

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

IRSTI: 34.15.31, 34.25.15

I.S. KOROTETSKIY^{1*}, T.V. KUZNETSOVA¹, O.N. REVA²,
L. IVANOVA¹, N. ZUBENKO¹, R. PARENOVA¹, S.V. SHILOV¹¹Scientific Center for Anti-Infectious Drugs, Almaty, Kazakhstan²Centre for Bioinformatics and Computational Biology, University of Pretoria, Pretoria,
South Africa

*e-mail: laeda1@mail.ru

ANALYSIS OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DIVERSITY OF MOUSE
INTESTINAL VIROME AFTER TREATMENT OF DRUG-RESISTANT PNEUMONIA
WITH A COORDINATION COMPOUND

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.05

Abstract

The viral component of the gut microbiome has been poorly studied to date. Expanding knowledge about the role of the virome will make it possible to use it for therapeutic and prophylactic purposes in the future. This article shows the effect of the antibiotic drug cefazolin and the coordination compound CC-195, used for the treatment of *Staphylococcus aureus*, on the diversity of viral taxa in the intestines of mice.

The samples taken from the group the infected mice treated solely with cefazolin reflect a significant disturbance of the normal intestinal microbiota by the antibiotic therapy. The viromes of the infected mice treated with CC-195 either alone or together with cefazolin showed the closest similarity to the original virome in the negative control animals. So the coordination compound CC-195 is capable of stabilizing the intestinal virome (microflora) both when used with the antibiotic and on its own.

Keywords: Metagenome, NGS sequencing, Virome, Principal Component Analysis.

Antibiotics are now the means of first choice against bacterial infections. But along with the enormous benefits for mankind, the harm of their use is also obvious as they suppress not only the pathogens, but also the beneficial resident microflora, primarily of the intestines, reducing its population by 30% on average. Recovery of the normal resident microflora after one week of application of antibiotics, then may take from 6 months to 1 year. Also, the gut microbiome can affect the body's response to drugs by the enzymatic transformation of their structures and alteration their bioavailability, bioactivity and/or toxicity [1-3].

The microflora of the digestive tract is a heterogeneous mixture of microorganisms. It includes about 1000 species of bacteria, viruses, fungi, and archaea [4]. The abundance and species diversity of microbiome varies in different parts of the intestine, reaching a maximum of 10^{10} - 10^{12} CFU/ml in the colon. The microbiome includes a complete set of microorganisms, their genes and metabolites. It contains 100 times more genes than the human genome [5]. Most of the intestinal microbiota are strict anaerobes. Microorganisms colonize the intestines immediately after birth. Their composition is influenced by the genetics and nutrition of the host, the medications he or she takes, and the environment [6].

As a result of weakened immunity, the irrational use of antibiotics, chemotherapy, and defects in production of enzymes, the microbial balance is disturbed up to the disappearance of some representatives of microflora (*E. coli*, lactic acid bacteria, and bifidobacteria) and the appearance of *Candida* fungi, *Pseudomonas*, *Staphylococci*, and Protists. There appear digestive disorders, and when the immune system generalized forms of infection including sepsis may be developed by the endogenous opportunistic pathogens. Therefore, monitoring species diversity of

the microbiome, quantitative ratios of the normal and pathogenic microflora, all this is necessary for controlling adverse effects of antibiotics and restoration of the normal microflora [7]. It has also been proven that the intestinal microbiota plays a fundamental role in maintaining homeostasis not only of the intestine, but also of the body as a whole down to the gene regulation of the host. The relationships between changes in the composition of the microbiota of the gastrointestinal tract and the development of cardiovascular diseases (chronic heart failure), metabolic disorders (obesity, type II diabetes), allergic manifestations (atopic dermatitis, bronchial asthma) and autoimmune diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes I) has been clinically proven [8-12].

Apart from bacteria, viruses are widespread in the intestinal microbiome, which are represented mainly by bacteriophages, but also by viruses of eukaryotes (those affecting eukaryotic cells, primarily human cells in the gut), as well as plant viruses entering the gastrointestinal tract (GIT) with food [13]. Viruses of eukaryotes account for about 10%. The main part of the virome from 50% to 90%, depending on the GIT section, are crAss-like phages [14]. A smaller part of phages is represented by the families *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, and *Siphoviridae*. Virome contributes significantly to the structure and functioning of the intestinal microbiota, affecting the health status of the GIT [15, 16]. Changes in the abundance of viruses in GIT can lead to chronic diseases such as Crohn's disease, ulcerative colitis and chronic recurrent inflammatory bowel diseases. The viral component of the human microbiome is understudied and poorly understood compared to the bacterial part of the microbiome [17]. A detailed research in this area will shed light on the role of phages and other viruses in the stability of microbiome and its restoration after antibiotic therapy.

Qualitative and quantitative analysis of diversity of the intestinal virome using whole-genome sequencing has an undeniable advantage over other research methods. The information obtained by metagenomic monitoring of fluctuations in abundance and composition of bacteriophages can aid in improving the control over the effectiveness and possible side effects during an antibiotic treatment of infectious diseases and drugs used for microbiome restoration. The aim of this study was to investigate whether the newly developed iodine-containing preparation CC-195 showing an activity against antibiotic resistant pathogens will also affect the virome of laboratory mice when applied solely or in combination with the antibiotic cefazolin.

Materials and methods

Sample collection. White laboratory mice of both sexes were used in this study. The animals were divided into 5 experimental groups: A) Negative control – intact animals; B) Positive control – infected and untreated animals; C) Infected animals treated with 100.0 mg/kg of CC-195; D) Infected animals treated with 25.0 mg/kg of cefazolin; E) Infected animals treated with both: CC-195 and cefazolin as described above. The mice were infected with the clinical drug-resistant strain *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. Treatment was started after microbiological and molecular (PCR) confirmation of the infection. The drugs were administered once per day. During the joint therapy, CC-195 was first administered *per os*, and the antibiotic was administered intramuscularly after 30 minutes. The therapy was carried out for 5 days.

Whole mouse intestines were placed in 10 ml of saline solution containing 0.1% Tween 80. The intestines were washed three times with a syringe using a minimal amount of saline. The resulting suspension was centrifuged for 10 minutes at 500 g at 4°C to remove fecal masses and intestinal epithelial cells. The resulting liquid was centrifuged for 10 min at 16000 g at 4°C to obtain bacterial precipitate.

DNA Extraction. DNA samples were extracted from bacterial cells using PureLink Genomic DNA Kits (Publication Number: MAN0000601, Revision 2.0) following the manufacturer's recommendations. The integrity, size, quality and quantity of the isolated genomic DNA from bacterial strains were determined using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) at the optical wavelengths of 260 nm and 280 nm and by electrophoresis in 2% agarose gels.

Sequencing and Bioinformatic Analysis. An Ion Torrent PGM sequencer (Life Technologies, United States) was used for metagenomic DNA sequencing. DNA sequencing library was obtained by enzymatic method using Ion Xpress Plus Fragment Library kit (Life Technologies, USA). DNA from isolates was barcoded using an Xpress Barcode Adapters kit (Life Technologies, USA). Sequencing of the DNA library was performed on a 318 chip using the Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit. All operations were performed according to the developer's protocols. All samples were sequenced in 6 repeats.

Further processing of the DNA reads was performed using software tools as described below with default parameter settings if not indicated otherwise. The quality control of the obtained DNA fragments and trimming was performed using the UGENE v.44.0 program. [18].

DNA fragments were identified using the Kaiju program [19] using the NCBI BLAST database nr: Bacteria, Archaea, Viruses. Fragments of DNA, mouse and/or human genomes were considered contamination and excluded from the subsequent analysis. Bacterial and viral taxa were separated using an in-house script written in the Python 2.7. Further analysis was performed using DNA fragments affiliated with Viruses.

The program Past 4.02 [20] was used to calculate metagenome statistics. The following parameters were calculated:

- Depth of resolution of taxonomic diversity of metagenomic samples (rarefaction curves);
- Parameters of alpha-diversity of taxa in samples - SHE-analysis;
- Analysis of differences between metagenomic samples by principal component method (beta diversity).

The principal component analysis (PCA) is a statistical method of reducing the dimensionality of a data set by linearly transforming the data into a new coordinate system in which (most of) the variation in the data can be described with fewer measurements than the original data. To perform PCA, the absolute values of the numbers of DNA fragments identified to a particular taxon were converted to percentages of the total number. Only those taxa that were represented by at least 1% in at least one experiment were used for analysis.

A SHE analysis was performed in which the software calculated the following 3 alpha-diversity parameters: S - the natural logarithm of the detected number of species in the sample; H - the entropy of taxonomic diversity, also known as the Shannon index; and E - the natural logarithm of the proportionality index of frequencies of different taxa in the sample (evenness, $\ln(E) = H - \ln(S)$). Calculations were performed for consecutive series of sequenced metagenomic samples in order to find out whether all samples belong to the same population. This approach makes it possible to evaluate the contribution of the number of species and their equilibrium to the evolution of diversity [21].

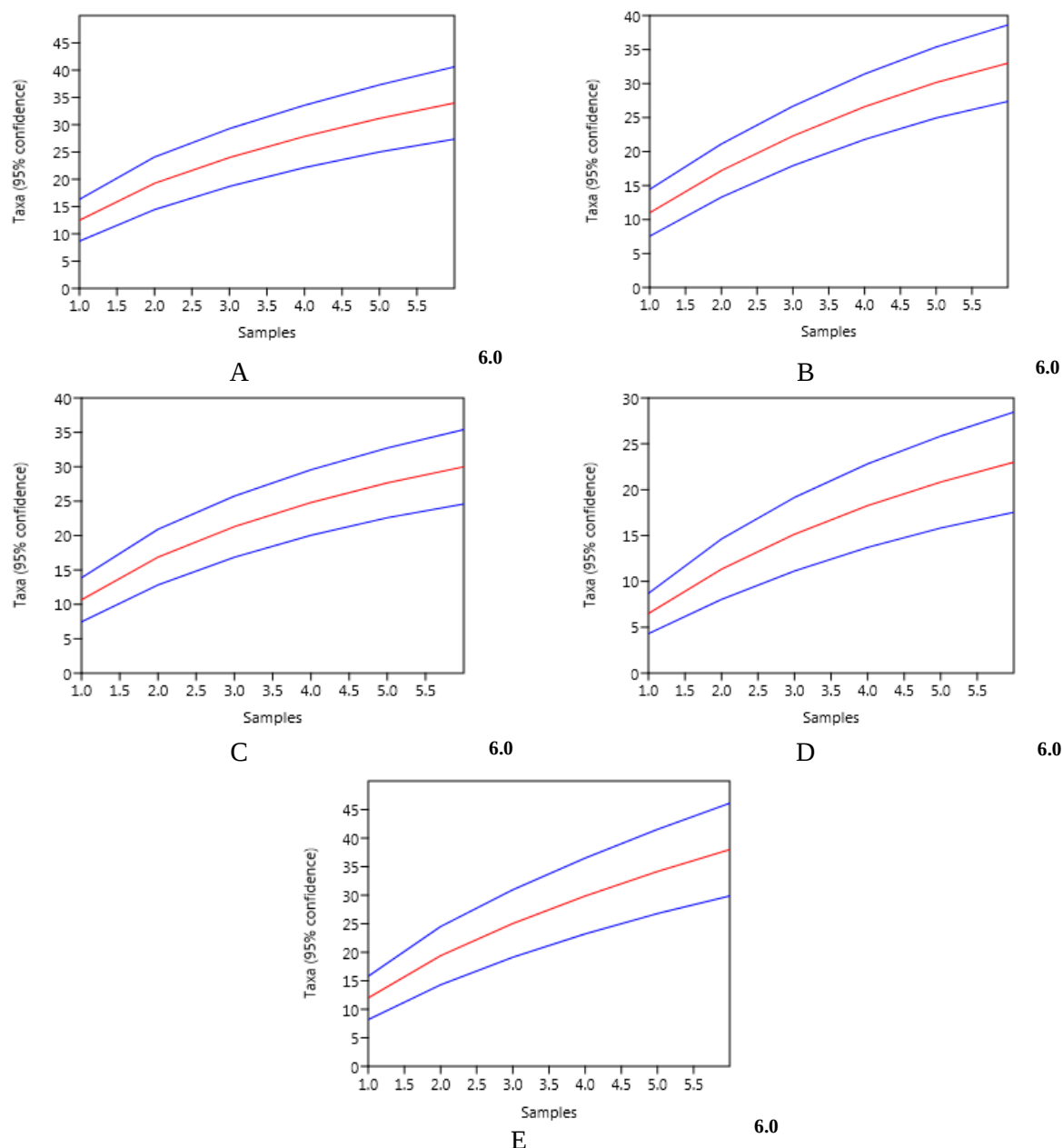
Results and Discussion

The effect of the coordination compound CC-195 on gut microbiome of laboratory mice infected with the drug-resistant (DR) strain *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022 was investigated study. Cefazolin was chosen as a model antibiotic for treating the infected mice as previously it was shown in an in vitro experiment that the strain *S. aureus* SCAID OTT1-2022 regained its sensitivity to this antibiotic under the effect of the coordination compound CC-195.

Entire mouse intestines were used to study the gut microbiome. Intestinal microbiome samples from the mice of each experimental group were sequenced in six repetitions. Quality control of the obtained DNA fragments and trimming was performed using the UGENE v.44.0.

The taxonomic identity of the filtered DNA fragments was performed using the Kaiju program. The program returns the identification results in the form of a text file specifying the identification of each individual DNA fragment to taxonomic IDs (taxid) as they are recorded in the database Taxonomy NCBI. Bacterial and viral taxa were separated using an in-house script written in the Python 2.7. DNA fragment of viral origination according to Kaiju identification were collected and analyzed.

Statistical characteristics of mouse intestinal virome. The statistical method used to estimate species richness of metagenomic samples is rarefaction analysis. The method analyzes the increase of species diversity with the increase of sample size by counting numbers of different taxa in series of experiment or by subdivision of a big sample to a series of subsets of DNA reads. The results often are represented in a form of rarefaction curves (Figure 1).



Note - A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195. Red line - rarefaction curve, blue lines - 95% confidence range.

Figure 1 – Rarefaction curves calculated for five metagenomic samples

Rarefaction curves tend to rise rapidly with the increasing sample size, but then tend to reach a taxonomic saturation point when further increase of the sample size does not add any new taxonomic units. A rarefaction curve shows whether the depth of sequencing of a metagenomic sample was sufficient to recover all or the majority of species inhabiting this econiche. If the saturation point is achieved, the highest number of discovered taxa corresponds to the observed species richness. Figure 1 shows rarefaction curves estimated by program Past 4.02 for the gut

microbiome samples of laboratory mice at five different conditions, namely: A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195. The program calculates the standard deviation of the observed species richness depicted by blue lines in Figure 1.

Species richness (S) predicted by the rarefaction analysis is one of the statistical parameters of alpha-diversity of metagenomic samples. Two other popular parameters are Shannon coefficient (H) representing the entropy of species diversity in a sample; and evenness (E) that calculates how uniform is the sample in term of abundance of different species. Program Past 4.02 combines these parameters in a SHE analysis on series of repeated experiments to estimate the stability of the microbiome over time or in different repetitions of the experiment. Figure 2 shows SHE curves calculated for each experimental repetition at five different conditions. The conditions are marked in the same way as in Figure 1.

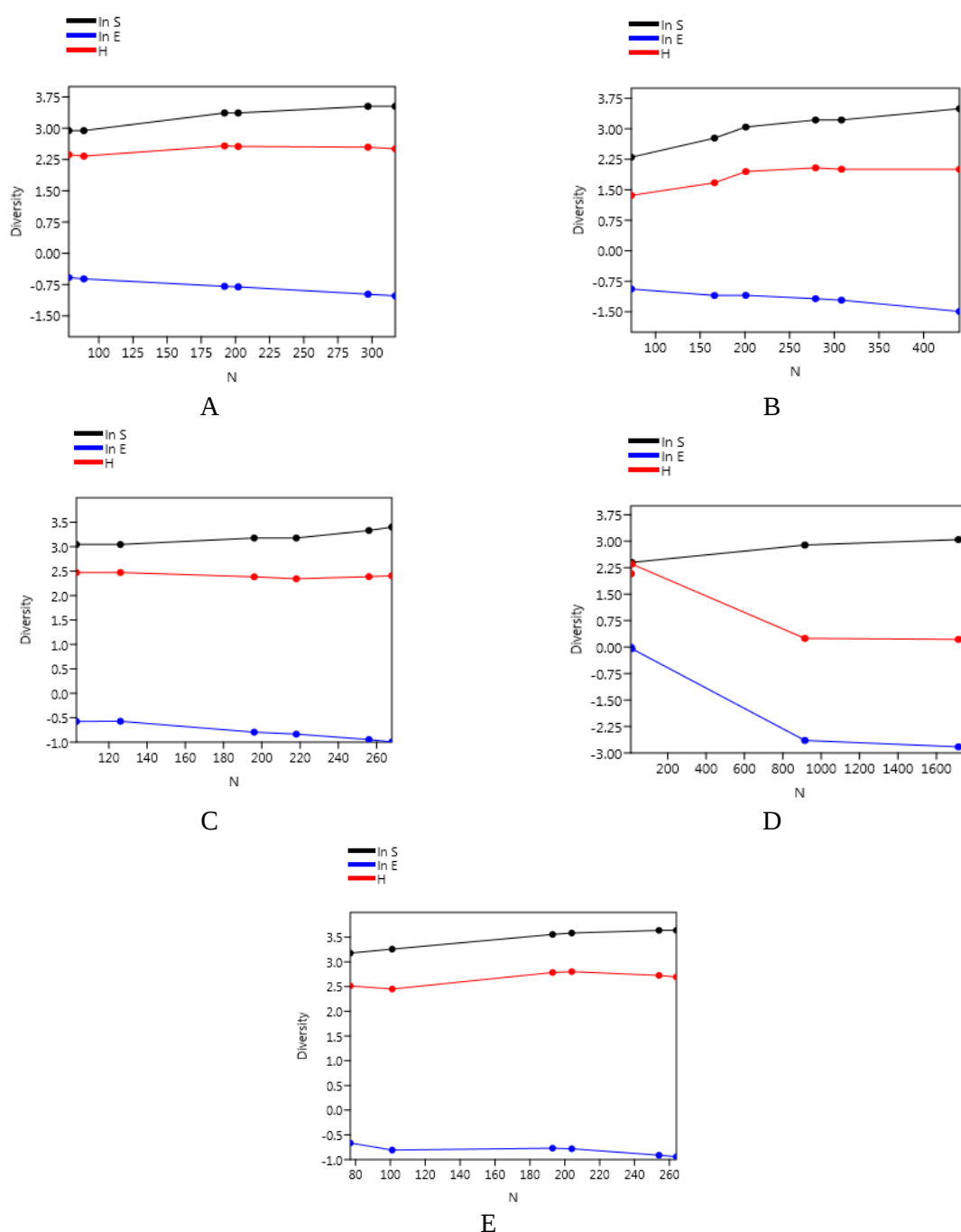
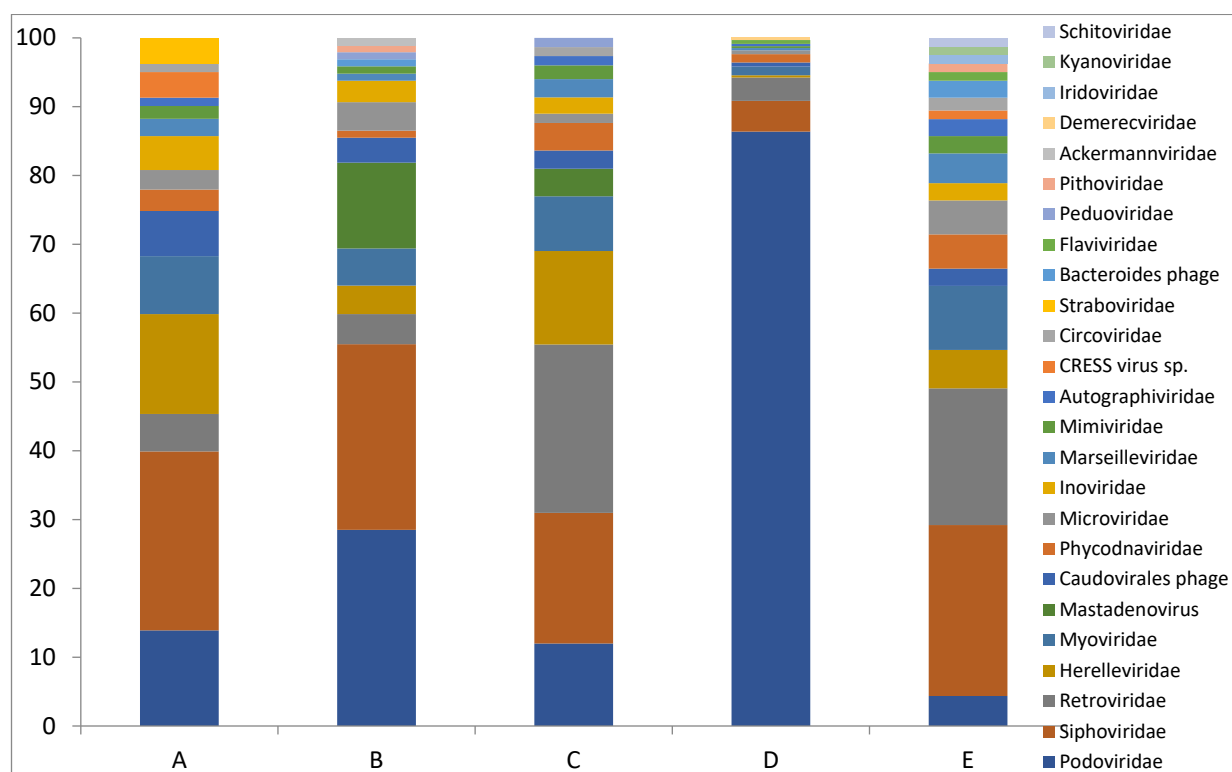


Figure 2 – SHE analysis calculated for five metagenomic samples

Let's consider statistical characteristics of viromes at different conditions. The highest taxonomic richness (around 40) was observed in the negative control and when the mice were treated with cefazolin and CC-195 (Figure 1A, E). SHE curves at these conditions (Figure 2A, E) correspond to what could be expected in the case of rich and stable microbial populations: the observed species richness (S) steadily increases with addition of the repeated experimental samples (small dots on the curves), whereas the evenness (E) steadily decreases due to discovering new rare taxonomic units in every new sample of the series; and the Shannon diversity (H) fluctuates around the average value. The statistical parameters recorded at other conditions show several specific alterations. When the mice remain untreated (Figure 1B), or treated only with cefazolin or CC-195 (Figure 1C, D), the virome taxonomic richness drops to 20-30 taxonomic units that probably reflects the reduction of the whole gut microbiome in the results of infection causing an increased immune response, and due to an antibacterial action of cefazolin. Noteworthy that the largest drop of the species richness was observed in the samples taken from the mice treated exclusively with cefazolin (Figure 1D).

The SHE analysis confirmed that the virome of the infected and untreated mice (Figure 2B) as well as the mice treated with cefazolin (Figure 2D) were the most unbalanced. The SHE parameters varied from one animal to another animal representing the individual response to the infection and the antibiotic treatment. Interestingly, in the case of treatment of the infected animals with CC-195 (Figure 2C), despite of the slight drop of the species richness, the virome remained stable in all the mice of this group.

Taxonomic diversity. An overview of viral taxonomic diversity of the samples from different experimental groups is shown in Figure 3. This analysis explains in more detail the statistical differences between the samples discussed above.



Note - The abscissa axis represents the studied groups, the ordinate axis represents the number of taxa in %. A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195.

Figure 3 – Taxonomic diversity

The administration of cefazolin dramatically reduces the diversity of viruses in mice intestines compared to the negative control and the virome restored in the infected animals treated with the antibiotic and CC-195. The virome of the animals treated solely with cefazolin is reduced to two families of phages, *Podoviridae* and *Siphoviridae*, composing 90% of the virome (Figure 3). Some level of virome reduction can be observed the infected and untreated animals, possibly due to an activation of their immune system; and the a less extend, in the infected animals treated with CC-195. In all viromes, various bacteriophages were in majority represented by different families: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae*, *Microviridae* and *Myoviridae*. However, the viruses associated with eukaryotes also were abundant including retroviruses of the family *Orthoretroviridae* (a possible pathogen of mice).

Therefore, in order to identify similarity relationships between the viromes of different experimental groups, the principal component analysis (PCA) was performed (Figure 4). The studies predominantly use the first two principal components to display data in two dimensions and visually identify clusters of closely related data points [22].

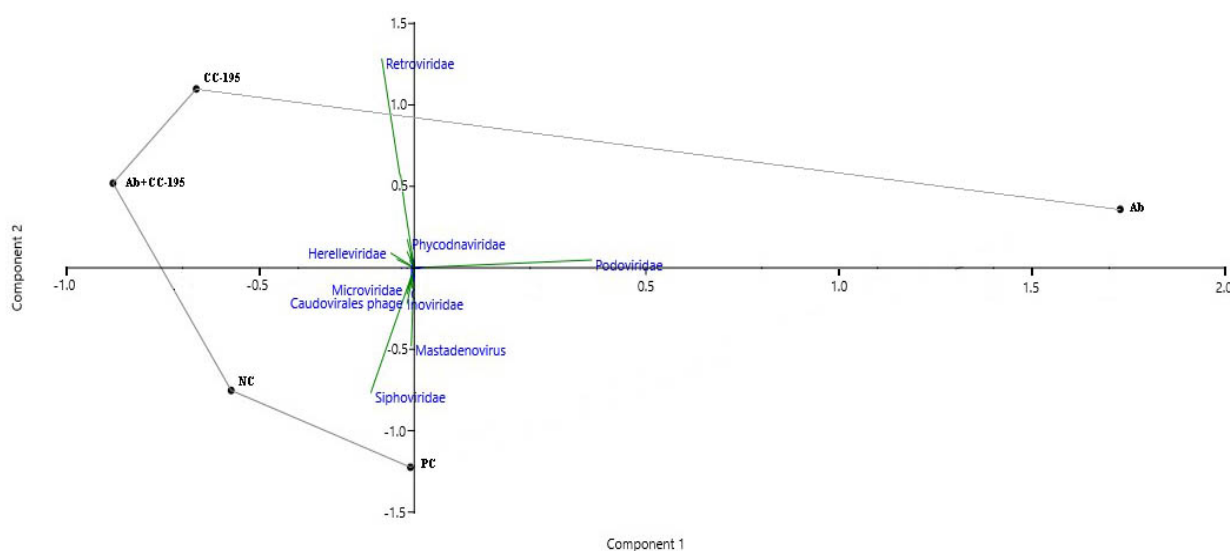


Figure 4 – Plot of principal components and contributions of frequencies of different taxa to differences between experiments

On Figure 4 it should be pointed out that the samples taken from the group the infected mice treated solely with the antibiotic were the most distant from all the other experiments that reflects a significant disturbance of the normal intestinal microbiota by the antibiotic therapy. The viromes of the infected mice treated with CC-195 either alone or together with cefazolin showed the closest similarity to each other and they also were similar to the original virome in the negative control animals and that in the infected and untreated animals (Figure 4). This indicates that the coordination compound CC-195 is capable of stabilizing the intestinal microflora both when used with the antibiotic and on its own.

Conclusion

The quantitative and qualitative composition of the virome of experimental animals after treatment with the coordination compound CC-195 and cefazolin was determined.

The biggest difference between the samples was that the use of the antibiotic apparently leads to a significant reduction of the taxonomic diversity of the bacterial microflora that in turn leads to a reduction in the diversity of the phages.

An interesting finding was that the application of the coordination compound CC-195 can stabilize the gut microflora of the infected mice and those of them treated with the antibiotic.

Funding

This study was supported by the grant BR09458960 of the program “Study of reversion of antibiotic resistance of pathogenic microorganisms for 2021-2023” provided by the Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Microbiology Laboratory (SCAID) for providing clinical isolate *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022, and the Laboratory of Pharmacology and Toxicology (SCAID) for the maintenance of animal.

References:

- 1 Patangia D., Ryan C., Dempsey E., Ross R., Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiology Open*, 2022, 11(1): e1260 (doi.org/10.1002/mbo3.1260).
- 2 Vila A.V., Collij V., Sanna S., Sinha T., Imhann F., Bourgonje A.R., Mujagic Z., Jonkers D., Masclee A., Fu J., Kurilshikov A., Wijmenga C., Zhernakova A., Weersma R. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-11 (doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z).
- 3 Wilson I., Nicholson J. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*, 2017, 179: 204-222 (doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002).
- 4 Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burdorf K.S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65 (doi.org/10.1038/nature08821).
- 5 Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848 (doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017).
- 6 Ahn J., Hayes R. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease. *Annual Review of Public Health*, 2021, 42: 277-292 (doi.org/10.1146/annurev-publhealth-012420-105020).
- 7 Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 2017, 474(11): 1823-1836 (doi.org/10.1042/BCJ20160510).
- 8 Wang L., Wang S., Zhang Q., He C., Fu C., Wei Q. The role of the gut microbiota in the health and cardiovascular diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, 3(30): 1-50 (doi.org/10.1186/s43556-022-00091-2).
- 9 Liu R., Hong J., Xu X., Feng Q., Zhang D., Gu Y. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 2017, 23: 859-868 (doi.org/10.1038/nm.4358).
- 10 The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 2019, 569: 641-648 (doi: 10.1038/s41586-019-1238-8).
- 11 Han P., Gu J., Li L., Wang X., Wang H., Wang Y., Chang C., Sun J. The association between intestinal bacteria and allergic diseases-cause or consequence? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11(650893): 1-22 (doi.org/10.3389/fcimb.2021.650893).
- 12 Luca F.D., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 195(1): 71-85 (doi.org/10.1111/cei.13158).
- 13 Cao Z., Sugimura N., Burgermeister E., Ebert M.P., Zuo T., Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *The Lancet*, 2022, 81: 104-113 (doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113).
- 14 Dutilh B.E., Cassman N., McNair K., Sanchez S.E., Silva G.Z., Boling L., Barr J.J., Speth D.R., Seguritan V., Aziz R.K., Felts B., Dinsdale E.A., Mokili J.L., Edwards R.A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature communications*, 2014, 5, 4498: 1-11 (doi.org/10.1038/ncomms5498).

15 Spencer L., Olawuni B., Singh P. Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 1-11 (doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706).

16 Zhao G., Vatanen T., Droit L., Park A., Kostic A.D., Poon T.W., Vlamakis H., Siljander H., Harkonen T., Hamalainen A.M. et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E6166-E6175 (doi.org/10.1073/pnas.1706359114).

17 Hillman E.T., Lu H., Yao T., Nakatsu C.H. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 2018, 32(4): 300-313 (doi.org/10.1264/jsme2.ME17017).

18 Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1963-1965 (doi.org/10.1093/bioinformatics/bty901).

19 Menzel P., Ng K.L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 2016, 7: 1-9 (doi.org/10.1038/ncomms11257).

20 Hammer O., Harper D.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1), 4: 1-9 (doi.org/palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

21 Buzas M.A., Hayek L.C. SHE analysis for biofacies identification. *Journal of Foraminiferal Research*, 1998, 28(3): 233-239.

22 Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions of the royal society A*, 2016, 374: 1-16 (doi.org/10.1098/rsta.2015.0202).

И.С. КОРОТЕЦКИЙ^{1*}, Т.В. КУЗНЕЦОВА¹, О.Н. РЕВА², Л.Н. ИВАНОВА¹,
Н.В. ЗУБЕНКО¹, Р.А. ПАРЕНОВА¹, С.В. ШИЛОВ¹

¹ Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

² Биоинформатика және есептеу биология орталығы, Претория университеті, Претория,
Оңтүстік Африка

*e-mail: laeda1@mail.ru

ДӘРІ-ДЕРМЕКТЕРГЕ ТӨЗІМДІ ПНЕВМОНИЯНЫ КООРДИНАЦИЯЛЫҚ ҚОСЫЛЫСПЕН ЕМДЕГЕННЕН KEЙІН ТЫШҚАНДАРДЫҢ ІШЕК ВИРУСЫНЫҢ САПАЛЫҚ ЖӘНЕ САНДЫҚ ӘРТҮРЛІЛІГІН ТАЛДАУ

Түйін

Осы уақытқа дейін ішек микробиомының вирустық құрылымы аз зерттелген. Виром маңыздылығы жайында білімді кеңейту болашақта оны емдік-профилактикалық мақсаттарда пайдалануға мүмкіндік береді. Бұл мақалада алтынтүстес стафилококкты емдеу үшін қолданылатын цефазолин антибиотигі мен КС-195 координациялық қосылысының тышқандар ішектеріндегі вирустық таксондардың әртүрлілігіне әсері көрсетілген.

Тек цефазолинмен емделген ауру тышқандар тобынан алынған үлгілер антибактериялық терапия нәтижесінде қалыпты ішек микробиотасының айтарлықтай бұзылуын көрсетеді. КС-195-тің тек өзін немесе цефазолинмен бірге қабылдаған ауру тышқандардың виромдары теріс бақылау тобындағы жануарлардың бастапқы виромына ең жақын ұқсастығын көрсетті. Сонымен, КС-195 координациялық қосылысы антибиотикпен бірге қолданғанда да, өздігінен де ішек виромын (микрофлорасын) тұрақтандыруға қабілетті.

Кілтті сөздер: метагеном, NGS секвенирлеу, виром, негізгі компоненттерді талдау.

МРНТИ: 34.15.31, 34.25.15

И.С. КОРОТЕЦКИЙ^{1*}, Т.В. КУЗНЕЦОВА¹, О.Н. РЕВА², Л.Н. ИВАНОВА¹,
Н.В. ЗУБЕНКО¹, Р.А. ПАРЕНОВА¹, С.В. ШИЛОВ¹

¹ Научный центр противоинфекционных препаратов, Алматы, Казахстан

² Центр биоинформатики и вычислительной биологии, Университет Претории, Претория,
Южная Африка

*e-mail: laeda1@mail.ru

АНАЛИЗ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРОМА КИШЕЧНИКА МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОЙ ПНЕВМОНИИ КООРДИНАЦИОННЫМ СОЕДИНЕНИЕМ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.05

Аннотация

Вирусная составляющая кишечного микробиома на сегодняшний день мало изучена. Расширение знаний о роли вирома позволит в будущем использовать его в лечебно-профилактических целях. В этой статье показано влияние антибиотика цефазолина и координационного соединения КС-195, используемых для лечения золотистого стафилококка, на разнообразие вирусных таксонов в кишечнике мышей.

Образцы, полученные у группы инфицированных мышей, получавших только цефазолин, отражают значительное нарушение нормальной кишечной микробиоты в результате антибактериальной терапии. Виromы инфицированных мышей, получавших терапию КС-195 либо отдельно, либо вместе с цефазолином, показали сходство с исходным виромом у животных отрицательного контроля. Так, координационное соединение КС-195 способно стабилизировать кишечный виром (микрофлору) как при применении вместе с антибиотиком, так и самостоятельно.

Ключевые слова: метагеном, NGS-секвенирование, виром, анализ главных компонент.

Антибиотики на сегодняшний день являются панацеей от множества заболеваний. Но наряду с огромной пользой для человечества так же очевиден и вред от их применения. Он проявляется в агрессивном вмешательстве не только в жизнедеятельность болезнетворных микроорганизмов, но и в угнетении роста полезной микрофлоры, в первую очередь кишечника, снижая ее численность в среднем на 30%. Восстановление нормофлоры после недельного курса приема антибиотиков может составлять от 6 месяцев до 1 года. Также микробиом кишечника может повлиять на реакцию организма на лекарственное вещество путем ферментативного преобразования его структуры и изменения биодоступности, биоактивности или токсичности [1-3].

Микрофлора пищеварительного тракта представляет собой гетерогенную смесь микроорганизмов. В ее состав входит около 1000 видов бактерий, вирусов, грибов и архей [4]. Количество и видовое разнообразие микроорганизмов в различных отделах кишечника разнится, достигая максимальных показателей в толстой кишке 10^{10} - 10^{12} КОЕ/мл. Микробиом включает в себя полный набор микроорганизмов, их генов и метаболитов. Он содержит в 100 раз больше генов, чем геном человека [5]. Большинство кишечной микробиоты является строгими анаэробами. Микроорганизмы колонизируют кишечник сразу после рождения. На их состав оказывает влияние генетика и питание хозяина, принимаемые им лекарственные препараты, а также окружающая среда [6].

В результате ослабления иммунитета, нерационального применения антибиотиков, химиотерапии, дефектов в выработке ферментов нарушается микробный баланс вплоть до исчезновения некоторых представителей микрофлоры (кишечной палочки, молочнокислых и бифидобактерий) и появления грибов рода кандиды, синегнойной палочки, стафилококков и протей. Появляются расстройства пищеварения, а при снижении иммунитета может

развиться генерализованная форма эндогенной инфекции вплоть до сепсиса. Поэтому, мониторинг видового разнообразия микроорганизмов, их количественного соотношения в норме и при различных патологиях, необходим для разработки различных подходов в восстановлении микробиоценоза [7]. Также доказано, что кишечная микробиота играет фундаментальную роль в поддержании гомеостаза не только кишечника, но и всего организма в целом вплоть до генетического уровня. Клинически доказана взаимосвязь изменения состава микробного профиля желудочно-кишечного тракта с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (хроническая сердечная недостаточность), нарушениями обмена веществ (ожирение, сахарный диабет II типа), аллергическими (атопический дерматит, бронхиальная астма) и аутоиммунными заболеваниями (болезнь Крона, язвенный колит, сахарный диабет I) [8-12].

Помимо бактерий, в микробиоме кишечника широко распространены вирусы, которые представлены в основном бактериофагами, но также и вирусами эукариот (поражающими эукариотические клетки, в первую очередь клетки человека в кишечнике), а также растительными вирусами, попадающими в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) с пищей [13]. Вирусы эукариот составляют около 10%. Основную часть виroma, от 50 до 90%, в зависимости от отдела ЖКТ, составляют crAss-подобные фаги [14]. Меньшая часть фагов представлена семействами *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*. Виrom вносит значительный вклад в структуру и функционирование кишечной микробиоты, влияя на состояние здоровья ЖКТ [15, 16]. Изменения количества вирусов в ЖКТ могут привести к хроническим заболеваниям, таким как болезнь Крона, язвенный колит и хронические рецидивирующие воспалительные заболевания кишечника. Вирусный компонент микробиома человека недостаточно изучен и плохо изучен по сравнению с бактериальной частью микробиома [17]. Подробные исследования в этой области прольют свет на роль фагов и других вирусов в стабильности микробиома и его восстановлении после антибактериальной терапии.

Качественный и количественный анализ разнообразия кишечного виroma с помощью полногеномного секвенирования имеет неоспоримое преимущество перед другими методами исследования. Информация, полученная в результате метагеномного мониторинга колебаний численности и состава бактериофагов, может помочь в улучшении контроля за эффективностью и возможными побочными эффектами при лечении инфекционных заболеваний антибиотиками и препаратами для восстановления микробиома. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы выяснить, будет ли вновь разработанный йодсодержащий препарат КС-195, обладающий активностью в отношении устойчивых к антибиотикам патогенов, также влиять на виrom лабораторных мышей при применении отдельно или в комбинации с антибиотиком цефазолином.

Материалы и методы

Сбор образцов. В исследовании использовали белых лабораторных мышей обоего пола. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп: А) Отрицательный контроль – интактные животные; Б) Положительный контроль – инфицированные и нелеченные животные; В) Инфицированным животным вводили 100,0 мг/кг КС-195; Г) Инфицированные животные, получавшие 25,0 мг/кг цефазолина; Д) Инфицированные животные, обработанные как КС-195, так и цефазолином, как описано выше. Мышей заражали лекарственно устойчивым клиническим штаммом *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. Лечение начинали после микробиологического и молекулярного (ПЦР) подтверждения инфекции. Препараты вводили один раз в сутки. При совместной терапии, сначала вводили координационное соединение КС-195 *per os*, через 30 минут внутримышечно вводили антибиотик. Терапия проводилась в течение 5 дней.

Кишечник мыши (полностью) помещали в 10 мл физиологического раствора, содержащего 0,1% Твина 80. Кишечник трижды промывали минимальным количеством физиологического раствора. Полученную суспензию центрифугировали 10 минут при 500g

при температуре 4°C для удаления фекальных масс и клеток эпителия кишечника. Полученную надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 16000g при температуре 4°C для получения бактериального осадка.

Экстракция ДНК. Образцы ДНК извлекали из бактериальных клеток с использованием набора PureLink Genomic DNA Kit (номер публикации: MAN0000601, редакция 2.0) в соответствии с рекомендациями производителя. Целостность, качество и количество выделенной геномной ДНК из бактериальных штаммов определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) при длинах волн оптического излучения 260 и 280нм и методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Секвенирование и биоинформационный анализ. Для секвенирования метагеномной ДНК использовали секвенатор Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). ДНК библиотеку получали ферментативным методом с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library (Life Technologies, США). Баркодирование ДНК проводили с помощью набора Xpress Barcode Adapters (Life Technologies, США). Секвенирование библиотеки ДНК осуществляли на чипе 318 с использованием набора для секвенирования Ion PGM Hi-Q View. Все операции проводились согласно протоколам разработчика. Все образцы были секвенированы в 6 повторах.

Дальнейшую обработку полученных ридов ДНК проводили с использованием программ, с настройками параметров по умолчанию, если не указано иное. Контроль качества полученных фрагментов ДНК и тримминг проводили с помощью программы UGENE v.44.0. [18].

Фрагменты ДНК идентифицировали с помощью программы Kaiju [19] по базе данных NCBI BLAST nr: Bacteria, Archaea, Viruses. Фрагменты ДНК, мышинового и/или человеческого геномов считались загрязнением и исключались из последующего анализа. Разделение бактериальных и вирусных таксонов осуществлялось при помощи собственного скрипта, написанного на языке программирования Python 2.7. Дальнейший анализ проводился по фрагментам, идентифицированным как таксон Viruses.

Для вычисления статистических данных метагеномов использовалась программа Past 4.02 [20]. Вычислялись следующие параметры:

- Глубина разрешения таксономического разнообразия метагеномных образцов (кривые разрежения);
- Параметры альфа-разнообразия таксонов в образцах - SHE-анализ;
- Анализ отличий между метагеномными образцами методом главных компонент (бета-разнообразии).

Метод главных компонент (PCA) — это статистический метод уменьшения размерности набора данных путем линейного преобразования данных в новую систему координат, в которой (большую часть) вариации данных можно описать с меньшим количеством измерений, чем исходные данные. Для проведения PCA абсолютные значения числа фрагментов ДНК, идентифицированных до определенного таксона, были преобразованы в проценты от общего числа. Для анализа использовались только те таксоны, которые были представлены не менее 1% хотя бы в одном эксперименте [21].

Был проведен SHE-анализ, в ходе которого программа рассчитала следующие 3 параметра альфа-разнообразия: S - натуральный логарифм обнаруженного количества видов в образце; H - энтропия таксономического разнообразия, известная также как индекс Шеннона; E - натуральный логарифм показателя пропорциональности частот различных таксонов в выборке (равномерность, $\ln(E) = H - \ln(S)$). Расчеты проводились для последовательных серий секвенированных метагеномных образцов, чтобы выяснить, принадлежат ли все образцы к одной и той же популяции. Такой подход позволяет оценить вклад числа видов и их равновесия в эволюцию разнообразия.

Результаты и обсуждение

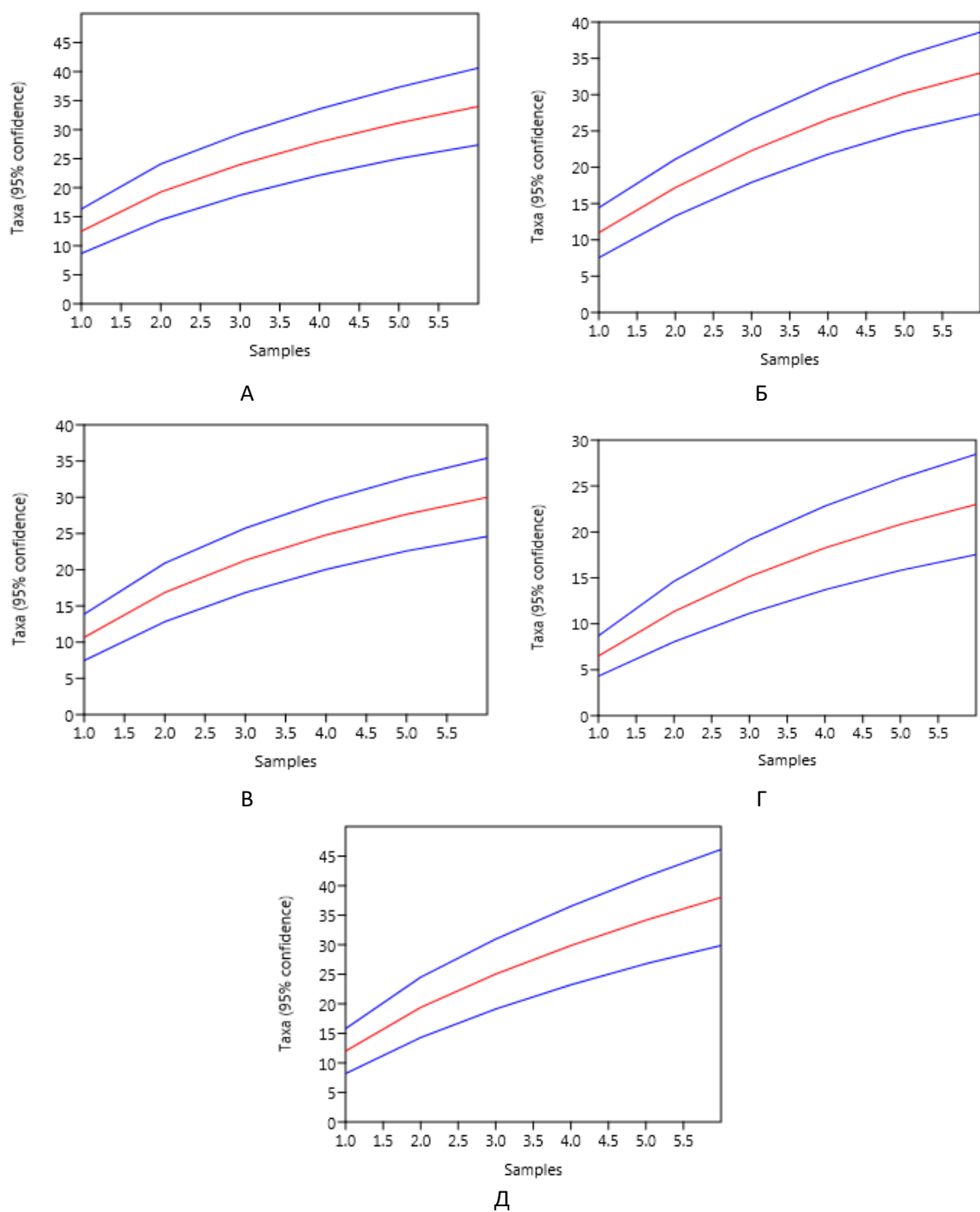
Исследовано влияние координационного соединения КС-195 на микробиом кишечника лабораторных мышей, инфицированных лекарственно-устойчивым (ЛУ) штаммом *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. В качестве модельного антибиотика для лечения инфицированных мышей был выбран цефазолин, так как ранее в эксперименте *in vitro* было показано восстановление чувствительности штамма *S. aureus* SCAID OTT1-2022 к этому антибиотику под действием координационного соединения КС-195.

Для изучения микробиома кишечника использовали цельный кишечник мышей. Образцы кишечного микробиома мышей каждой экспериментальной группы секвенировали в шести повторах. Контроль качества полученных фрагментов ДНК и обрезку проводили с помощью программы UGENE v.44.0.

Таксономическую принадлежность отфильтрованных фрагментов ДНК проводили с помощью программы Kaiju. Программа возвращает результаты идентификации в виде текстового файла с указанием идентификации каждого отдельного фрагмента ДНК по таксономическим идентификаторам (taxid) по мере их регистрации в базе данных Taxonomy NCBI. Бактериальные и вирусные таксоны были разделены с помощью собственного скрипта, написанного на Python 2.7. Дальнейший анализ проводился по фрагментам идентифицированных и отсортированных как Viruses.

Статистическая характеристика вириома кишечника мышей. Статистический метод, используемый для оценки видового богатства по результатам отбора проб, называется редификацией. Метод позволяет анализировать увеличение видового разнообразия с увеличением размера выборки путем подсчета количества различных таксонов в серии экспериментов или путем разделения большой выборки на серию подмножеств прочтений ДНК. Результаты часто представлены в виде редификационных кривых (рисунок 1). Редификационные кривые имеют тенденцию к быстрому росту с увеличением размера выборки, но затем происходит достижение точки таксономического насыщения, когда дальнейшее увеличение размера выборки не добавляет никаких новых таксономических единиц. Редификационная кривая показывает, была ли глубина секвенирования метагеномной выборки достаточной для восстановления всех или большинства видов, населяющих эту экологическую нишу. При достижении точки насыщения наибольшее количество обнаруженных таксонов соответствует наблюдаемому видовому богатству. На рисунке 1 представлены редификационные кривые, рассчитанные для образцов кишечного микробиома лабораторных мышей в пяти различных условиях, а именно: А — отрицательный контроль, Б — положительный контроль, В — животные, получавшие КС-195, Г — животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195. Метод также вычисляет стандартное отклонение наблюдаемого видового богатства, показанного синими линиями на рисунке 1.

Видовое богатство (S), прогнозируемое с помощью редификационного анализа, является одним из статистических параметров альфа-разнообразия метагеномных выборок. Двумя другими популярными параметрами являются коэффициент Шеннона (H), представляющий энтропию видового разнообразия в образце; и равномерность (E), которая рассчитывает, насколько однородна выборка с точки зрения обилия различных видов. Программа Past 4.02 объединяет эти параметры в SHE-анализе серии повторных экспериментов для оценки стабильности микробиома во времени или в разных повторах эксперимента. На рисунке 2 показаны кривые SHE, рассчитанные для шести повторов при пяти различных условиях. Условия обозначены так же, как на рисунке 1.



Примечание - А - отрицательный контроль, Б - положительный контроль, В - животные, получавшие КС-195, Г - животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195. Красная линия – редификационная кривая, синие линии – доверительный интервал 95%.

Рисунок 1 – Редификационные кривые, рассчитанные для пяти метагеномных образцов

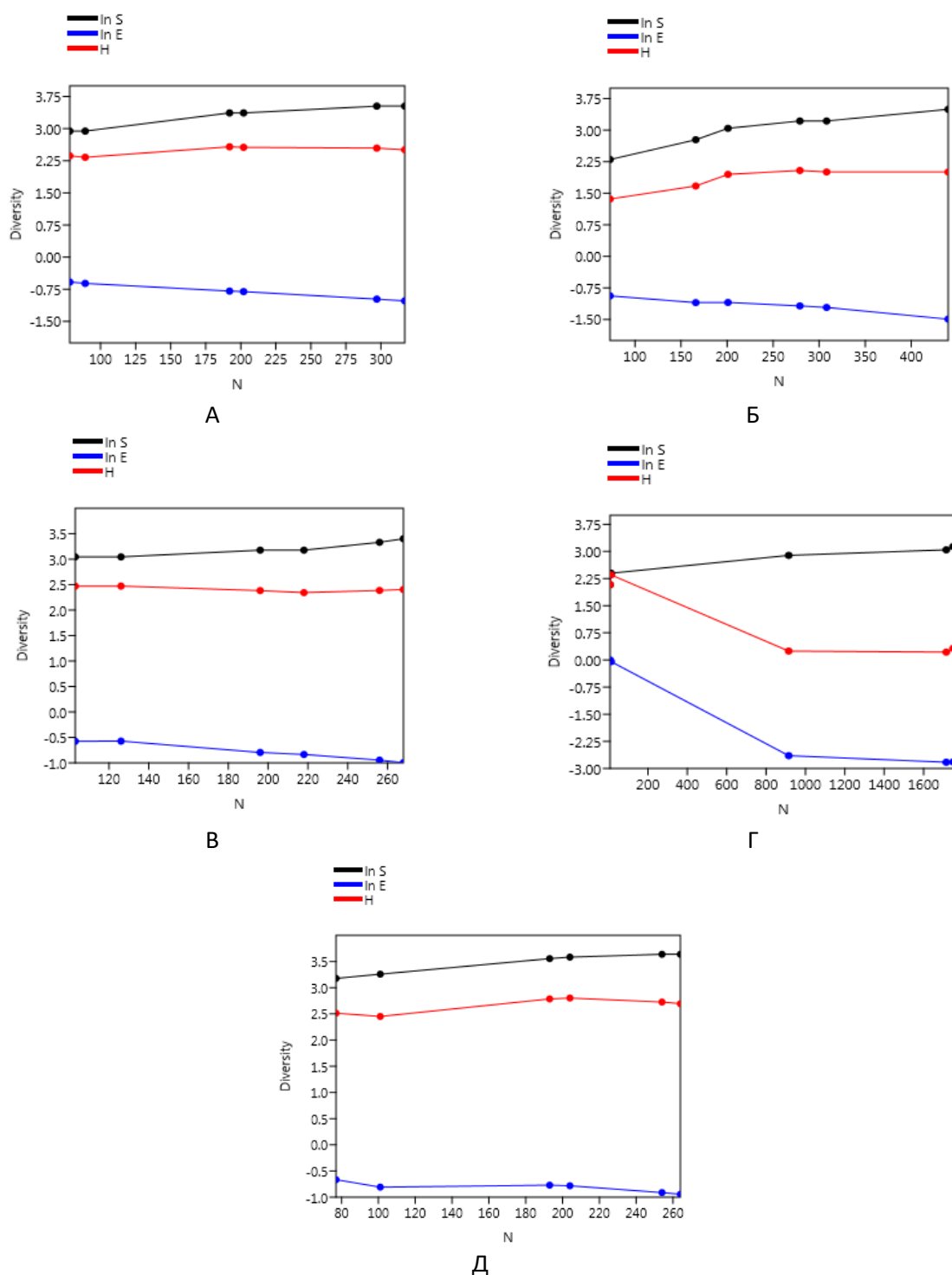


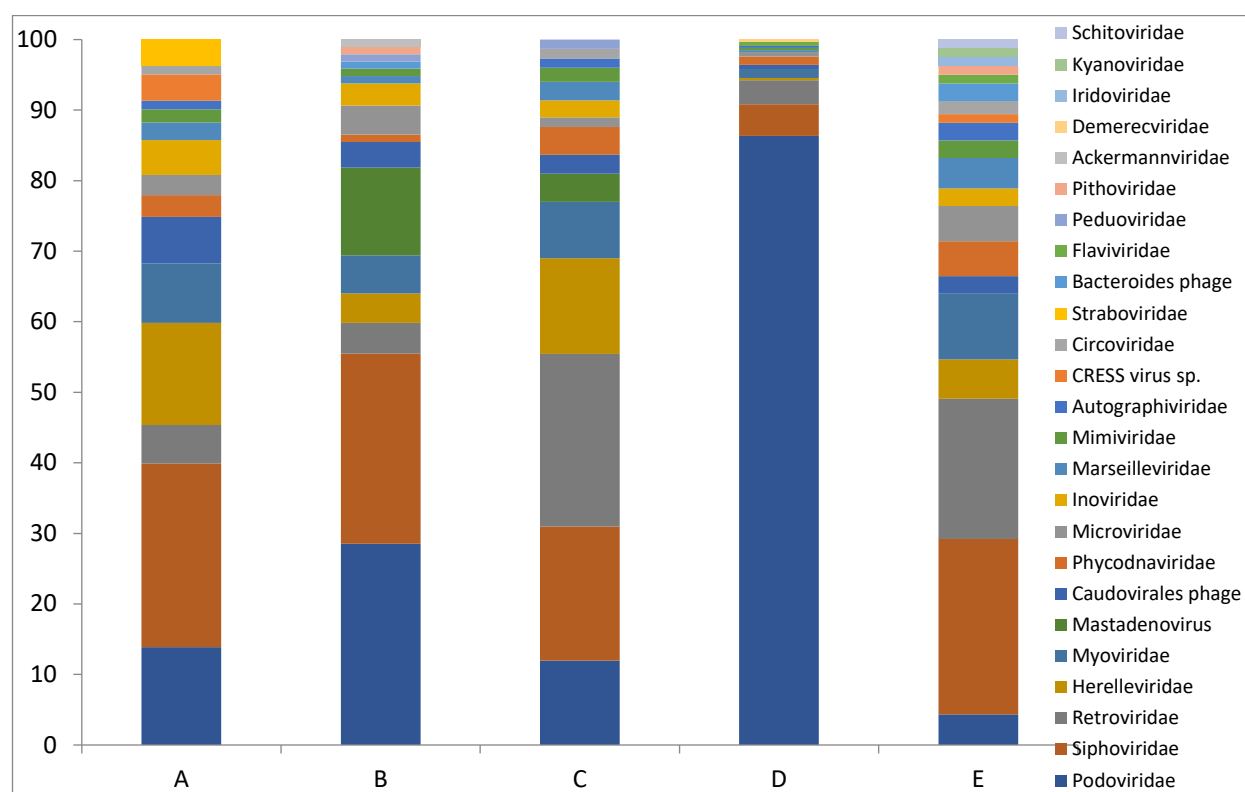
Рисунок 2 – SHE-анализ, рассчитанный для пяти метагеномных образцов

Рассмотрим статистические характеристики виромов в разных условиях. Наибольшее таксономическое разнообразие (около 40) наблюдалось в отрицательном контроле и в группе при комплексном лечении мышей цефазолином и КС-195 (рисунок 1А, Д). Кривые SHE в этих условиях (рисунок 2А, Д) соответствуют тому, что можно было бы ожидать в случае богатых и стабильных микробных популяций: наблюдаемое видовое богатство (S) неуклонно увеличивается с добавлением повторных экспериментальных образцов (маленькие точки на кривых), тогда как выравненность (E) неуклонно снижается за счет обнаружения новых редких таксономических единиц в каждой новой выборке серии; а разнообразие Шеннона (H) колеблется вокруг среднего значения. Статистические параметры, полученные в других экспериментальных группах, показывают несколько

специфических изменений. Когда мыши остаются без лечения (рисунок 1Б) или получают только цефазолин или КС-195 (рисунок 1В, 1Г), таксономическое богатство виroma падает до 20-30 таксономических единиц, что, вероятно, отражает снижение микробиома всего кишечника в результате инфекции, вызывающей повышенный иммунный ответ, и за счет антибактериального действия цефазолина. Примечательно, что наибольшее падение видового разнообразия наблюдалось в образцах, взятых у мышей, получавших исключительно антибиотик цефазолин (рисунок 1Г).

SHE-анализ подтвердил, что виром инфицированных и нелеченых мышей (рисунок 2Б), а также мышей, получавших только цефазолин (рисунок 2Г), был наиболее несбалансированным. Параметры SHE варьировались от одного животного к другому, отражая индивидуальную реакцию на инфекцию и лечение антибиотиком. Интересно, что в случае лечения инфицированных животных координационным соединением КС-195 (рисунок 2Б), несмотря на небольшое падение видового богатства, виром оставался стабильным у всех мышей этой группы.

Таксономическое разнообразие. Обзор вирусного таксономического разнообразия образцов из разных экспериментальных групп показан на рисунке 3. Этот анализ более подробно объясняет статистические различия между образцами, обсуждавшимися выше.



Примечание - По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат - количество таксонов в %. А - отрицательный контроль, Б - положительный контроль, В - животные, получавшие КС-195, Г - животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195.

Рисунок 3 - Таксономическое разнообразие

Использование только цефазолина резко снижает разнообразие вирусов в кишечнике мышей по сравнению с отрицательным контролем и восстановленным виромом у животных, получавших комбинированную терапию антибиотиком и КС-195. Виromы животных, получавших только цефазолин, редуцированы до двух семейств фагов, *Podoviridae* и *Siphoviridae*, составляющих 90% виroma (рисунок 3). Небольшой уровень снижения виroma наблюдается у инфицированных и нелеченых животных, возможно, за

счет активации их иммунной системы; и в меньшей степени - у инфицированных животных, получавших в качестве терапии координационное соединение КС-195. Во всех виромах различные бактериофаги были преимущественно представлены семействами: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae*, *Microviridae* и *Myoviridae*. Вирусы, связанные с эукариотами, также были многочисленны, включая ретровирусы семейства *Orthoretroviridae* (возможный возбудитель мышей).

Поэтому, чтобы выявить отношения сходства между виромами разных экспериментальных групп, был проведен анализ главных компонент (рисунок 4). В исследованиях преимущественно используются первые два основных компонента для отображения данных в двух измерениях и визуального определения кластеров тесно связанных точек данных [22].

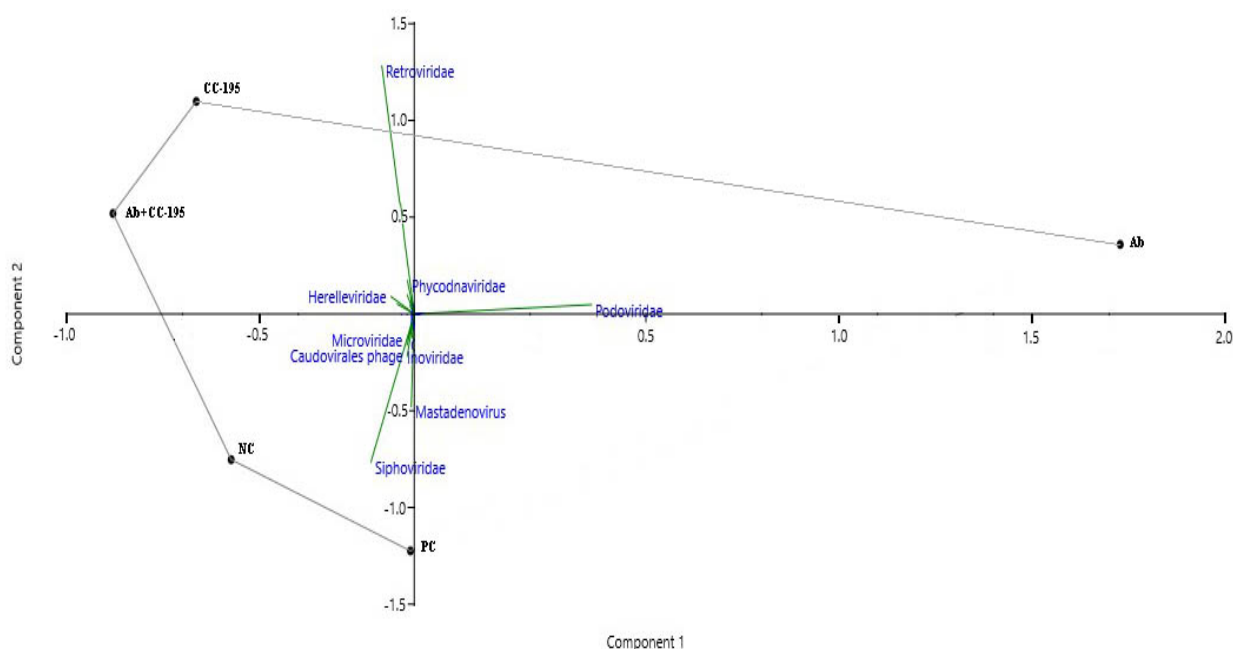


Рисунок 4 - График главных компонент и вклад частот разных таксонов в различия между группами

Следует отметить, что образцы, взятые из группы инфицированных мышей, получавших только антибиотик, оказались наиболее отдаленными от всех остальных экспериментов, что отражает значительное нарушение нормальной кишечной микробиоты при антибактериальной терапии. Вирома инфицированных мышей, получавших КС-195 отдельно или вместе с цефазолином, показали наибольшее сходство друг с другом, а также были сходны с исходным виромом у животных отрицательного контроля, а также у инфицированных и нелеченых животных (рисунок 4). Это свидетельствует о том, что координационное соединение КС-195 способно стабилизировать кишечную микрофлору как при применении с антибиотиком, так и самостоятельно.

Заключение

Определен количественный и качественный состав вирома экспериментальных животных после терапии координационным соединением КС-195 и цефазолином.

Самое большое различие между образцами заключалось в том, что применение антибиотика, по-видимому, приводит к значительному снижению таксономического разнообразия бактериальной микрофлоры, что, в свою очередь, приводит к уменьшению разнообразия фагов.

Интересным открытием стало то, что применение координационного соединения КС-195 может стабилизировать микрофлору кишечника инфицированных мышей и мышей, получавших антибиотик.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта BR09458960 программы «Исследование реверсии антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов на 2021–2023 годы» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории микробиологии АО НЦПП за предоставление клинического изолята *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022 и сотрудникам Лаборатории фармакологии и токсикологии АО НЦПП за содержание животных.

Литература:

- 1 Patangia D., Ryan C., Dempsey E., Ross R., Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiology Open*, 2022, 11(1): e1260 (doi.org/10.1002/mbo3.1260).
- 2 Vila A.V., Collij V., Sanna S., Sinha T., Imhann F., Bourgonje A.R., Mujagic Z., Jonkers D., Masclee A., Fu J., Kurilshikov A., Wijmenga C., Zhernakova A., Weersma R. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-11 (doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z).
- 3 Wilson I., Nicholson J. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*, 2017, 179: 204-222 (doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002).
- 4 Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burdorf K.S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65 (doi.org/10.1038/nature08821).
- 5 Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837–848 (doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017).
- 6 Ahn J., Hayes R. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease. *Annual Review of Public Health*, 2021, 42: 277-292 (doi.org/10.1146/annurev-publhealth-012420-105020).
- 7 Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 2017, 474(11): 1823-1836 (doi.org/10.1042/BCJ20160510).
- 8 Wang L., Wang S., Zhang Q., He C., Fu C., Wei Q. The role of the gut microbiota in the health and cardiovascular diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, 3(30): 1-50 (doi.org/10.1186/s43556-022-00091-2).
- 9 Liu R., Hong J., Xu X., Feng Q., Zhang D., Gu Y. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 2017, 23: 859-868 (doi.org/10.1038/nm.4358).
- 10 The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 2019, 569: 641-648 (doi: 10.1038/s41586-019-1238-8).
- 11 Han P., Gu J., Li L., Wang X., Wang H., Wang Y., Chang C., Sun J. The association between intestinal bacteria and allergic diseases-cause or consequence? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11(650893): 1-22 (doi.org/10.3389/fcimb.2021.650893).
- 12 Luca F.D., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 195(1): 71-85 (doi.org/10.1111/cei.13158).
- 13 Cao Z., Sugimura N., Burgermeister E., Ebert M.P., Zuo T., Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *The Lancet*, 2022, 81: 104-113 (doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113).
- 14 Dutilh B.E., Cassman N., McNair K., Sanchez S.E., Silva G.Z., Boling L., Barr J.J., Speth D.R., Seguritan V., Aziz R.K., Felts B., Dinsdale E.A., Mokili J.L., Edwards R.A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature communications*, 2014, 5, 4498: 1-11 (doi.org/10.1038/ncomms5498).

15 Spencer L., Olawuni B., Singh P. Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 1-11 (doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706).

16 Zhao G., Vatanen T., Droit L., Park A., Kostic A.D., Poon T.W., Vlamakis H., Siljander H., Harkonen T., Hamalainen A.M. et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E6166-E6175 (doi.org/10.1073/pnas.1706359114).

17 Hillman E.T., Lu H., Yao T., Nakatsu C.H. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 2018, 32(4): 300-313 (doi.org/10.1264/jsme2.ME17017).

18 Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1963-1965 (doi.org/10.1093/bioinformatics/bty901).

19 Menzel P., Ng K.L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 2016, 7: 1-9 (doi.org/10.1038/ncomms11257).

20 Hammer O., Harper D.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1), 4: 1-9 (doi.org/palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

21 Buzas M.A., Hayek L.C. SHE analysis for biofacies identification. *Journal of Foraminiferal Research*, 1998, 28(3): 233-239.

22 Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions of the royal society A*, 2016, 374: 1-16 (doi.org/10.1098/rsta.2015.0202).