] и содержания тонкого кишечника животных [25] была выявлена корреляция с заболеванием. Поэтому наши полученные результаты позволяют рекомендовать гены, участвующие в продукции аспарагина, глутамата и глицина, в качестве биомаркеров кишечной микробиоты при разработке тест-систем для диагностики клинической депрессии.

Выявленные в результате изучения микробиоты специфические штаммы *F. prausnitzii*, ассоциированные с депрессией, можно рекомендовать в качестве потенциальных психобиотиков для пациентов из российской популяции, которые могут оказывать положительное влияние на снижение проявлений депрессивного состояния. Также в будущем предстоит выявлять больше биомаркерных генов и провести экспериментальную валидацию

функциональных свойств отобранных штаммов в случае их культивируемости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 20-14-00132.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объектов людей и животных.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G. et al. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain // Nat. Rev. Neurosci. 2008. V. 9. № 1. P. 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
2. Bachmann S. Epidemiology of suicide and the psychiatric perspective // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018. V. 15. № 7. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071425>
3. Meyyappan A.C., Forth E., Wallace C.J.K. et al. Effect of fecal microbiota transplant on symptoms of psychiatric disorders: a systematic review // BMC Psychiatry. 2020. V. 20. № 1. e299. <https://doi.org/10.1186/s12888-020-02654-5>
4. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 1–19. <https://doi.org/10.7868/S0026365617010050>
5. Averina O.V., Zorkina Y.A., Yunes R.A. et al. Bacterial metabolites of human gut microbiota correlating with depression // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 23. e9234. <https://doi.org/10.3390/ijms21239234>
6. Averina O.V., Poluektova E.U., Zorkina Y.A. et al. Diagnosis and treatment of depression // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms25115782>
7. Kovtun A.S., Averina O.V., Angelova I.Y. et al. Alterations of the composition and neurometabolic profile of human gut microbiota in major depressive disorder // Biomedicines. 2022. V. 10. № 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092162>
8. Hao Z., Wang W., Guo R. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats // Psychoneuroendocrinology. 2019. V. 104. P. 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.025>
9. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. BLAST+: Architecture and applications // BMC Bioinform. 2009. V. 10. № 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
10. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 6. P. 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
11. Wood D.E., Salzberg S.L. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments // Genome Biol. 2014. V. 15. № 3. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
12. Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Mol. Syst. Biol. 2011. V. 5. e539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
13. Untergasser A., Nijveen H., Rao X. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. P. W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
14. Cao Y., Shen J., Ran Z.H. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature // Gastroenter. Resear. Pract. 2014. V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/872725>
15. Fitzgerald C.B., Shkoporov A.N., Sutton T.D.S. et al. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa // BMC Genom. 2018. V. 19. № 1. e931. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5313-6>
16. De Filippis F., Pasolli E., Ercolini D. Newly explored *Faecalibacterium* diversity is connected to age, lifestyle, geography, and disease // Curr. Biol. 2020. V. 30. № 24. P. 4932–4943. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.063>
17. Lopez-Siles M., Duncan S.H., Garcia-Gil L.J. et al. *Faecalibacterium prausnitzii*: From microbiology to diagnostics and prognostics // ISME J. 2017. V. 11. P. 841–852.
18. Lopez-Siles M., Martinez-Medina M., Suris-Valls R. et al. Changes in the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* phylogroups I and II in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease and patients with colorectal cancer // Inflamm. Bowel Dis. 2016. V. 22. № 1. P. 28–41. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000590>
19. Benevides L., Burman S., Martin R. et al. New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01790>
20. Bai Z., Zhang N., Jin Y. et al. Comprehensive analysis of 84 *Faecalibacterium prausnitzii* strains uncovers their genetic diversity, functional characteristics, and potential risks // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2023. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.919701>
21. Li W., Lin X., Liang H. et al. Genomic and functional diversity of the human-derived isolates

- of *Faecalibacterium* // Front. Microbiol. 2024. V. 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1379500>
22. Tanno H., Chatel J.-M., Martin R. et al. A new gene markers for classification and quantification of *Faecalibacterium* spp. in the human gut // FEMS Microbiol. Ecology. 2023. V. 99. № 5. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad035>
 23. Fu X., Lu Y., Wu J. et al. Alterations of plasma aspartic acid, glycine and asparagine levels in patients with major depressive disorder // Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2012. V. 41. № 2. P. 132–138. Chinese. PMID: 22499508
 24. Pu J., Liu Y., Zhang H. et al. An integrated meta-analysis of peripheral blood metabolites and biological functions in major depressive disorder // Mol. Psychiatry. 2021. V. 26. P. 4265–4276. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0645-4>
 25. Yang X., Wang G., Gong X. et al. Effects of chronic stress on intestinal amino acid pathways // Physiology & Behavior. 2019. V. 204. P. 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.03.001>

Comparative Analysis of Gut Metagenomes of Patients with Depression by Signature Genes of *Faecalibacterium prausnitzii* at the Strain Level

O. V. Averina^{1, *}, A. S. Kovtun¹, V. N. Danilenko¹

¹Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: olgavr06@mail.ru

Using two different methodological approaches, bioinformatic and quantitative PCR, a comparative analysis of gut metagenomes of patients with depression and healthy volunteers was carried out based on the representation of signature bacterial genes encoding key enzymes for the production of metabolites as biomarkers for depression, complementary genes from the genomes of the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. Using the *in-silico* approach, the strain specificity of biomarker genes was revealed, their clustering into groups was carried out and their distribution in 36 metagenomes of patients with depression and 38 healthy volunteers was investigated. Primers were selected for a number of genes from the most common groups. Using them, a quantitative PCR analysis of 15 metagenomes from patients with depression and 15 metagenomes from healthy volunteers was performed. A comparative analysis of the data obtained revealed a statistically significant decrease in the level of representation of genes encoding glutamate synthase GltB, asparagine synthetase AsnA, serine- hydroxymethyltransferase in gut metagenomes of patients with depression. Based on the data obtained, these genes can be recommended as biomarkers for the development of test systems for the diagnosis of clinical depression by the gut microbiome.

Keywords: gut microbiome, depression, signature genes, strains, biomarkers, metagenomes.