

## СТРУКТУРА И НЕЙРОМЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

А. С. Ковтун<sup>1</sup>✉, О. В. Аверина<sup>1</sup>, Е. У. Полуэктова<sup>1</sup>, Г. П. Костюк<sup>2</sup>, В. Н. Даниленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н. А. Алексеева, Москва, Россия

В последние годы большое внимание уделяется изучению влияния кишечной микробиоты на здоровье детей, в том числе психическое. Целью данной работы было определить изменения в таксономическом составе и содержании бактериальных генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений, в метагеноме микробиоты кишечника детей младшего и подросткового возраста. Данные для анализа были получены при помощи секвенирования полного метагенома. Для определения изменения представленности бактериальных генов и метагеномных сигнатур использовали разработанный биоинформатический алгоритм и каталог гомологов генов. В результате построена коровая нейрометаболическая сигнатура кишечной микробиоты здоровых детей младшего возраста, включающая в себя виды *Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Lachnospiraceae bacterium* и гены, участвующие в образовании уксусной, пропионовой и масляной кислот, глутамата и ферментов с антиоксидантной активностью. Сравнение метагеномов детей разных возрастных групп показало статистически значимое ( $P$ -value < 0,1) изменение представленности для 3 родов бактерий и 18 видов. Альфа-разнообразие микробиоты подростков выше как на родовом, так и на видовом уровнях. Кроме того, в микробиоте подростков повышена ( $P$ -value < 0,1) представленность генов, кодирующих ферменты, участвующие в образовании короткоцепочечных жирных кислот, глутамата, триптофана и ферментов с антиоксидантной активностью и деградации гистидина, конъюгации линолевой кислоты. Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные об увеличении биоразнообразия и развитии функциональных свойств кишечного микробного сообщества со взрослением человека.

**Ключевые слова:** микробиота кишечника, ось кишечник-мозг, метагеномные сигнатуры, развитие нервной системы, нейроактивные соединения

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке гранта РНФ, № 20-14-00132.

**Вклад авторов:** А. С. Ковтун — разработка алгоритма, проведение биоинформатического анализа, участие в создании каталога, интерпретации и визуализации данных; О. В. Аверина — участие в разработке методологии, создании каталога, интерпретации данных и подготовки статьи; Е. У. Полуэктова — участие в разработке методологии и создании каталога; Г. П. Костюк и В. Н. Даниленко — разработка общей концепции и методологии исследования и участие в интерпретации данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 165 от 22 мая 2017 г.). Родители детей подписали согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Сергеевич Ковтун  
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; kovtunas25@gmail.com

**Статья получена:** 13.11.2020 **Статья принята к печати:** 02.12.2020 **Опубликована онлайн:** 11.12.2020

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.076

## ALTERED NEUROMETABOLIC POTENTIAL OF GUT MICROBIOME IN HEALTHY CHILDREN OF DIFFERENT AGE

Kovtun AS<sup>1</sup>✉, Averina OV<sup>1</sup>, Poluektova EU<sup>1</sup>, Kostyuk GP<sup>2</sup>, Danilenko VN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Psychiatric Hospital № 1 Named after N. A. Alexeev, Moscow, Russia

Recently much attention is paid to investigation of the gut microbiome impact on children's mental health. The study was aimed to detect alterations in the taxonomic composition and content of bacterial genes encoding key enzymes involved in the metabolism of neuroactive compounds in the metagenomes of healthy young children and adolescents. The whole metagenome sequencing was used to obtain the metagenomic data of the faecal specimens. The bioinformatics algorithm developed and the catalogue of homologs created were used to identify the changes in abundance of bacterial genes and metagenomic signatures in the studied metagenomes. The core neurometabolic signature of the healthy children gut microbiota included the *Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Lachnospiraceae bacterium* species, as well as genes involved in production of acetic, propionic and butyric acids, glutamate and enzymes possessing antioxidant activity. Comparison of metagenomes in children of different age groups revealed significant ( $p < 0.1$ ) changes in the average abundance for 3 bacterial genera and 18 species. The higher alpha diversity of the adolescents' microbiota was observed both at the genus and species level. Furthermore, in the adolescents' microbiota metagenomes the increased average relative abundances for the genes encoding enzymes involved in production of SCFAs, glutamate, tryptophan and compounds with antioxidant properties, histidine degradation and linoleic acid conjugation were observed ( $p < 0.1$ ). The study results support the evidence that healthy gut microbial communities become more diverse and functional as their human hosts become older.

**Keywords:** gut microbiota, gut-brain axis, metagenomic signatures, neurodevelopment, neuroactive compounds

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation, project № 20-14-00132.

**Author contribution:** Kovtun AS — algorithm development, bioinformatics analysis, catalogue creation, data interpretation and visualization; Averina OV — method development, catalogue creation, data interpretation, manuscript writing; Poluektova EU — method development, catalogue creation; Kostyuk GP and Danilenko VN — study concept, method development, data interpretation.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 165 dated May 22, 2017). The informed consent was obtained from parents of all children.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey S. Kovtun  
Gubkina, 3, Moscow, 119991; kovtunas25@gmail.com

**Received:** 13.11.2020 **Accepted:** 02.12.2020 **Published online:** 11.12.2020

**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.076

На сегодняшний день микробиоту кишечника человека (МКЧ) рассматривают как важный орган, играющий ключевую роль в поддержании здоровья человека. МКЧ — это совокупность микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт. В здоровом кишечнике микробные сообщества поддерживают метаболизм человека в гомеостазе и находятся внутри хозяина в состоянии иммунной толерантности. Через симбиотические отношения МКЧ выполняет различные функции, которые вносят большой вклад в физиологию хозяина [1]. Микробиота коэволюционирует со своим хозяином, состав микробного сообщества в пределах кишечного тракта меняется в ответ на различные внутренние и внешние стимулы. Виды бактерий, колонизирующие желудочно-кишечный тракт в раннем возрасте, оказывают влияние на здоровье хозяина в дальнейшей жизни [2]. Бактериальный состав микробиоты стабилизируется после первых трех лет жизни и уже близок к профилю микробиоты взрослого человека [3].

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о значительном воздействии МКЧ на широкий спектр поведения, включая социальное поведение, настроение, эмоции, тревогу и питание [4]. Кишечные бактерии влияют на различные неврологические состояния человека через так называемую «ось микробиота–кишечник–мозг» [4]. Первичный состав МКЧ может влиять на формирование нейронных сетей в период раннего развития нервной системы ребенка [5]. Бактерии воздействуют на центральную нервную систему (ЦНС) и кишечную нервную систему (ЭНС) различными путями через метаболиты и гормоны иммунной системы и афферентных нервов. Бактерии производят сотни различных соединений, которые могут влиять на физиологию хозяина. Изменения в микробном составе кишечника могут приводить к большим изменениям в продукции метаболитов. Поскольку хозяин постоянно подвергается воздействию этих молекул, не исключено, что они могут способствовать развитию различных нервно-психических расстройств, в том числе и депрессии [6].

Подростковый возраст и половое созревание — это критическая фаза развития нервной системы с многочисленными структурными, нейрохимическими и молекулярными изменениями, происходящими в ответ на генетические и экологические сигналы. В этом возрасте основная микробиота также претерпевает динамический сдвиг в составе и функционировании. Стероидные гормоны вызывают половые различия в микробном составе кишечника. Созревание МКЧ происходит параллельно с динамическим развитием мозга и оба имеют сходные критические периоды в развитии [7].

Использование технологии секвенирования нового поколения позволяет лучше понять состав кишечной микробиоты и исследовать ее структурные изменения на протяжении всей жизни человека [8]. В этом исследовании для изучения МКЧ мы использовали технологию секвенирования метагенома методом дробовика. Метод подразумевает секвенирование всего геномного материала, присутствующего в образце микробиоты, что позволяет не только получить полную информацию о бактериальном составе, но и дает достаточно точную оценку общих метаболических возможностей микробиоты и функциональных возможностей всех присутствующих в ней бактерий. Кроме того, этот метод позволяет анализировать микробиоту на уровне штаммов. Цель нашего исследования заключалась в выявлении различий

в таксономическом профиле и содержании бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений и биомаркерных метаболитов депрессии в сравниваемых метагеномах от здоровых детей разного возраста: 3–5 лет (метагеном маленьких детей (ММД)) и 15 лет (метагеном подростка (МП)).

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Описание когорт и секвенирования метагеномов

Для проведения исследования использовали ранее секвенированные метагеномы микробиоты кишечника 23 здоровых нейротипичных маленьких детей в возрасте 3–5 лет (группа ММД) [9] и 7 подростков в возрасте 15 лет (группа МП) [10] из московского региона. Критерии включения в исследование: возраст; отсутствие недавних заболеваний желудочно-кишечного тракта; географическое происхождение — Москва и Московская область; отсутствие приема антибиотиков, про- или пребиотиков за 2 месяца до взятия образцов; отсутствие психиатрических расстройств (депрессивных расстройств, шизофрении, биполярного расстройства и т. д.); отсутствие диареи. Фекальные образцы, полученные от каждого волонтера, хранились в стерильных пластиковых контейнерах при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа.

Выделение тотальной метагеномной ДНК, подготовка библиотек и секвенирование на приборе Illumina HiSeq (Illumina; США) проводили по алгоритму, описанному ранее [9]. Метагеномные чтения были депонированы в базе данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI (номер в базе данных BioProject PRJNA516054 — для ММД и PRJNA380118 — для МП). Контроль качества «сырых» чтений проводили при помощи FastQC, а тримминг — с использованием Trimmomatic [11, 12]. Основания с качеством  $Q < 20$  и последовательности короче 50 п.о. были удалены. Для фильтрации человеческой ДНК чтения картировали на геном человека (версия сборки hg19) программой bowtie2 [13]. Метагеномные чтения были собраны в контиги с помощью metaSPADes [14].

Параметры секвенированных образцов и полученных сборок представлены в табл. 1.

### Разработка каталога

Каталог гомологов генов, участвующих в синтезе и метаболизме различных нейроактивных соединений, впервые представленный ранее [9, 15], был обновлен и расширен: добавлены гены, участвующие в синтезе и метаболизме различных соединений и метаболитов, описанных в опубликованных данных как биомаркеры депрессии [16]. Аминокислотные последовательности гомологов к данным генам были отобраны по алгоритму, описанному ранее [9] (табл. 2).

### Таксономический и статистический анализ

Для определения таксономического состава использовали программы Kraken2 [17] и TAGMA [18]. Анализ проводили отдельно на уровнях типов, родов и видов. Альфа-разнообразие (индекс Шеннона) оценивали с помощью языка программирования R.

Статистически значимые изменения в таксономическом составе на уровнях родов и видов определяли с

Таблица 1. Характеристика исследуемых метагеномных образцов

№	Чтения			Сборки		
	Группа	Название образца	Размер, млрд п.о.	Размер, млн п.о.	Число контигов	N50, п.о.
1	ММД	НС_1	2,99	160,03	197683	2827
2	ММД	НС_2	1,91	129,61	194544	3020
3	ММД	НС_3	2,63	166,00	210193	3795
4	ММД	НС_4	3,46	189,25	209685	7667
5	ММД	НС_5	1,85	154,83	238146	2148
6	ММД	НС_6	4,71	182,04	174019	4487
7	ММД	НС_7	5,16	178,69	194821	2532
8	ММД	НС_8	7,15	154,62	142565	3426
9	ММД	НС_9	5,86	256,49	259614	2096
10	ММД	НС_10	6,77	149,53	156608	2114
11	ММД	НС_11	5,06	192,06	153535	14058
12	ММД	НС_12	6,26	201,55	175868	9029
13	ММД	НС_13	6,09	168,69	141685	9188
14	ММД	НС_14	6,16	168,31	121753	6826
15	ММД	НС_15	7,2	226,17	236984	2053
16	ММД	НС_16	6,18	178,16	153050	4611
17	ММД	НС_17	5,83	280,50	311115	1871
18	ММД	НС_18	5,23	214,81	205380	3613
19	ММД	НС_19	5,26	140,45	116040	13178
20	ММД	НС_20	4,73	172,67	125060	15088
21	ММД	НС_21	8,31	248,61	205319	6630
22	ММД	НС_22	9,86	277,61	238778	7011
23	ММД	НС_23	8,51	172,41	163607	3065
24	МП	D3F	10,1	108,11	61735	9284
25	МП	D4F	9	241,5	152814	5677
26	МП	D5F	9,9	142,83	53487	21016
27	МП	D6F	8,6	206,81	202650	3438
28	МП	D11F	7,7	38,29	31806	13412
29	МП	D12F	7,5	76,07	130779	760
30	МП	D13F	10,6	180,43	335100	617

использованием критерия Уилкоксона и поправки на множественное сравнение методом перестановок (1000 перестановок), порог значимости выбран на уровне  $P\text{-value} < 0,1$ . Такое значение обусловлено сравнительно малым количеством образцов в группе МП.

#### Идентификация сигнатур в метагеномных данных

Метагеномной сигнатурой является комбинация генов, найденных в метагеноме, и бактерий, их содержащих [9]. Для определения сигнатур метагеномные сборки были проанализированы по описанному ранее алгоритму [15]. Поиск открытых рамок считывания (ОРС) проводили программой MetaGeneMark (США) [19]. Для аннотации ОРС использовали созданный каталог и BLASTp со следующими параметрами: гомология  $\geq 60\%$ ; относительная длина выравнивания  $\geq 80\%$ . Бактериальное происхождение ОРС определяли на таксономическом уровне видов при помощи Kraken2. Все неклассифицированные последовательности обозначали как «Unclassified». Таким образом, для каждого образца был получен набор пар (вид; ген). Оценку относительной представленности пар определяли методом картирования чтений на соответствующие ОРС с использованием BWA [20]. Рид-каунты нормировали

методом «trimmed mean of M values» (TMM) с помощью библиотеки edgeR [21]. Сравнение относительных представленностей пар в группах ММД и МП проводили с помощью критерия Уилкоксона и поправкой на множественное сравнение методом перестановок (1000 перестановок;  $P\text{-value} < 0,1$ ).

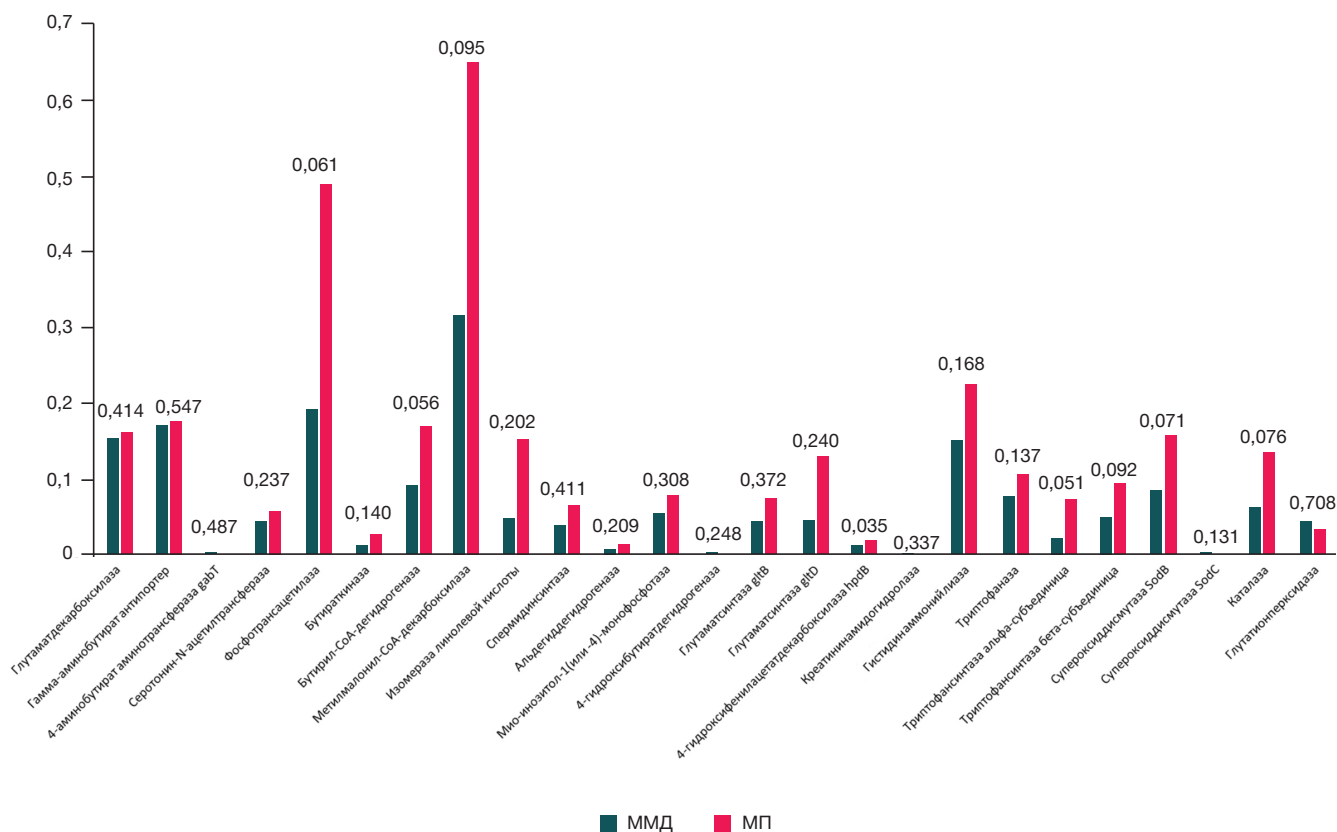
#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Расширение каталога генов

Ранее разработанный референсный каталог гомологов генов, участвующих в метаболизме различных соединений с нейромодулирующей активностью, был расширен добавлением генов, кодирующих ферменты для продукции новых соединений и деструкции различных нейроактивных метаболитов [9, 15]. Итоговый каталог насчитывает 742 аминокислотные последовательности гомологов генов, кодирующих 68 бактериальных ферментов. В каталог вошли новые ферменты, участвующие в распаде  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК), оксида азота,  $\gamma$ -оксимасляной кислоты и *p*-крезола, синтезе и распаде изовалериановой кислоты, инозитола и глутамата, а также ферменты с антиоксидантными свойствами:

Таблица 2. Состав обновленного каталога гомологов

№	Название фермента	Функция	Число гомологов
1	Дофадекарбоксилаза	Синтез серотонина, дофамина и норадреналина	10
2	Глутаматдекарбоксилаза	Синтез ГАМК	28
3	Гамма-аминобутират-антипортер	Транспорт ГАМК	20
4	4-аминобутиратаминотрансфераза (gabT, puuE), глицинаминотрансфераза	Распад ГАМК	17
5	Гистидиндекарбоксилаза	Синтез гистамина	13
6	Серотонин-N-ацетилтрансфераза	Распад серотонина для синтеза мелатонина	24
7	Ацетилсеротонин-O-метилтрансфераза	Синтез мелатонина	8
8	Синтаза оксида азота	Образование оксида азота	6
9	Диоксигеназа оксида азота, редуктаза оксида азота (norB, norC)	Распад оксида азота	13
10	Гидроксилазы аминокислот	Синтез катехоламинов	7
11	Моноаминоксидаза	Распад серотонина, дофамина и норадреналина	5
12	Фосфотрансацетилаза	Образование уксусной кислоты	43
13	Бутираткиназа	Синтез бутирата	16
14	Бутирил-СоА-дегидрогеназа	Синтез масляной кислоты	32
15	Лактоил-СоА-дегидратаза, пропиональдегиддегидрогеназа, метилмалонил-СоА-декарбоксилаза	Образование пропионовой кислоты	55
16	Изомераза линолевой кислоты	Кольюгация линолевой кислоты	23
17	Спермидинсинтаза	Синтез спермидина	26
18	Тирозиндекарбоксилаза	Синтез тирамина и дофамина	11
19	2-оксо-изовалириатдегидрогеназа (альфа, бета), дигидролипоилдегидрогеназа	Синтез изовалериановой кислоты (путь KADH)	24
20	Альдегиддегидрогеназа, пируватдекарбоксилаза	Синтез изовалериановой кислоты (путь KADC)	11
21	Мио-инозитол-1(или -4)-монофосфатаза, мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	Синтез иноситола	11
22	Мио-инозитол-2-дегидрогеназа	Распад иноситола	13
23	4-гидроксibuтиратдегидрогеназа	Распад $\gamma$ -оксимасляной кислоты	13
24	Глутаматсинтаза (gltB, gltD)	Синтез глутамата II	22
25	Глутаматмутаза (glmS, glmE), метиласпартатаммонийлиаза	Распад глутамата II	24
26	4-гидроксифенилацетатдекарбоксилаза	Синтез p-крезола	8
27	«4-крезолдегидрогеназа, протокатехуат 3,4-диоксигеназа (pcaG, pcaH)»	Распад p-крезола	15
28	Креатининамидогидролаза	Синтез креатинина	5
29	D-лактатдегидрогеназа	Образование D-изомера молочной кислоты	13
30	Глутатионсинтаза (gshAB, gshB)	Синтез глутатиона	12
31	Глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза, гамма-глутамилтранспептидаза	Распад глутатиона	35
32	Гистидинаммонийлиаза	Распад гистидина	20
33	Венилфенолредуктаза	Синтез 4-этилфенола	7
34	Триптофаназа	Образование индола из триптофана	7
35	Хоризматмутаза	Синтез префената	8
36	Префенатдегидрогеназа	Синтез 4-гидроксифенилпирувата	10
37	Тирозинспецифичный транспортный белок	Транспорт тирозина	6
38	Тирозинаминотрансфераза	Синтез тирозина	6
39	Фенилаланинаминотрансфераза	Синтез фенилаланина	3
40	Фенилаланинспецифичная пермеаза	Транспорт фенилаланина	6
41	Триптофансинтаза (альфа и бета)	Синтез триптофана	26
42	Триптофанспецифичный транспортный белок, триптофанпермеаза	Транспорт триптофана	7
43	Супероксиддисмутаза ([Mn], [Fe], [Cu-Zn]), каталаза, глутатионпероксидаза	Антиоксидант	73



**Рис. 1.** Относительная представленность найденных генов в группах ММД и МП. На рисунке отражены медианные значения относительной представленности каждого гена, найденного в более чем 50% образцов. Значения для группы ММД показаны красным цветом, для группы МП — зеленым. Числа над столбцами — значения P-value, оцененные при помощи критерия Уилкоксона и поправки на множественное сравнение методом перестановок, 1000 перестановок

супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза. Полный список генов, входящих в обновленный каталог, представлен в табл. 2.

### Коровая метагеномная сигнатура кишечной микробиоты здоровых детей

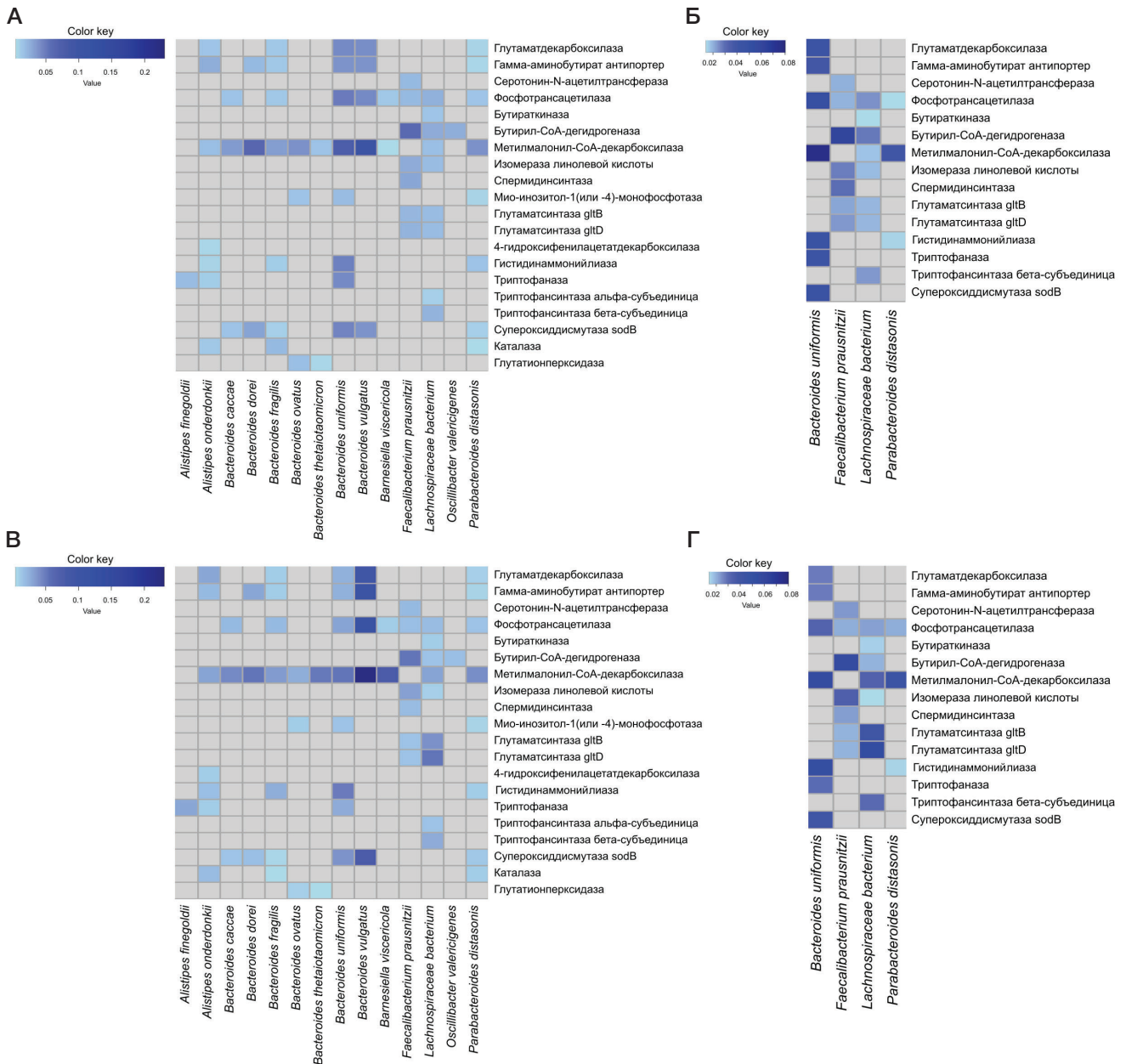
На первом этапе в метагеномах группы ММД проводили поиск бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в синтезе нейроактивных соединений и биомаркеров депрессии, которые потенциально могут повлиять на формирование и функционирование нервной системы ребенка в первые годы жизни (рис. 1). Учитывали только гены, найденные более чем в 50% образцов. Наиболее представленными оказались гены, кодирующие метилмалонил-CoA-декарибоксилазу (продукция пропионовой кислоты), фосфотрансацетилазу (продукция уксусной кислоты), глутаматдекарбоксилазу (синтез ГАМК), гамма-аминобутират-антипортер (транспорт ГАМК) и гистидинаммонийлиазу (деструкция гистидина). Были также выявлены гомологи генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболических путях ГАМК, серотонина, мелатонина, масляной кислоты, конъюгированной линолевой кислоты, спермидина, изовалериановой кислоты, инозитола,  $\gamma$ -оксимасляной кислоты, глутамата, креатинина, индола, триптофана, супероксиддисмутаза, каталазы и глутатионпероксидазы.

Далее было определено бактериальное происхождение генов на уровне видов и построены сигнатурные пары (рис. 2А). Пары, выявленные в подавляющем числе образцов (более 70%), составили коровую нейрометаболическую метагеномную сигнатуру ММД (рис. 2Б). В нее вошли

четыре вида (*Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae bacterium* и *Parabacteroides distasonis*) и гены, кодирующие 15 ферментов (глутаматдекарбоксилазу, гамма-аминобутират-антипортер, серотонин-N-ацетилтрансферазу, фосфотрансацетилазу, бутираткиназу, бутирил-CoA-дегидрогеназу, метилмалонил-CoA-декарибоксилазу, изомеразу линолевой кислоты, спермидинсинтазу, две субъединицы глутаматсинтазы, гистидинаммонийлиазу, триптофаназу, бета-субъединицу триптофансинтазы и супероксиддисмутаза).

### Изменения в метагеномной сигнатуре МКЧ с возрастом

Метагеномные образцы МП были проанализированы по тому же алгоритму, что и ММД. Вначале проводили поиск гомологов генов из каталога (см. рис. 1). В среднем, для всех генов, найденных в более чем 50% образцов группы МП, выявлена повышенная относительная представленность по сравнению с группой ММД. В МП не было обнаружено гомологов генов, кодирующих 4-аминобутират-аминотрансферазу, креатининамидогидролазу и супероксиддисмутаза (ген *sodC*), однако это можно объяснить малым числом образцов в выборке. В связи с этим статистические тесты имели малую мощность. Статистически значимое (скорректированное P-value < 0,1) увеличение представленности выявлено в МП для генов, кодирующих фосфотрансацетилазу, бутирил-CoA-дегидрогеназу, метилмалонил-CoA-декарибоксилазу, 4-гидроксифенилацетат-декарибоксилазу, альфа- и бета-субъединицы триптофансинтазы, супероксиддисмутаза (ген *sodB*) и каталазу.



**Рис. 2.** Метагеномная сигнатура и коровая метагеномная сигнатура МК4, построенные для группы ММД (А и Б соответственно), и изменения представленности составляющих их сигнатурных пар в группе МП (В и Г соответственно). Цветной градиент отражает значение средней относительной представленности пар (вид; ген). На рис. (А) и (В) показаны только пары, найденные в более чем 50% образцов, а на рис. (Б) и (Г) — в более чем 70% образцов

Далее для МП были построены метагеномные сигнатуры и проведено сравнение с ММД по представленности пар (вид; ген) (рис. 2В). Статистически значимое увеличение представленности отмечено для пар (*Alistipes onderdonkii*; каталаза), (*A. onderdonkii*; глутаматдекарбоксилаза), (*A. onderdonkii*; гистидинаммонийлиаза), (*A. onderdonkii*; 4-гидроксифенилацетатдекарбоксилаза), (*Bacteroides vulgatus*; гамма-аминобутират-антипортер), (*Bacteroides thetaiotaomicron*; метилмалонил-CoA-декарбоксилаза) и (*Barnesiella viscericola*; метилмалонил-CoA-декарбоксилаза). Однако выявленное изменение представленности пар, составляющих коровую сигнатуру, не было значимым.

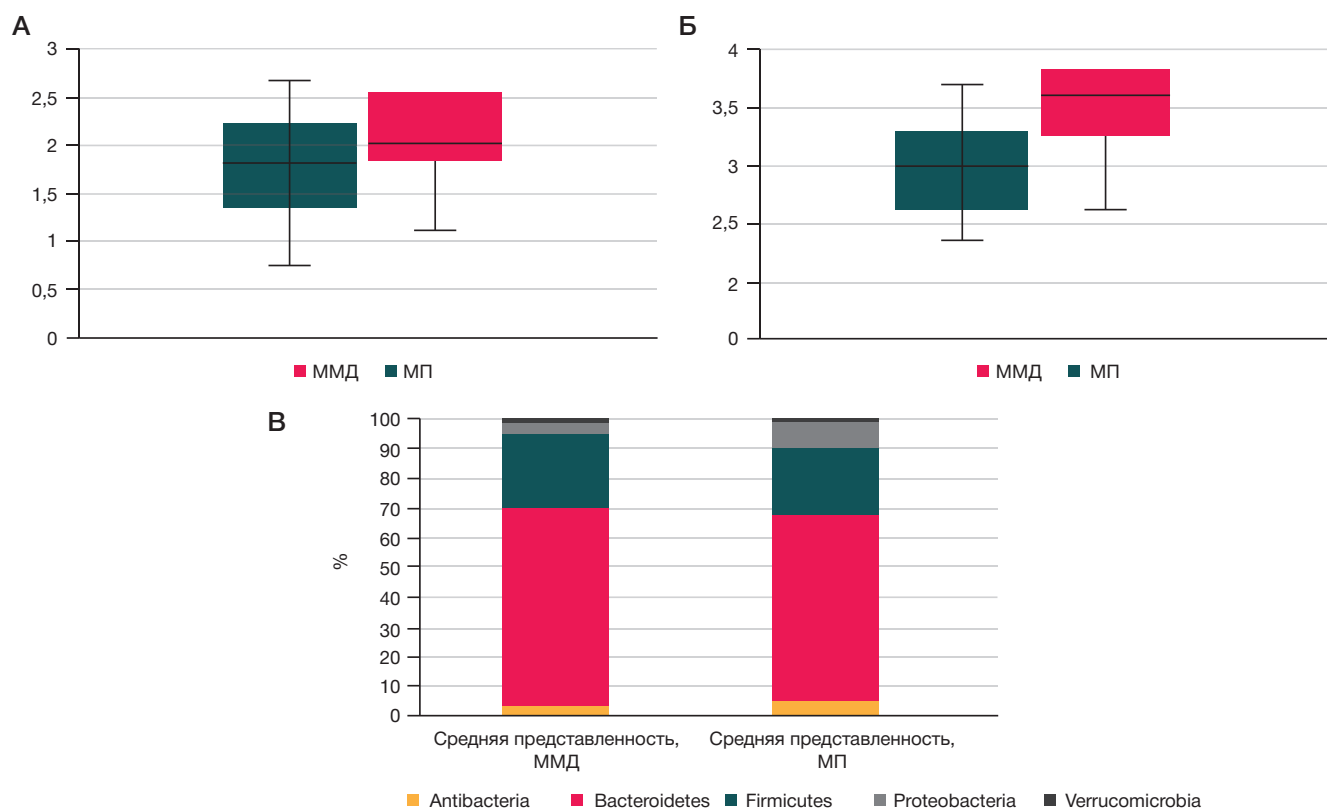
### Сравнительный таксономический анализ кишечной микробиоты детей разного возраста

Все метагеномы были проанализированы программой Kraken2. Сравнение альфа-разнообразия ММД и МП

представлено на рис. 3. Среднее значение индекса Шеннона для МП выше как на уровне родов (рис. 3А), так и на уровне видов (рис. 3Б).

Таксономический состав ММД и МП определяли на уровнях типов, родов и видов. На уровне типов МП характеризуются статистически значимым увеличением представленности Proteobacteria (8,99% против 3,37% в ММД и МП соответственно, P-value = 0,001) (рис. 3В). Различия наблюдались и для типов Actinobacteria (4,85% против 2,77%; P-value = 0,735), Bacteroidetes (60,55% против 66,94%; P-value = 0,421), Firmicutes (21,08% против 24,42%; P-value = 0,758) и Verrucomicrobia (0,40% против 1,36%; P-value = 0,298), однако они не были значимыми.

В сравнении представленности на уровнях родов (табл. 3) и видов (табл. 4) участвовали только таксоны, определенные более чем в 50% образцов. В результате статистически значимое увеличение представленности (P-value < 0,1) выявлено для родов *Butyrivibrio*, *Gordonibacter*



**Рис. 3.** Различия в таксономическом составе МКЧ в группах ММД и МП. Альфа-разнообразию определено при помощи индекса Шеннона для уровней родов (А) и видов (Б) для обеих групп. Изменения в таксономическом составе на уровне типов (В) показаны в процентах. Вертикальные планки погрешностей отражают стандартное отклонение

и *Prevotella*. На уровне видов статистически значимыми ( $P$ -value < 0,1) были увеличение представленности *Alistipes communis*, *Alistipes megaguti*, *Alistipes sp. dk3624*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Eggerthella sp. YY7918*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ruminis*, *Prevotella dentalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella enoeca*, *Prevotella jejuni*, *Prevotella oris* и *Prevotella ruminicola* и понижение представленности видов *Bacteroides sp. A1C1*, *Gordonibacter pamelaeeae*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus thermophilus*.

Дополнительно был проведен анализ исследуемых образцов по штаммовому разнообразию с использованием программы TAGMA (Россия) [18] (табл. 5). В МП медианное значение количества штаммов было увеличено по сравнению с ММД для видов *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae*. Больше число штаммов на образец было также показано для вида *Enterococcus faecium*, однако максимальное число штаммов было выше в группе ММД. Меньшее разнообразие штаммов в группе МП показано для вида *Bacteroides fragilis*. Помимо этого, у вида *Klebsiella pneumonia* медианное значение количества штаммов на образец было идентичным для обеих групп, но в МП выявлено значительно большее максимальное число штаммов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для исследования потенциальных механизмов, посредством которых МКЧ может влиять на правильное нейроструктурное и нейрокогнитивное развитие у здоровых детей в раннем возрасте, мы сосредоточились на группе бактериальных генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений,

коррелирующих с дисрегуляциями, которые приводят к нейрометаболическим нарушениям и нервно-психическому расстройству — депрессии. Использование составленного каталога гомологов к отобранной группе генов позволило нам определить нейрометаболическую сигнатуру ММД. С помощью сигнатурного подхода были выявлены виды бактерий, которые содержат наибольшее число генов (более семи генов) для продукции различных нейроактивных соединений и, следовательно, потенциально оказывающие большее влияние на развитие и функционирование мозга ребенка. К этим видам относятся: *B. uniformis*, *F. prausnitzii*, *L. bacterium* и *P. distasonis*, которые являются комменсалами микробиоты кишечника здоровых детей раннего возраста [22]. Эти бактерии содержат гены, кодирующие белки, участвующие в продукции уксусной, пропионовой и масляной кислот, ГАМК, и ферменты с антиоксидантными свойствами, которые оказывают положительное воздействие на психическое здоровье человека. *B. uniformis*, *F. prausnitzii* и *L. bacterium* вошли в коровую метагеномную сигнатуру кишечной микробиоты здоровых детей, которая может служить биомаркерным показателем микробиоты в норме у детей данного возраста.

Представленные исследования являются пилотными, это начальный этап изучения изменений в метаболическом потенциале кишечной микробиоты здоровых детей от раннего возраста до подросткового. Пока для сравнения была использована небольшая выборка группы подростков. Необходимо было определить, происходят ли изменения в микробиоте за время развития ребенка до взрослого возраста. Для этого проводили сравнение таксономических профилей и содержания бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений.

Таблица 3. Относительная представленность родов бактерий, найденных в группах ММД и МП

Род	Представленность в группе ММД, %	Представленность в группе МП, %	Соотношение ММД/МП	Скорректированное P-value	Число найденных образцов (из 30), %
<i>Akkermansia</i>	1,36 ± 3,33	0,38 ± 0,75	0,28	0,182	90
<i>Alistipes</i>	8,98 ± 7,60	7,22 ± 5,25	0,8	0,54	100
<i>Bacteroides</i>	49,16 ± 20,00	39,73 ± 18,84	0,81	0,261	100
<i>Bifidobacterium</i>	1,64 ± 2,93	3,08 ± 7,50	1,88	0,763	97
<i>Blautia</i>	1,05 ± 1,63	0,31 ± 0,16	0,3	0,237	100
<i>Butyricimonas</i>	0,33 ± 0,39	0,60 ± 0,84	1,84	0,232	100
<i>Cupriavidus</i>	0,02 ± 0,04	0,51 ± 1,30	22,3	0,178	80
<i>Faecalibacterium</i>	5,15 ± 4,85	3,42 ± 1,91	0,66	0,595	100
<i>Flavonifractor</i>	1,00 ± 1,57	0,24 ± 0,18	0,24	0,015	100
<i>Lachnospira</i>	1,22 ± 2,76	0,29 ± 0,29	0,24	0,18	100
<i>Odoribacter</i>	0,75 ± 0,79	1,28 ± 0,97	1,7	0,109	100
<i>Parabacteroides</i>	3,15 ± 4,03	2,63 ± 0,95	0,83	0,529	100
<i>Paraprevotella</i>	0,50 ± 0,89	0,88 ± 0,78	1,76	0,129	100
<i>Phascolarctobacterium</i>	1,05 ± 2,16	0,93 ± 1,26	0,89	0,652	57
<i>Prevotella</i>	0,22 ± 0,35	2,06 ± 3,31	9,24	0,033	100
<i>Pseudomonas</i>	0,17 ± 0,11	0,57 ± 0,40	3,43	1	100
<i>Roseburia</i>	1,40 ± 1,40	1,21 ± 1,23	0,87	0,485	100
<i>Ruminococcus</i>	1,59 ± 3,04	0,61 ± 0,82	0,39	0,457	97
<i>Xanthomonas</i>	0,07 ± 0,08	0,66 ± 0,59	10	1	100

Примечание: в таблице даны только роды, найденные в более чем 50% образцов и с представленностью не менее 0,5%.

Были выявлены различия в количественном содержании бактериальных генов для продукции и деструкции нейрометаболических соединений в составе сравниваемых метагеномов детей разного возраста, что является важнейшим результатом данного исследования. В МП обнаружено двукратное увеличение представленности генов, кодирующих ферменты, участвующие в продукции пропионовой, уксусной и масляной кислот, глутамата, триптофана, деградации гистидина, продукции конъюгированной линолевой кислоты и белков с антиоксидантными свойствами. Все эти соединения, как известно, оказывают положительное влияние на функционирование как кишечника, так и головного мозга и сохранение общего гомеостаза организма. Сообщалось, что уровень короткоцепочечных жирных кислот влияет на энергетический гомеостаз хозяина [23]. Триптофан служит субстратом для выработки нейромедиатора серотонина [24]. Нейротрансмиттеры серотонин и глутамат являются критическим звеном при депрессивном состоянии [25]. Конъюгированная линолевая кислота и белки с антиоксидантными свойствами играют важную защитную роль при окислительном стрессе. Содержание других выявленных генов было незначительным и с небольшой количественной разницей. Эти данные, вероятно, отражают разную степень значимости исследуемых бактериальных генов в поддержании нормального развития нервной системы у здоровых детей. Дальнейшие транскриптомные и метаболомные анализы будут проведены для экспериментального подтверждения полученных результатов биоинформатического анализа метагеномов.

Ранее проведенные исследования (основанные на анализе генов 16S рПНК), направленные на сравнение кишечной микробиоты детей разного возраста, показали существенные различия в таксономическом составе [26]. В нашем исследовании для сравнительного метагеномного анализа использованы данные, полученные с применением технологии секвенирования

метагенома методом дробовика. Хотя для сравнения была использована небольшая выборка МП, полученные результаты также показывают среднестатистическую разницу в составе таксонов кишечной микробиоты детей разного возраста. В МП было показано статистически значимое увеличение бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria*, и отсутствовало достоверное различие для типов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Альфа-биоразнообразие МП оказалось выше как на родовом, так и на видовом уровнях, что соответствует опубликованным данным о более разнообразной микробиоте подростков по сравнению с маленькими детьми [26]. Высокое биоразнообразие часто коррелирует с повышенным содержанием пробиотических бактерий. В наших исследованиях в МП выявлено больше бифидобактерий (*B. adolescentis*) и лактобактерий. Известно, что бифидобактерии и лактобациллы проявляют пробиотические свойства, и недавно они были предложены в качестве «психобиотиков» за их способность продуцировать нейромодуляторы и влиять на взаимоотношения кишечника и мозга [27]. Статистически значимое увеличение относительного содержания было показано в МП для представителей рода *Prevotella* и снижение содержания бактерии *A. muciniphila*, которая показывает отрицательную корреляцию с ожирением и воспалением [28]. Возможно, наблюдаемые изменения в составе микробиоты у детей по мере их взросления происходят под воздействием диеты и гормонов. В свою очередь изменения в композиции микробиоты могут влиять на развитие различных отделов головного мозга [29].

Нами получены данные о штаммовом разнообразии сравниваемых групп метагеномов. Выявлено медианное увеличение бактериальных штаммов в МП для патогенных бактерий видов *C. botulinum*, *C. perfringens*, *E. coli* и *S. pneumoniae*. Возможно, это связано с возрастанием случаев применения антибиотикотерапии во время взросления. Интересно отметить, что в группе МП



Таблица 4. Относительная представленность видов бактерий, найденных в группах ММД и МП

Вид	Представленность в группе ММД, %	Представленность в группе МП, %	Соотношение ММД/МП	Скорректированное P-value	Число найденных образцов (из 30), %
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1,35 ± 3,33	0,37 ± 0,75	0,28	0,127	90
<i>Alistipes communis</i>	0,94 ± 1,57	1,20 ± 0,91	1,27	0,075	100
<i>Alistipes dispar</i>	0,65 ± 1,39	0,29 ± 0,26	0,44	0,299	100
<i>Alistipes finegoldii</i>	2,55 ± 4,74	1,53 ± 2,25	0,6	0,662	100
<i>Alistipes onderdonkii</i>	2,65 ± 3,10	1,40 ± 2,10	0,53	0,3	100
<i>Alistipes shahii</i>	1,41 ± 2,37	1,82 ± 2,19	1,29	0,322	100
<i>Bacteroides caccae</i>	2,03 ± 3,24	2,21 ± 1,58	1,09	0,174	100
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	1,69 ± 4,02	3,52 ± 6,67	2,09	0,111	100
<i>Bacteroides dorei</i>	7,92 ± 7,74	4,15 ± 3,17	0,52	0,358	100
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,52 ± 3,84	1,62 ± 0,88	0,46	0,101	100
<i>Bacteroides ovatus</i>	4,87 ± 5,50	1,74 ± 0,97	0,36	0,218	100
<i>Bacteroides sp. A1C1</i>	1,77 ± 1,19	1,03 ± 0,67	0,58	0,05	97
<i>Bacteroides sp. CBA7301</i>	0,28 ± 0,34	0,75 ± 1,35	2,65	0,252	100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,39 ± 2,29	1,38 ± 0,81	0,58	0,515	100
<i>Bacteroides uniformis</i>	5,87 ± 3,97	3,44 ± 2,51	0,59	0,109	100
<i>Bacteroides vulgatus</i>	7,78 ± 8,96	9,41 ± 10,14	1,21	0,54	100
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	2,17 ± 3,21	0,94 ± 0,83	0,43	0,629	100
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,41 ± 1,08	2,55 ± 6,60	6,17	0,227	93
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,76 ± 2,14	0,19 ± 0,36	0,25	0,568	97
<i>Blautia sp. SC05B48</i>	0,87 ± 1,56	0,18 ± 0,10	0,21	0,315	100
<i>Butyrivibrio faecalis</i>	0,33 ± 0,39	0,60 ± 0,84	1,84	0,208	100
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5,15 ± 4,85	3,42 ± 1,91	0,66	0,571	100
<i>Flavonifractor plautii</i>	1,00 ± 1,57	0,24 ± 0,18	0,24	0,012	100
<i>Lachnospira eligens</i>	1,22 ± 2,76	0,29 ± 0,29	0,24	0,151	100
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	0,75 ± 0,79	1,28 ± 0,97	1,7	0,134	100
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1,63 ± 2,03	1,35 ± 0,38	0,83	0,261	100
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	0,50 ± 0,89	0,88 ± 0,78	1,76	0,16	100
<i>Roseburia intestinalis</i>	0,99 ± 1,35	0,91 ± 1,08	0,92	0,878	100
<i>Ruminococcus bicirculans</i>	1,45 ± 2,99	0,41 ± 0,82	0,29	0,306	97
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	0,05 ± 0,08	0,64 ± 0,58	11,73	1	100

Примечание: в таблице даны только виды, найденные в более чем 50% образцов и с представленностью не менее 0,5%.

в среднем больше штаммов на образец для вида *E. faecium* и меньше штаммов для *B. fragilis*. Изменения в штаммовом составе микробиоты могут привести к изменению ее метаболической активности, поскольку продуцирование различных активных соединений бактериями штаммоспецифично. Комбинирование методов секвенирования методом дробовика и подхода метагеномных сигнатур в совокупности с биоинформатическими инструментами, позволяющими проводить таксономический анализ на уровне штаммов, может дать нам возможность строить метагеномные сигнатуры уже на уровне штаммов. Это, в свою очередь, должно помочь выявить способность к специфичной продукции нейроактивных соединений у новых штаммов. Данную информацию можно будет использовать в дальнейшем для создания методов диагностики состояния пациентов с такими нейропсихиатрическими заболеваниями, как депрессия, а также для разработки таргетной терапии для улучшения их состояния с применением фарма-, про-, пре и/или психобиотиков [30].

## Выводы

Полученные результаты подтверждают и расширяют растущий массив доказательств того, что микробные сообщества кишечника становятся более разнообразными и функциональными в процессе взросления их хозяев. Кишечные бактериальные сообщества значительно обогащаются генами, участвующими в метаболизме нейроактивных соединений и соединений с противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, необходимыми для неврологической функции. Эти изменения происходят в ответ на внутренние и внешние факторы, такие как диета, антибиотики, гормоны, различные стрессы и др. Выявленная нейрометаболическая сигнатура микробиома у здоровых детей раннего возраста может служить биомаркером нормального состояния МКЧ. Будущие исследования должны быть направлены на выявление метагеномной сигнатуры кишечной микробиоты здоровых детей разного возраста из разных медико-социальных групп.

Таблица 5. Разнообразие штаммов в найденных видах бактерий, определенное при помощи программы TAGMA в группах ММД и МП

Вид	ММД		МП	
	Число образцов; доля образцов (из 23)	Штаммов на образец в среднем [мин.; макс.]	Число образцов; доля образцов (из 7)	Штаммов на образец в среднем [мин.; макс.]
<i>Anaerostipes hadrus</i>	20; 0,87	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	23; 1,00	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	22; 0,96	2 [1; 3]	7; 1,00	2 [1; 3]
<i>Bacteroides clarus</i>	22; 0,96	1 [1; 2]	6; 0,86	1 [1; 1]
<i>Bacteroides dorei</i>	14; 0,61	3 [3; 3]	5; 0,71	3 [1; 3]
<i>Bacteroides faecis</i>	18; 0,78	1 [1; 2]	4; 0,57	2 [1; 2]
<i>Bacteroides finegoldii</i>	21; 0,91	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [2; 3]
<i>Bacteroides fragilis</i>	20; 0,87	7 [2; 11]	7; 1,00	2 [1; 11]
<i>Bacteroides intestinalis</i>	22; 0,96	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Bacteroides ovatus</i>	22; 0,96	5 [1; 5]	7; 1,00	5 [1; 5]
<i>Bacteroides vulgatus</i>	21; 0,91	3 [1; 4]	7; 1,00	3 [2; 4]
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	21; 0,91	3 [1; 4]	7; 1,00	3 [2; 4]
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14; 0,61	2 [1; 3]	6; 0,86	2 [1; 3]
<i>Bifidobacterium longum</i>	20; 0,87	4 [1; 6]	5; 0,71	4 [3; 5]
<i>Blautia obeum</i>	23; 1,00	3 [3; 3]	7; 1,00	3 [3; 3]
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	22; 0,96	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	14; 0,61	1 [1; 1]	5; 0,71	1 [1; 1]
<i>Clostridium asparagiforme</i>	21; 0,91	1 [1; 1]	3; 0,43	1 [1; 1]
<i>Clostridium botulinum</i>	23; 1,00	2 [1; 6]	7; 1,00	3 [1; 5]
<i>Clostridium pasteurianum</i>	22; 0,96	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Clostridium perfringens</i>	23; 1,00	2 [1; 5]	7; 1,00	4 [2; 5]
<i>Clostridium sporogenes</i>	17; 0,74	1 [1; 2]	5; 0,71	2 [1; 2]
<i>Coprococcus catus</i>	13; 0,57	1 [1; 1]	6; 0,86	1 [1; 1]
<i>Coprococcus comes</i>	19; 0,83	1 [1; 2]	6; 0,86	1 [1; 2]
<i>Dialister invisus</i>	14; 0,61	2 [1; 2]	4; 0,57	2 [1; 2]
<i>Dorea formicigenerans</i>	23; 1,00	2 [1; 3]	7; 1,00	2 [1; 3]
<i>Eggerthella lenta</i>	16; 0,70	2 [1; 2]	2; 0,29	2 [1; 2]
<i>Enterococcus faecium</i>	23; 1,00	1 [1; 8]	6; 0,86	2 [1; 2]
<i>Escherichia coli</i>	20; 0,87	10 [2; 54]	7; 1,00	25 [4; 40]
<i>Eubacterium ramulus</i>	22; 0,96	1 [1; 1]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Eubacterium rectale</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Eubacterium ventriosum</i>	13; 0,57	1 [1; 1]	5; 0,71	1 [1; 1]
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	23; 1,00	5 [5; 5]	7; 1,00	5 [5; 5]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17; 0,74	2 [1; 29]	6; 0,86	2 [1; 5]
<i>Parabacteroides merdae</i>	15; 0,65	3 [2; 3]	5; 0,71	2 [2; 3]
<i>Roseburia intestinalis</i>	23; 1,00	4 [4; 4]	7; 1,00	4 [4; 4]
<i>Roseburia inulinivorans</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [2; 2]
<i>Ruminococcus bromii</i>	23; 1,00	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Ruminococcus gnavus</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Ruminococcus lactaris</i>	23; 1,00	1 [1; 1]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Ruminococcus torques</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14; 0,61	1 [1; 4]	3; 0,43	5 [1; 10]
<i>Streptococcus suis</i>	12; 0,52	1 [1; 1]	4; 0,57	1 [1; 1]
<i>Veillonella parvula</i>	12; 0,52	1 [1; 3]	3; 0,43	1 [1; 3]

## Литература

- Oleskin A. V., Shenderov B. A., Rogovskiy V. S. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020; 286 с.
- Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017; 66 (4): 515–22.
- Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1388.
- Oleskin AV, Shenderov BA, Rogovsky VS. Role of neurochemicals in the interaction between the micro-biota and the immune and the nervous system of the host organism. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2017; 9 (3): 215–34.
- Warner BB. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders. *Pediatr Res.* 2019; 85 (2): 216–24.
- Шендеров Б. А., Голубев В. Л., Данилов А. Б., Прищепа А. В. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания. *Неврология.* 2016; 1: 7–13.
- Yahfoufi N, Matar C, Ismail N. Adolescence and aging: impact of adolescence inflammatory stress and microbiota alterations on brain development, aging, and neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; 75 (7): 1251–7.
- Forde BM, O'Toole PW. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Brief Funct Genomics.* 2013; 12 (5): 440–53.
- Averina OV, Kovtun AS, Polyakova SI, Savilova AM, Rebrikov DV, Danilenko VN. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *J Med Microbiol.* 2020; 69 (4): 558–71.
- Kovtun AS, Averina OV, Alekseeva MG, Danilenko VN. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of children with autistic spectrum disorder as possible predictors of the disease. *Microb Drug Resist.* 2020; 26 (11): 1307–20.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30 (15): 2114–20.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9 (4): 357–9.
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017; 27 (5): 824–34.
- Ковтун А. С., Аверина О. В., Захаревич Н. В., Касьянов А. С., Даниленко В. Н. In silico определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме. *Генетика.* 2018; 54 (9): 1101–10.
- Caspani G, Kennedy S, Foster JA, Swann J. Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. *Microb Cell.* 2019; 6 (10): 454–81.
- Wood DE, LU J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019; 20 (1): 257.
- Klimina KM, Voroshilova VN, Poluekyova EU, Veselovsky VA, Yunes RA, Kovtun AS, et al. Toxin-antitoxin systems: a tool for taxonomic analysis of human intestinal microbiota. *Toxins (Basel).* 2020; 12 (6): 388.
- Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucl Acids Res.* 2010; 38 (12): e132.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25 (14): 1754–60.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010; 26 (1): 139–40.
- Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, et al. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Na. Commun.* 2019; 10: 1517.
- Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond).* 2015; 39 (9): 1331–8.
- Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kaptruczak N, Dougherty DM. Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res.* 2009; 2: 45–60.
- Lewis CP, Port JD, Blacker CJ, Sonmez AI, Seewoo BJ, Leffler JM, et al. Altered anterior cingulate glutamatergic metabolism in depressed adolescents with current suicidal ideation. *Transl Psychiatry.* 2020; 10: 119.
- Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012; 486 (7402): 222–7.
- Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019; 11 (4): 1071–85.
- Derrien M, Belzer C, de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb Pathog.* 2016; 106: 171–81.
- Bonham KS, Bruchhage MMK, Rowland S, Volpe AR, Dyer K, RESONANCE Consortium, et al. Gut microbes and their genes are associated with brain development and cognitive function in healthy children. 2020. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.13.944181v3>.
- Yunes RA, Poluektova EU, Vasileva EV, Odorskaya MV, Marsova MV, Kovalev GL, et al. A Multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020; 12 (3): 973–9.

## References

- Oleskin AV, Shenderov BA. Microbial communication and microbiota-host interactions: biomedical, biotechnological, and biopolitical implications. New York: Nova Science Publishers, 2020; 389 p.
- Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017; 66 (4): 515–22.
- Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1388.
- Oleskin AV, Shenderov BA, Rogovsky VS. Role of neurochemicals in the interaction between the micro-biota and the immune and the nervous system of the host organism. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2017; 9 (3): 215–34.
- Warner BB. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders. *Pediatr Res.* 2019; 85 (2): 216–24.
- Shenderov BA, Golubev VL, Danilov AB, Prischeva AV. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания. *Неврология.* 2016; 1: 7–13. Russian.
- Yahfoufi N, Matar C, Ismail N. Adolescence and aging: impact of adolescence inflammatory stress and microbiota alterations on brain development, aging, and neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; 75 (7): 1251–7.
- Forde BM, O'Toole PW. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Brief Funct Genomics.* 2013; 12 (5): 440–53.
- Averina OV, Kovtun AS, Polyakova SI, Savilova AM, Rebrikov DV, Danilenko VN. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *J Med Microbiol.* 2020; 69 (4): 558–71.
- Kovtun AS, Averina OV, Alekseeva MG, Danilenko VN. Antibiotic

- resistance genes in the gut microbiota of children with autistic spectrum disorder as possible predictors of the disease. *Microb Drug Resist*. 2020; 26 (11): 1307–20.
11. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
  12. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114–20.
  13. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9 (4): 357–9.
  14. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res*. 2017; 27 (5): 824–34.
  15. Kovtun AS, Averina OV, Zakharevich NV, Kasianov AS, Danilenko VN. In silico identification of metagenomic signature describing neurometabolic potential of normal human gut microbiota. *Russ J Genet*. 2018; 54 (9): 1101–10.
  16. Caspani G, Kennedy S, Foster JA, Swann J. Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. *Microb Cell*. 2019; 6 (10): 454–81.
  17. Wood DE, LU J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 2019; 20 (1): 257.
  18. Klimina KM, Voroshilova VN, Poluektova EU, Veselovsky VA, Yunes RA, Kovtun AS, et al. Toxin-antitoxin systems: a tool for taxonomic analysis of human intestinal microbiota. *Toxins (Basel)*. 2020; 12 (6): 388.
  19. Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucl Acids Res*. 2010; 38 (12): e132.
  20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25 (14): 1754–60.
  21. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
  22. Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, et al. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Na. Commun*. 2019; 10: 1517.
  23. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39 (9): 1331–8.
  24. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kaptruczak N, Dougherty DM. Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009; 2: 45–60.
  25. Lewis CP, Port JD, Blacker CJ, Sonmez AI, Seewoo BJ, Leffler JM, et al. Altered anterior cingulate glutamatergic metabolism in depressed adolescents with current suicidal ideation. *Transl Psychiatry*. 2020; 10: 119.
  26. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486 (7402): 222–7.
  27. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019; 11 (4): 1071–85.
  28. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog*. 2016; 106: 171–81.
  29. Bonham KS, Bruchhage MMK, Rowland S, Volpe AR, Dyer K, RESONANCE Consortium, et al. Gut microbes and their genes are associated with brain development and cognitive function in healthy children. 2020. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.13.944181v3>.
  30. Yunes RA, Poluektova EU, Vasileva EV, Odorskaya MV, Marsova MV, Kovalev GL, et al. A Multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020; 12 (3): 973–9.