

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**SEKRETORĀ IGA, IGG UN ZARNU MIKROBIOMA
MIJIEDARBĪBA METFORMĪNA TERAPIJAS LAIKĀ 2. TIPA
CUKURA DIABĒTA PACIENTOS UN VESELOS INDIVĪDOS**

Maģistra darbs

Autore: Līga Birzniece

Studentu apliecības nr.: lb16060

Darba vadītājas:

Dr. biol. Monta Brīvība

Dr. biol. Ilze Elbere

Recenzents: Dr. biol. Artūrs Ābols

RĪGA 2023

Kopsavilkums

Lielu daļu zarnu mikrobiotas klāj imūnglobulīni, tomēr informācija, par to kādu ietekmi uz zarnu mikrobiotas un imūnglobulīnu mijiedarbību atstāj medikamentozās terapijas, ir ierobežota. Izmantojot uz magnētiskām lodītēm balstītu šūnu šķirošanas metodi un NGS, tika noteiktas fēču metagenoma taksonomiskās izmaiņas metformīna terapijas laikā, 40 2TD pacientiem un desmit veseliem indivīdiem. Izmaiņas noteica trīs laika punktos terapijas laikā un trīs frakcijās: metagenoms, sIgA+ un IgG+. Metformīna ietekmē tika novērota *Escherichia* ģints bagātināšanās gan metagenoma, gan frakciju datos. Vislielākais, ar metformīna lietošanu saistītais pieaugums sIgA un IgG frakcijās, tika novērots *Phocaeicola dorei*. Līdzīgi pieauga arī *Intestinibacter bartletti* īpatsvars, taču kā īstermiņa efekts. Starp grupu salīdzinājumos tika novērota spēcīgā *Bacteroides* ģints baktēriju izraisītā imūnā atbilde.

Darbs izstrādāts 05.2021. - 05.2023. Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Atslēgasvārdi: zarnu mikrobioms, sekretorais imūnglobulīns A, imūnglobulīns G, metformīns, cukura diabēts.

Summary

A large part of the intestinal microbiota is covered by immunoglobulins; however, information on the effect of drug therapies on the interaction between intestinal microbiota and immunoglobulins is limited. Using magnetic bead-based cell sorting and NGS, taxonomic changes in the faecal metagenome during metformin treatment were determined in 40 2TD patients and ten healthy individuals. Changes were assessed at three time points during therapy and three fractions: metagenome, sIgA+, and IgG+. Enrichment of the genus *Escherichia* was observed in both metagenome and fraction data under the influence of metformin. The most significant metformin-related increase in sIgA+, and IgG+ fractions were observed in *Phocaeicola dorei*. The proportion of *Intestinibacter bartletti* also increased similarly but as a short-term effect. Between-group comparisons, the strong immune response induced by bacteria of the genus *Bacteroides* was observed.

The work was carried out in the Latvian Biomedical Research and Study Centre during the period 05.2021. – 05.2023.

Keywords: gut microbiome, secretory immunoglobulin A, immunoglobulin G, metformin, diabetes mellitus.

Saturs

Kopsavilkums	2
Summary	3
IEVADS	6
Darbā izmantotie saīsinājumi	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Cilvēka mikrobioms	9
1.1.1. Mikrobiomu veidi	9
1.1.2. Cilvēka zarnu mikrobioms	11
1.2. Cukura diabēts	11
1.2.1. Cukura diabēta prevalence	11
1.2.2. Otrā tipa cukura diabēts	13
1.2.3. Citi diabēta veidi	14
1.3. Metformīns	15
1.3.1. Metformīna raksturojums	15
1.3.2. Metformīna pleiotropie efekti un molekulārie darbības mehānismi	16
1.3.3. Metformīna ietekme uz zarnu mikrobiomu	17
1.4. Imūnglobulīni	17
1.4.1. Imūnglobulīnu veidi	17
1.4.2. IgA un IgG raksturojums	18
1.4.3. Imūnglobulīnu loma zarnu mikrobiomā	19
2. MATERIĀLI UN METODES	21
2.1. Materiāli	21
2.1.1. Izmantotie laboratorijas piederumi	21
2.1.2. Izmantotie reaģenti	22
2.1.3. Izmantotā aparatūra	23
2.1.4. Izmantotā programmatūra	24
2.2. Metodes	24
2.2.1. Pētījuma dizains	24
2.2.2. slgA koncentrācijas noteikšana	25
2.2.3. Uz magnētiskajām lodītēm balstīta baktēriju šķirošana	25
2.2.4. Bakteriālās DNS izolēšana	27
2.2.5. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana	28
2.2.6. Izdalītās bakteriālās DNS koncentrēšana un centrifugēšanas vakuuma koncentratorā	28
2.2.7. Bakteriālās DNS fragmentēšana	28
2.2.8. Fragmentēšanas galaprodukta attīrīšana	29
2.2.9. Fragmentētās DNS galu labošana	30
2.2.10. Adapteru ligēšana	30
2.2.11. Adapteru ligētās DNS attīrīšana	30
2.2.12. PĶR amplifikācija	31
2.2.13. DNS bibliotēkas kvalitātes noteikšana	31
2.2.14. Vienpavediena DNS cirkularizācija	32

2.2.15. Cirkularizācijas galaprodukta attīrīšana un kvantificēšana	33
2.2.16. Sekvencēšana	33
2.2.17. Datu analīze un statistika	34
3. REZULTĀTI	36
4. DISKUSIJA	47
SECINĀJUMI	55
KONFERENČU TĒZES	56
PATEICĪBAS	57
LITERATŪRAS SARAKSTS	58

IEVADS

Balstoties uz Starptautiskās diabēta federācijas sniegto informāciju, Eiropā gandrīz 8,8% iedzīvotāju ir diagnosticēts cukura diabēts, apmēram 90% gadījumu tam esot tieši 2. tipa cukura diabētam (2TD) (Cho et al. 2018). Pazeminātā mirstības vecuma, paaugstināto komplikāciju un hronisko saslimšanu dēļ, 2TD pacientiem ir nepieciešamas uzlabotas esošās ārstēšanas stratēģijas, gan jaunas pieejas, lai izvairītos no saslimšanas (Piya et al. 2010). Neskatoties uz metformīna mainīgo terapijas efektivitāti, blakus parādībām un kontrindikācijām, tas ir visbiežāk izmantotais antidiabētiskās terapijas līdzeklis (Rojas & Gomes, 2013). Salīdzinot ar citām medikamentozām terapijām, metformīns ir efektīvāks, samazinot insulīna rezistences risku, labāk pasargājot no kardiovaskulārām komplikācijām un samazinot hipoglikēmijas risku (Schlender et al. 2017). Papildus tam, ka tiek samazināta glikozes izdalīšanās aknās un palielinās glikozes uzņemšana muskuļos, ar vien jauni pētījumi liecina par to, ka metformīna darbības vieta ir tieši zarnu mikrobiota (Rodriguez et al. 2018).

Iepriekšējo pētījumu rezultāti liecina, ka metformīna lietošana izmaina zarnu mikrobioma kompozīciju, kā rezultātā palielinās *Akkermansia muciniphila* un citu mucīnu degradējošo un īso ķēžu taukskābju producējošu ģinšu īpatsvars, kā arī oportūnisko patogēno baktēriju, kā *Escherichia spp.* daudzums (de la Cuesta-Zuluaga et al. 2017, Forslund et al. 2015, Wu et al. 2017). Metformīna un zarnu mikrobioma mijiedarbības pamatā esošie mehānismi nav pilnībā izprasti, taču ir skaidrs, ka zarnu mikrobioms ir iesaistīts antidiabētiskajā terapijā un tā modulācija ietekmē metformīna sistēmisko atbildi un, iespējams, arī medikamentozās terapijas efektivitāti (Wu et al. 2017).

Turklāt iepriekš ir tikuši uzsvērti saimniekorganisma mediētie mehānismi zarnu mikrobioma regulācijai un homeostāzes uzturēšanai, tajā skaitā ir minēta sekretorā imūnglobulīna A (sIgA) un imūnglobulīna G (IgG) produkcija (Yang & Palm 2020; Zeng et al. 2016). Ir ticis aprakstīts, ka sIgA var aplāt no 24 līdz pat 74% baktēriju fēcēs (van der Waaij et al. 1996). Tā kā tiek pārklāta tikai daļa no baktērijām, zāļu ietekme uz antivielām pārklāto frakciju dinamiku var sniegt jaunas zināšanas par saimniekorganisma un mikrobioma mijiedarbību. Turklāt pētījumos ir tikusi uzsvērta, sIgA iespējamā ietekme uz metformīna terapijas efektivitāti (Ustinova et al. 2019, Luck et al. 2019).

Darba mērķis: Noteikt metformīna terapijas ietekmi uz zarnu mikrobioma kompozīcijas dinamiku nešķirotās un ar sIgA un IgG pārklātās baktērijās, jaundiagnosticētos 2. tipa cukura diabēta pacientos un veselos indivīdos.

Izvirzītā darba mērķa sasniegšanai tika noteikti šādi **uzdevumi:**

1. Izstrādāt uz sIgA un IgG piesaisti balstītu baktēriju šūnu šķirošanas metodi un veikt atlasīto subpopulāciju sekvencēšanu.

2. Novērtēt un raksturot pētījuma dalībnieku zarnu mikrobioma daudzveidību un taksonomisko kompozīciju nešķīrotā, sIgA+ un IgG+ frakcijās, vairākos laika punktos.
3. Noteikt potenciālas, metformīna terapijas izraisītas, taksonomiskās izmaiņas ar sIgA vai IgG piesaistītās baktērijās.

Darbā izmantotie saīsinājumi

2TD - 2. tipa cukura diabēts	LBMC - Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs
ABCC8 - <i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8</i>	M0 - pirms terapijas sākuma
ADF - adenožīndifosfāts	M3m - pēc trīs mēnešus ilgas metformīna terapijas
AMF - adenožīnmonofosfāts	M7d - pēc nedēļu ilgas metformīna terapijas
AMPK - AMF aktivētā proteīnu kināze	NEUROD1 - neiroģenās diferenciacijas 1 gēns
APPL1 - fosfotirozīns, kas mijiedarbojas ar pH domēnu un leicīna rāvējslēdzi 1	OCT-1 - organisko katjonu transportētājs 1
ATF - adenožīntrifosfāts	PAX4 - pāra boksa 4 gēns
BLK - tirozīna kināzes proteīna gēns	PBS - <i>phosphate buffered saline</i>
bp - bāzu pāri	PDX1 - insulīna promotera faktors 1
BSA - <i>bovine serum albumin</i>	pIgR - polimēra imūnglobulīna receptors
CEL - karboksilestera lipāzes gēns	PŅR - polimerāzes ķēdes reakcija
GCK - glikokināzi kodējošais gēns	ROS - reaktīvās skābekļa molekulas
HbA1c - glikētais hemoglobīns	sIgA - sekretorais imūnglobulīns A
HNF1 α - hepatocītu nukleārais faktors 4 alfa	T2D - Type 2 diabetes mellitus
HNF4 α - hepatocītu nukleārais faktors 4 alfa	
HNF1 β - hepatocītu nukleārais faktors 1 beta	
IBD - iekaisīgo zarnu slimība	
IgA - imūnglobulīns A	
IgE - imūnglobulīns E	
IgG - imūnglobulīns G	
IgM - imūnglobulīns M	
INS - insulīna gēns	
IQR - starpkvartilu diapozons	
<i>J chain</i> - savienjošā peptīdu ķēde	
KCNJ11 - <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11</i>	
KLF11 - <i>Kruppel</i> līdzīgā faktora 11 gēns	
ŅMI - ķermeņa masas indekss	

1. LITERATŪRAS APSKATS

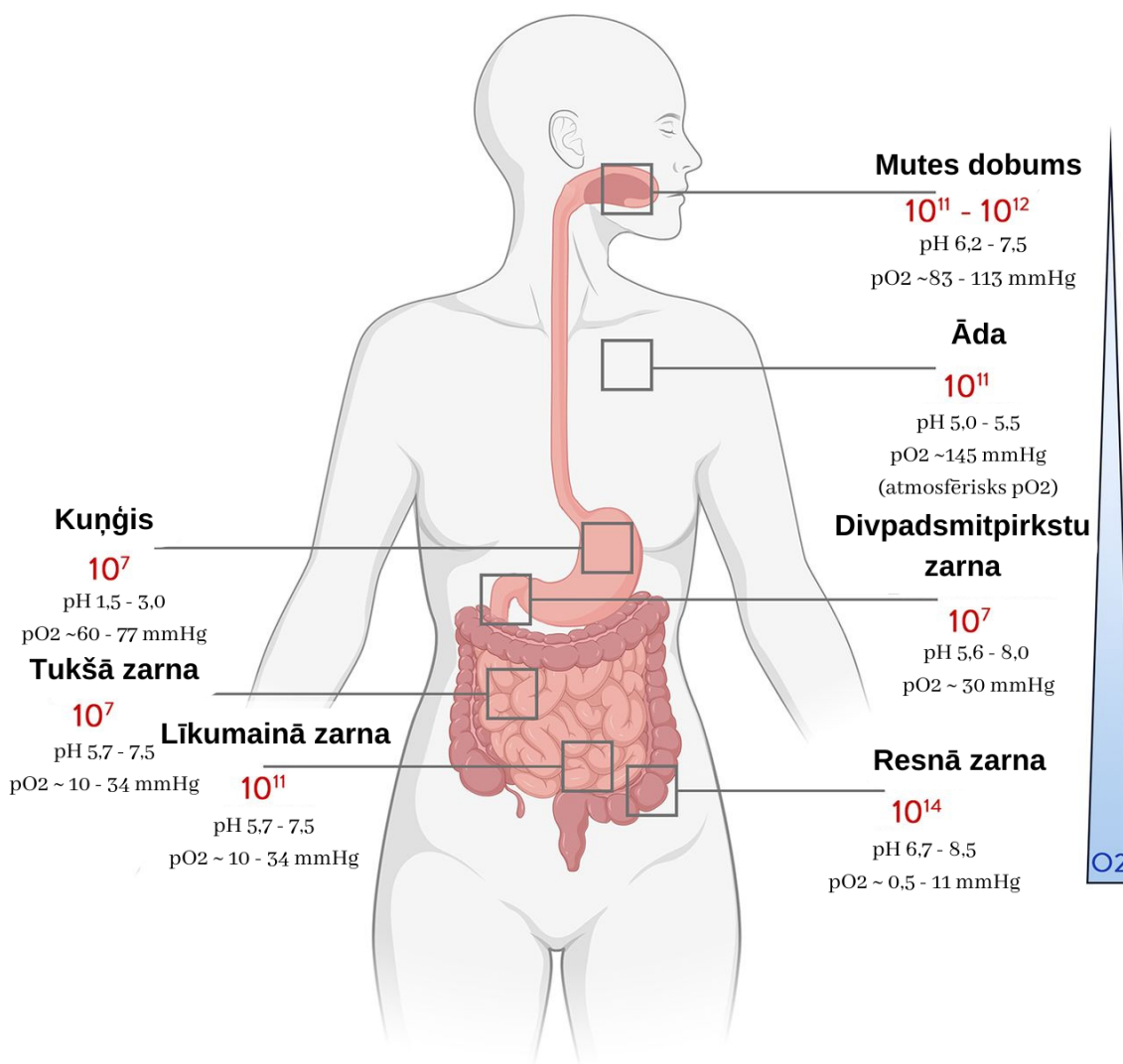
1.1. Cilvēka mikrobioms

1.1.1. Mikrobiomu veidi

Cilvēka organismā un uz tā ir sastopami dažādi mikroorganismu veidi: baktērijas, vīrusi, arheji un eikarioti. Visi šie mikroorganismi ir sastopami konkrētās organisma nišās, tādējādi katram indivīdam veidojot unikālu kopienu, ko sauca par mikrobiotu. Savukārt viss mikrobiotas ģenētiskais materiāls tiek saukts par mikrobiomu, kas bieži tiek lietots kā daļējs sinonīms mikrobiotai, raksturojot gan organismu, gan to gēnu kopumu (Gomaa 2020). Attiecīgi, balstoties pēc anatomiskās lokalizācijas, ir iespējams iedalīt vairākus mikrobiomu un mikrobiotu veidus (Dekaboruah et al. 2020). Piemēram, kuņģa-zarnu traktā vairāk būs sastopamas fakultatīvi anaerobas baktērijas, bet strikti aerobas būs iespējams atrast uz ādas vai elpceļos un deguna dobumā, tādējādi veidojot lokalizācijai specifiskas nišas (Ogunrinola et al. 2020). Sākums mikrobioma pētniecībai ir meklējams 2000. gadu sākumā, kad intensīvi tika pētīta orālā mikrobiota, lai noskaidrotu potenciāli patogēnās un komensālās baktērijas, sastopamas cilvēku mutes dobumā (Paster et al. 2001; Aas et al. 2005). Turklāt šī pētniecība noveda pie cilvēku orālā mikrobioma datubāzes izveides un vēlāk arī pie cilvēka mikrobioma pētniecības projekta aizsākuma (Dewhirst et al. 2010; Turnbaugh et al. 2007). Projekts ir bijis aktīvs jau vairāk nekā 10 gadus, un šajā laikā tika ievākta informācija gan par dažādiem mikrobioma veidiem, kā ādas, orālais, nazālais, zarnu u.c., gan par nosacījumiem, kas tos var izmainīt: priekšlaicīga dzimšana, pirms diabēta stāvoklis vai iekaisīgo zarnu slimība (Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium 2019). Mikrobioma kompozīcijas izmaiņas var radīt gan jau esošas pamatslimības, gan dzīvesveids, turklāt tām ir liela nozīme gan cilvēku veselībā, gan slimību patogēnēzē, jo izjaukts mikroorganismu līdzsvars jeb disbioze palielina saimniekorganisma uzņēmību, piemēram, pret dažādām infekciju slimībām (Ogunrinola et al. 2020).

Šobrīd dažādas cilvēka mikrobioma nišas tiek plaši pētītas un tām tiek piedēvēti dažādi jauni apzīmējumi, piemēram, mikrobioms tiek saukts arī par jaunu “orgānu”, bioloģisku indivīdu kopumu vai ekosistēmu cilvēka organismā (Reynoso-Garcia et al. 2022). Tomēr ar mikrobiomu saistīti pētījumi vēl ilgi būs aktuāli, jo tiek lēsts, ka vidēja cilvēka organismā ir apmēram 10^{13} - 10^{14} baktēriju šūnas, kas ir gandrīz tik pat, cik cilvēka šūnas (Sender et al. 2016). Turklāt daudzveidīgs un komplekss mikrobioms var sastāvēt pat no 50

līdz 100 reizu vairāk gēniem nekā cilvēka genoms, šo padarot par plašu un interesantu pētījuma lauku (Kho & Lal 2018). Kā redzams 1. attēlā, baktēriju daudzums atkarībā pēc anatomiskās lokalizācijas būtiski atšķiras un to var ietekmēt vairāki faktori, piemēram, vides pH un pieejamais skābekļa daudzums (de Vos et al. 2022). Tomēr ir redzams, ka resnajā zarnā ir sastopamas visvairāk baktērijas, tāpēc ļoti plaši tiek pētīta zarnu mikrobioma subpopulācija (Leviatan et al. 2022).



1. attēls. Baktēriju kopējais daudzums dažādās organisma vietās. Baktēriju skaits iegūts balstoties uz to koncentrāciju konkrētā tilpumā, norādīts vides pH un parciālais skābekļa spiediens. (pēc de Vos et al. 2022)

Figure 1. The total amount of bacteria in different parts of the body. The number of bacteria is obtained based on their concentration in a specific volume, and the pH and partial oxygen pressure of the environment are indicated (de Vos et al. 2022).

1.1.2. Cilvēka zarnu mikrobioms

Ir zināms, ka cilvēku zarnu mikrobioma populācija sāk veidoties jau dzemdību laikā, saskaroties ar pirmajiem mikroorganismiem, tomēr pastāv diskusijas, ka auglis ar pirmajiem mikroorganismiem varētu nonākt saskarē placentā vai amnija šķidrumā (Aagaard et al. 2014; Collado et al. 2016). Protams, sākotnējo mikrobiotas attīstību ietekmē dažādi faktori, daži no tiem: dzemdību veids, dzimums, uzturs, antibiotiku lietošana, mājdzīvnieku klātbūtne u.c (Durack & Lynch 2019). Būtiskākā zarnu mikrobioma attīstība notiek ļoti agri bērnībā, līdz divu, trīs gadu vecumam (Wernroth et al. 2022). Līdz piecu gadu vecumam, zarnu mikrobioma kompozīcija jau ir līdzīgāka pieaugušiem cilvēkiem, tomēr vēl nav kļuvusi tik komplicēta (Roswall et al. 2021).

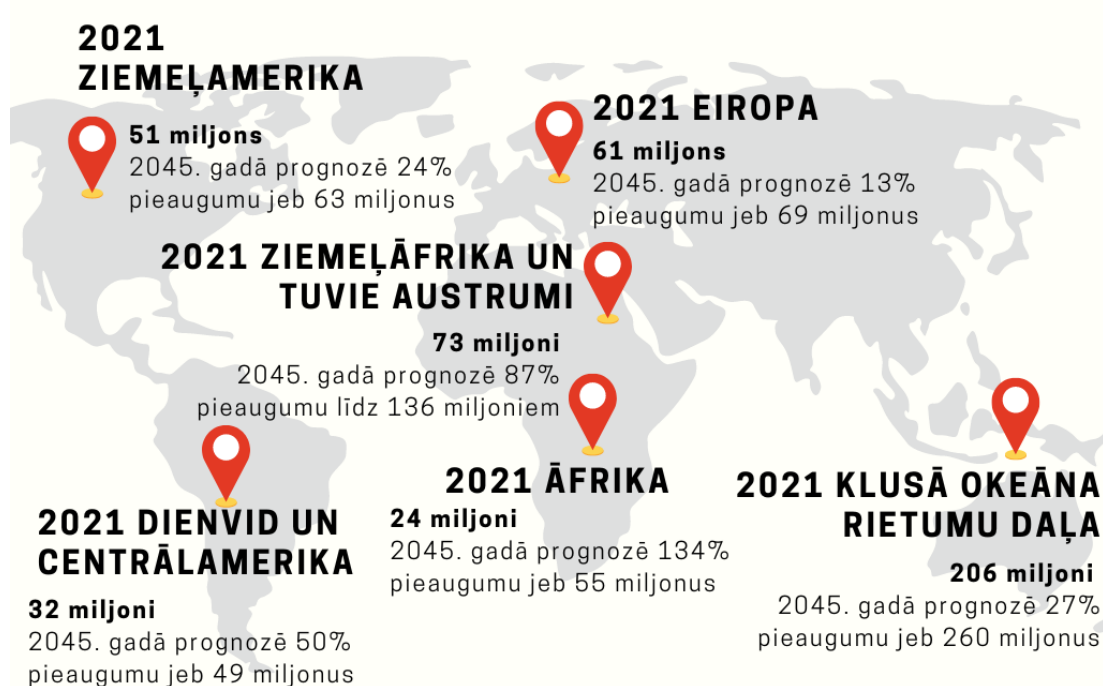
Bērnībā iegūtā personīgā un veselīgā mikroorganismu kompozīcija kļūst relatīvi stabila turpmāko dzīvi, tomēr katram indivīdam tā ir unikāla, tādēļ nav zināma optimāla taksonomiskā kompozīcija, kas derētu visiem (Rinninella et al. 2019). Neskatoties uz mainību indivīdu starpā, 90% no zarnu mikrobiotas veido *Firmicutes* un *Bacteroidetes* tipa baktērijas (King et al. 2019; Arumugam et al. 2011; Magne et al. 2020). *Firmicutes* tipu pārstāv vairāk nekā 200 dažādu ģinšu baktēriju, piemēram *Lactobacillus*, *Enterococcus*, tomēr 95% gadījumu tās ir *Clostridium* ģints baktērijas. Savukārt *Bacteroidetes* tipā predominē *Bacteroides* un *Prevotella* ģinšu baktērijas (Arumugam et al. 2011). Turklāt *Firmicutes/Bacteroidetes* attiecība zarnu traktā tiek minēta kā potenciāls biomarķieris, jo indivīdiem ar aptaukošanos ir konstatēta samazināta *Bacteroidetes* un palielināta *Firmicutes* ģinšu īpatsvars kā indivīdiem bez liekā svara (Magne et al. 2020). Tādēļ svarīgs ir saimniekorganismā esošo baktēriju veselīgs balanss, lai metaboliskie un imūnie procesi norisinātos optimāli (Rinninella et al. 2019). Plašo pētījumu laikā ir noskaidrots, ka zarnu mikrobioms modulē cilvēka veselību un dažādas hroniskas saslimšanas, sākot ar gastrointestinālā trakta funkcionāliem traucējumiem, beidzot ar kolorektālo vēzi (Hills et al. 2019).

1.2. Cukura diabēts

1.2.1. Cukura diabēta prevalence

Cukura diabēts ir metaboliska saslimšana, kuru raksturo insulīna sekrēcijas vai darbības defekti, kas rezultējas ar hronisku hiperglikēmiju (Kharroubi & Darwish 2015). Mūsdienās cukura diabēts ir radījis nozīmīgu slogu uz valsts ekonomiku un sabiedrības veselību, jo tā izplatība pēdējās desmitgadēs kļūst aizvien lielāka (Tomic et al. 2022). Piemēram, Latvijā cukura diabēta incidences skaits no 2010. gada līdz 2021. gadam ir

palielinājies no 3458 līdz 5072 pacientiem uz 100 000 iedzīvotāju (Veselības statistikas datubāze 2023). Pasaulē kopš 1980. gada līdz 2014. gadam, diagnosticēto gadījumu skaits ir audzis no 108 līdz 422 miljoniem. Un kā var redzēt 2. attēlā, tiek paredzēts, ka diabēta prevalence turpinās pieaugt (World Health Organization 2023; International Diabetes Federation 2022). Vismazākais diagnosticēto gadījumu skaita pieaugums ir paredzēts Eiropā, līdz 2045. gadam pieaugot par 13%, jeb no 61 miljona līdz 69 miljoniem pacientu. Tomēr būtisks 134% pieaugums tiek prognozēts Āfrikā, no 24 miljoniem pacientu 2021. gadā, līdz 55 miljoniem 2045. gadā (International Diabetes Federation 2022).



2. attēls. Cukura diabēta prevalence. Attēlā ir norādīts diagnosticēto gadījumu skaits 2021. gadā un prognozētā incidence 2045. gadā (pēc International Diabetes Federation 2022).

Figure 2. Prevalence of diabetes mellitus. The figure shows the number of diagnosed cases in 2021 and the predicted incidence in 2045 (International Diabetes Federation 2022).

Diagnosticēšanas tehnoloģijām attīstoties, cukura diabētu ir iespējams iedalīt aizvien sīkākās un precīzākās kategorijās, tomēr galvenokārt tiek minēti četri cukura diabēta veidi: 1. tipa cukura diabēts (izraisa beta šūnu destrukcija un gandrīz vienmēr tiek raksturots ar insulīna deficītu), 2. tipa cukura diabēts (raksturo progresējoši insulīna sekrēcijas defekti un insulīna rezistence), gestācijas diabēts (diabēts diagnosticēts otrajā vai trešajās grūtniecības trimestrī) un MODY (viena gēna nukleotīdu nomaiņas rezultātā radies diabēts) (Sakran et al. 2022; Banday et al. 2020). Visizplatītākais ir 2TD, kurš pārstāv 90 - 95% no visiem cukura diabēta gadījumiem, tam sekojošais 1. tipa cukura diabēts, pārstāvot 5 - 10% (Banday et al. 2020).

1.2.2. Otrā tipa cukura diabēts

Otrā tipa cukura diabēts ir hroniska, metaboliska saslimšana, kuras izplatība turpina pieaugt dažās valstīs sasniedzot epidēmijas mērogu. Tiek paredzēts arī turpmāks saslimstības pieaugums, novecojošās sabiedrības dēļ (Olokoba et al. 2012). Šī saslimšana tiek raksturota ar hroniski paaugstinātu glikozes līmeni asinīs, un atšķirībā no 1. tipa cukura diabēta, arī paaugstinātu insulīna līmeni asinīs. Tā rezultātā ir radies termins insulīna rezistence, kas izskaidro, kādēļ glikozes līmenis ir paaugstināts, pat ja nepastāv insulīna nepietiekamība (Westman 2021). Glikozes līmenis tiek uzskatīts par paaugstinātu, ja glikētā hemoglobīna līmenis asinīs ir vairāk par 6,5% (Genuth et al. 2018).

Galvenais eksogēnais faktors, kas paceļ glikozes līmeni asinīs ir ogļhidrāti, apēdot par daudz ogļhidrātus, organisms nav spējīgs vienlaicīgi pārstrādāt un absorbēt glikozi un tajā pašā laikā uzturēt stabilu līmeni asinīs (Westman 2021). Kā galveno endogēno faktoru var minēt hormonus, piemēram, glikagons, epinefrīns un kortizols spēj paaugstināt glikozes līmeni asinīs, paaugstinot glikogenolīzi un glikoneoģenēzi. Tādējādi organisms ir spējīgs uzturēt pietiekošu glikozes līmeni asinīs arī bez ogļhidrātu uzņemšanas (Petersen et al. 2017). 2TD ir multifaktoriāla slimība un tās primārais izraisītājs ir dzīvesveids, piemēram, maz fizisko aktivitāšu, liels alkohola patēriņš, smēķēšana un secīgi kā riska faktors tiek minēta ģenētika (Ripsin et al. 2009; Hu et al. 2001). Līdz šim, 421 gēnā ir noteikti 1874 ģenētiski riska marķieri (Syed et al. 2020). No tiem, piemēram, viena nukleotīda nomaina gēnā *FTO* (tauku masas un aptaukošanās asociēts) rs9939609 ir asociēta ar palielinātu svaru (Prakash et al. 2016). Būtiski palielināts 2TD risks ir asociēts ar viena nukleotīda polimorfismu rs12255372 gēnā *TCF7L2* (transkripcijas faktors 7-2) (Wang et al. 2013).

Otrā tipa cukura diabēts tiek raksturots ar aizkuņģa dziedzera beta šūnu disfunkciju, palielinātu alfa šūnu funkciju, kā arī perifēro audu insulīna rezistenci (Reed et al. 2021). Šīs izmaiņas noved pie hiperglikēmijas glikozes uzņemšanas traucējumu dēļ perifērajos audos, dislipidēmijas (hipertrigliceridēmija un maz augsta blīvuma holesterīns), ko izraisa traucēta tauku uzņemšana (D'Alessio 2011). Papildus tam tiek traucēta aminoskābju uzņemšana un ATF producēšana perifērajos audos, jo tiek traucēta uzturvielu uzņemšana, kā arī tiek palielināta glikagona producēšana, kas vēl vairāk palielina hiperglikēmiju un hiperlipidēmiju (Okon et al. 2007; Lin & Sun 2010). Lai gan cukura diabētam ir pieejami dažādi ārstēšanas veidi, 2TD joprojām ir galvenais akluma un nieru slimību ierosinātājs, sirds un asinsvadu slimību cēlonis, kā arī iemesls apakšējo ekstremitāšu amputācijai (Reed et al. 2021).

1.2.3. Citi diabēta veidi

Pirmā tipa cukura diabēts tiek raksturots kā hroniska un autoimūna, poliģenētiska saslimšana, kurai raksturīga insulīna nepietiekamība, kas rezultējas hiperglikēmijā (DiMeglio et al. 2018). Neskatoties uz jau zināmo ģenētisko risku, lielai daļai pacientu, nav radnieku ar šo slimību un pat nav augstākais aprēķinātais risks, salīdzinot riska alēļu kombinācijas, kas padara šīs slimības prevenciju un savlaicīgu atpazīšanu apgrūtināšu (Barnett 2018). Klasiski tiek raksturots, ka 1. tipa cukura diabēta attīstība notiek bērnībā, tomēr slimība var sākties jebkurā vecumā, pat 50% pārsniedzot pilngadības robežu (Thomas et al. 2018). C peptīda koncentrācija asinīs, bieži kalpo kā aizkuņģa dziedzera beta šūnu funkciju marķieri, koncentrācijai esot zema, tiek liecināts par smagu endogēnu insulīna deficītu, jo C peptīds tiek producēts ekvimolārā daudzumā kā endogēnais insulīns (Leighton et al. 2017; Jones & Hattersley 2013). Koncentrācija, kas ir zemāka par 0,2 nmol C peptīda litrā, ir asociēta ar 1. tipa cukura diabēta diagnozi (Leighton et al. 2017). Globāli saslimšana arī ar šo diabēta veidu pieaug, kopējai incidencei palielinoties par 2 līdz 3% gadā (Maahs et al. 2010). Protams, kā galvenais terapijas pamats paliek insulīns, tomēr ir pieejami arvien jauni analogi, ar atšķirīgu iedarbības ātrumu un ilgumu. Optimālai glikēmijas kontrolei, ir nepieciešams ievadīt vairākas devas ar insulīnu, kas atdarina tā fizioloģisko izdalīšanos gan pēc ēdienreizēm, gan uz nakti kā bazālo insulīnu (Peters et al. 2016).

Vēl kā pietiekami plaši izplatītu diabēta veidu var minēt gestācijas diabētu. Hiperglikēmija, kas attīstās grūtniecības laikā, bet izzūd pēc bērna piedzimšanas, tiek atzīta jau 50 gadus, tomēr vēl joprojām nav vienprātības par hiperglikēmijas līmeni pēc kura tiek uzstādīta šī diagnoze (McIntyre et al. 2019). Neraugoties uz to, gestācijas diabēts ir visizplatītākā medicīniskā komplikācija grūtniecības laikā (McIntyre et al. 2020). Tiek lēsts, ka gestācijas diabēts ietekmē aptuveni 15% no visām grūtniecībām, kas ir ekvivalents aptuveni 18 miljoniem dzemdību visā pasaulē (Modzelewski et al. 2022). Mātēm ar šo diabētu pastāv gestācijas hipertensijas un preeklampsijas (paaugstināta asinsspiediena) risks, pastāv palielināta spontānā aborta iespējamība, kā arī var rasties makrosomija (pārmērīgs jaundzimušā svars), turklāt tas palielina 2TD iestāšanās risku vēlāk dzīvē gan mātei, gan jaundzimušajam (Modzelewski et al. 2022; Kc et al. 2015).

Retāk izplatīts cukura diabēts ir MODY (no angļu val. *Maturity onset diabetes of the young*) - insulīna neatkarīgs jeb 2TD bērnu un jauniešu vecumā. MODY ir monogēna saslimšana, kurai ir raksturīga autosomāli dominanta iedzimšana un slimība progresē līdz 25 gadu vecumam (Urakami 2019). Jaunākie diagnosticēšanas kritēriji, kas raksturoti 2008. gadā, nosaka: slimības iestāšanās līdz 25 gadu vecumam vismaz vienam ģimenes loceklim, cukura diabēta diagnoze vismaz divās secīgās paaudzēs, beta šūnu autoantivielu neesamība, insulīna

sekrēcijas saglabāšanās un C peptīda līmeni serumā augstāku par 200 pmol uz litru, pat pēc trīs gadus ilgas insulīna terapijas (Ellard et al. 2008). Turklāt MODY ir reta saslimšana, sastopama vienā līdz piecos procentos no visiem diabēta gadījumiem, tādēļ šo cukura diabēta formu nav tik viegli atšķirt no pārējām (Hattersley et al. 2018). Līdz šim ir tikuši identificēti 14 gēni, kuros izmainīti alēliskie varianti var izraisīt MODY diabēta attīstību. Gēni, kuri iepriekš ir raksturoti kā šī diabēta tipu izraisoši ir: HNF4 α (hepatocītu nukleārais faktors 4 alfa), GCK (glikokināzi kodējošais gēns), HNF1 α (hepatocītu nukleārais faktors 4 alfa); PDX1 (insulīna promotera faktors 1); HNF1 β (hepatocītu nukleārais faktors 1 beta); NEUROD1 (neirogēnās diferenciacijas 1 gēns); KLF11 (*Kruppel* līdzīgā faktora 11 gēns); CEL (karboksilestera lipāzes gēns); PAX4 (pāra boksa 4 gēns); INS (insulīna gēns); BLK (tirozīna kināzes proteīna gēns); ABCC8 (*ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8*); KCNJ11 (*Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11*); APPL1 (fosfotirozīns, kas mijiedarbojas ar pH domēnu un leicīna rāvējslēdzī 1) (Yahaya & Ufuoma 2020; Urakami 2019).

1.3. Metformīns

1.3.1. Metformīna raksturojums

Metformīns ir visplašāk pielietotais antidiabētiskās terapijas līdzeklis 2TD ārstēšanā (Wang et al. 2017). Tas ir sintētisks biguanīds ar anti-hiperglikēmisku iedarbību (Mohammed et al. 2021). Pirmo reizi preperāts tika sintezēts 1922. gadā, balstoties uz nostāstiem tautas medicīnā (Bailey & Day 2004). Sākotnēji metformīnu 1958. gadā apstiprināja Apvienotajā Karalistē un Francijā, tikai 1995. gadā tas tika apstiprināts ASV, tomēr šobrīd ikdienā to lieto vairāk kā 150 miljoni indivīdu (He & Wondisford 2015; Scarpello & Howlett 2008). Pēc uzņemšanas, metformīns netiek metabolizēts, bet tiek izvadīts ar urīnu nemainītā veidā, ar pussadalīšanās periodu 5 h, populācijā vidēji nierēs spēj attīrīt 510 ml plazmas minūtē (Gong et al. 2012). Kopumā metformīna terapijas efektivitāte tiek uztverta kā pietiekama, tomēr procentuāli tā ļoti svārstās starp populācijām. Piemēram, metformīna efektivitāte ir vērtēta pacientos ar pirmsdiabēta stāvokli un tika noteikts, ka šo personu relatīvais risks saslimt ar 2TD samazinājās par 26,4% Indijā, Ķīnas populācijā tika novērots 77% samazinājums, bet ASV novēroja tikai 18% samazinājumu, uzsverot nozīmīgi atšķirīgos efektivitātes rādītājus starp populācijām (Ramachandran et al. 2006; Yang et al. 2001; Diabetes Prevention Program Research Group et al. 2009). Neskatoties uz mainīgo terapijas efektivitāti, metformīns tiek lietots ļoti plaši (Rojas & Gomes 2013). Tomēr nereti tiek novērotas dažādas zāļu lietošanas blaknes, visbiežāk tām esot kuņģa un zarnu trakta traucējumiem pat 20 - 30% gadījumu,

ieskaitot vemšanu un sliktu dūšu (Diabetes Prevention Program Research Group 2012). Daudz retāka (viens gadījums uz 30000), bet nopietnāka blakne ir laktacidoze, kas tiek ierosināta metformīna uzkrāšanās dēļ un parasti tiek novērota diabēta pacientos ar aknu un nieru mazspēju. Papildus novērotās blaknes: pankreatīts, hepatīts, B12 vitamīna deficīts (Wang et al. 2017; Shurrab & Arafa 2020).

1.3.2. Metformīna pleiotropie efekti un molekulārie darbības mehānismi

Neskatoties uz metformīna plašo izmantošanu, seno vēsturi un pārlicinošiem pierādījumiem par glikozi samazinošu efektu, tā darbības mehānismi vēl aizvien nav pilnībā noskaidrots, par spīti plašajam pētījumu spektram, kur šis medikaments ir iesaistīts (Prattichizzo et al. 2018). Tomēr ir atklātas neskaitāmas sekundārās mērķmolekulas, uz kurām metformīns iedarbojas. Apskatot retrospektīvo un novērojumu pētījumu rezultātus, var secināt par vairākām labvēlīgām un protektīvām metformīna darbības īpašībām. Piemēram, ir ziņots par kardiovaskulāro slimību incidences samazināšanos, kā arī dažādu vēža formu sastopamības samazinājumu salīdzinot metformīna lietotājus un nelietotājus (Campbell et al. 2017). Pie citiem metformīna pleiotropiem efektiem var minēt dzīvildzes palielināšanos, antioksidatīvu iedarbību un neiroprotektīvu efektu, kā arī vērts pieminēt, ka tiek uzlabots veselības stāvoklis policistisko olnīcu sindroma pacientēm (Janić et al. 2017; Rojas & Gomes 2013; Wang et al. 2017).

Uzņemot metformīnu orāli, 70% no devas uzsūcas organismā taisnajā zarnā, turklāt ir noskaidrots, ka pēc tam paaugstināta metformīna koncentrācija ir novērojama zarnās, aknās, nierēs un urīnpūslī, parādot tā izvadīšanas ceļu. Muskuļos tika novērota neliela medikamenta akumulēšanās (Gormsen et al. 2016). Cilvēku pētījumos pārsvarā kā metformīna mērķorgāni tiek minētas zarnas, aknas un nieres. Tradicionāli ir ticis domāts, ka metformīna mērķorgāns ir aknas, tādējādi uzlabojot glikozes līmeni asinīs, turklāt ir vairāki pētījumi kas to atbalsta (Wang et al. 2002; Shu et al. 2007). Tiek uzskatīts, ka metformīna uzņemšanu hepatocītos katalizē organisko katjonu transportētājs 1 (OCT-1), pēc uzņemšanas metformīns inhibē elpošanas ķēdes kompleksu 1, novēršot mitohondriju adenozīntrifosfāts (ATF) veidošanos. Tādējādi tiek palielināta citoplazmas ADF (adenozīndifosfāts):ATF un AMF (adenozīnmonofosfāts):ATF attiecība. Šo izmaiņu rezultātā tiek aktivēta AMF aktivētā proteīnu kināze (AMPK) (Rena et al. 2017; Wang et al. 2002; Owen et al. 2000). AMPK darbojas, lai atjaunotu enerģijas homeostāzi, ieslēdzot kataboliskos ceļus, kuri rada ATF un izslēdzot šūnu procesus, kuri patērē ATF, kā rezultātā notiek mTORC1 (rapamicīna kompleksa 1) inhibīcija un mitohondriālā reaktīvā skābekļa molekulu (ROS) produkcija (Howell et al. 2017; Ross et al. 2016). AMPK aktivācijas rezultātā notiek īso ķēžu taukskābju

sintēzes un glikoneoģenēzes supresija aknās, bet palielinātas glikozes uzņemšana skeleta muskuļos (Kaneto et al. 2021).

1.3.3. Metformīna ietekme uz zarnu mikrobiomu

Kādu laiku ir zināms, ka zarnas arī varētu būt metformīna darbības mērķorgāns, bet parādās aiz vien jauni pētījumi, kuri uzsver tieši zarnu mikrobiotas nozīmi metformīna darbībā un to, cik būtiski tā tiek ietekmēta tā rezultātā (Silamiķele et al. 2021; Forslund et al. 2015). Sākotnēji liela uzmanība tika pievērsta zarnu mikrobiotas atšķirībām starp 2TD pacientiem un veseliem indivīdiem, bet pēdējos gados ir parādījušies aizvien vairāk pētījumu, novērtējot metformīna ietekmi uz zarnu mikrobiomu (Zhang & Hu 2020). Metformīna ietekmē ir novērota mucīnu degradējošās baktērijas *Akkermansia muciniphila* relatīvā īpatsvara pieaugums, turklāt ir ticis novērots arī citu īso ķēžu taukskābju producējošo taksonu īpatsvara palielināšanās, piemēram, *Butyrivibrio* un *Bifidobacterium bifidum* (de la Cuesta-Zuluaga et al. 2017; Zhang & Hu 2020). Tomēr jāmin arī oportūnistisko patogēnu *Escherichia spp.* īpatsvara pieaugums metformīna lietošanas ietekmē, kas ir novērots vairākos pētījumos (Forslund et al. 2015; Wu et al. 2017). Citos pētījumos ir minēts, ka tiek izmainīts arī *Romboutsia*, *Intestinibacter* un *Clostridium* baktēriju īpatsvars. Kaut gan mehānismi šo mijiedarbību pamatā vēl joprojām paliek neskaidri, ir zināms, ka mikrobioms ir svarīgs pretdiabētiskās terapijas veicinātājs un tā mainība ietekmē ķermeņa sistēmisko atbildes reakciju uz metformīnu (Lee et al. 2021). Turklāt pētījumā, kas balstīts uz nākamās paaudzes paralēlo sekvenču analīzi, transkriptoma analīze atklāja metformīna izraisītu atšķirīgu gēnu ekspresiju, kas iesaistīti zarnu IgA ražošanā (Ustinova et al. 2019).

1.4. Imūnglobulīni

1.4.1. Imūnglobulīnu veidi

Imūnglobulīni ir heterodimēri proteīni, antivielas, kur sastāv no divām smagajām (H) un divām vieglajām ķēdēm (L), kuras ir saistītas ar kovalentām disulfīdu saitēm (Schroeder & Cavacini 2010; Rabbitts 2023). Mainīgie domēni (V) saistās ar antigēniem, bet konstantie (C) nosaka efektora funkcijas (Schroeder & Cavacini 2010). Seruma imūnglobulīni ir daļa no adaptīvās imūnsistēmas un sastāv no piecām klasēm: IgA, IgM, IgG, IgE un IgD (Khan et al. 2021). Šīs antivielas var tikt ekspresētas kā šūnu virsmas antigēnu receptori, gan kā šķīstošas molekulas (Gutzeit et al. 2018). IgM ir pirmais imūnglobulīns, kurš tiek ekspresēts B šūnu attīstības laikā. Šīs molekula tiek saistīta ar organisma primāro imūno atbildi uz dažādiem akūtiem patogēniem vai imūnogēniem (Boes 2000). Tika uzskatīts, ka IgD ir salīdzinoši nesen

izveidojusies antiViela un tās nozīme nebija skaidra, tomēr tā tika identificēta 500 miljonus gadu senās skrimšļu zivju atliekās, kad adaptīvā imūnsistēma veidojās, un tas liek domāt, ka IgD, tāpat kā IgM ir bijusi nozīmīga loma saimniekorganisma izdzīvošanā, ja šī antiViela evolūcijas gaitā ir saglabājusies (Gutzeit et al. 2018; Ohta & Flajnik 2006). IgE serumā ir sastopams viszemākajā koncentrācijā, un tam ir visīsākais pussabrukšanas periods, tomēr kā imūnglobulīns tas tiek raksturots kā ļoti spēcīgs, saistīts ar paaugstinātu jutību uz alergiskām reakcijām kā arī parazītu un tārpu infekcijām (Schroeder & Cavacini 2010). Tomēr procentuāli serumā visplašāk pārstāvētie ir imūnglobulīni A un G, sastādot 15% un 75% respektīvi (Schroeder & Cavacini 2010).

1.4.2. IgA un IgG raksturojums

Cilvēkos visplašāk pārstāvētais ir imūnglobulīns G, sastādot 10 - 20% no plazmas proteīniem, kas tālāk var tikt sadalīti četrās konservatīvās apakšklasēs. Aminoskābju līmenī 90% no tiem ir identiski, tomēr katra klase unikāli saista antigēnus, veido imūnkompleksus, aktivē efektoršūnas, tām ir dažādi pussabrukšanas periodi, kā arī dažāda spēja šķērsot placentu, lai aizsargātu jaundzimušo pirmajos dzīves mēnešos (Vidarsson et al. 2014). IgG1 apakšklases īpatsvara pieaugums parasti ir novērojams kā atbildes reakcija uz šķīstošiem olbaltumvielu antigēniem un membrānas proteīniem. Šī parasti ir visizplatītākā apakšklase, tādēļ IgG1 trūkums var rezultēties kopējā IgG līmeņa samazinājumā un ierosināt hipogammaglobulinēmiju (Jefferis & Kumararatne 1990). IgG2 antiVielas tiek saistītas ar saimniekorganisma atbildes reakciju uz baktēriju kapsulu polisaharīdu antigēniem, tāpat IgG2 deficīts tiek saistīts ar paaugstinātu jutību uz baktēriju infekcijām (Vidarsson et al. 2014; Schauer et al. 2003). IgG3 antiVielas tiek saistītas ar efektoru reakciju uz svešiem antigēniem. Šī imūnglobulīnu apakšklase tiek paaugstināta arī parazītu, vīrusu un intracelulāru baktēriju infekcijas rezultātā (Damelang et al. 2019). Savukārt IgG4 apakšklases antiVielas veidojas, ja ilgstoši un atkārtoti notiek pakļaušana antigēnam, piemēram, imūnterpija. Tomēr IgG4 paaugstināšanās tiek novērota arī vairāku autoimūnu saslimšanu gadījumā: astma, pankreatīts vai daži alergiju veidi (Qin et al. 2022).

Imūnglobulīns A ir visizplatītākais sekretētais imūnglobulīnu izotips, kuram ir liela nozīme zarnu gļotādas homeostāzes un citu fizioloģisku procesu uzturēšanā (Hand & Reboldi 2021). IgA veido divas formas, viena no tām ir monomērs jeb seruma IgA, kas galvenokārt ir sastopams serumā. Otra forma ir sekretorais IgA (sIgA), kas sastopams dažādās gļotādās, piemēram, siekalās, fēcēs u.c. Tas no seruma IgA atšķiras ar savu dimēro formu - to veido divi monomēri IgA, kas savienoti kopā ar savienjošo peptīdu ķēdi (*J chain*) un sekretoro komponentu, kas ir polimēra imūnglobulīna receptors (pIgR), kas atlicis pēc transcitozes

(Yang et al. 2022). sIgA pilda aizsardzības funkciju zarnu traktā pret patogēniem un citiem vides riskiem (Isho et al. 2021). Tas notiek agregējot baktērijas, kurām tiek samazināta motilitāte un tādējādi samazinās invāzija saimniekorganisma zarnu epitēlija šūnās (Moor et al. 2017). Turklāt ir novērota selektīva, ar slimībām saistīta, baktēriju pārklāšana pacientu fēcēs (Viladomiu et al. 2017).

1.4.3. Imūnglobulīnu loma zarnu mikrobiomā

Zarnās ir lielākā plazmas šūnu un aktivētu B šūnu populācijas, kas producē antivielas, turklāt šīs antivielas tiek transportētas zarnu lūmenā. Zarnās tiek producētas trīs veidu antivielas, kuras ir spējīgas saistīt dažādas baktērijas, tās ir IgA, IgG un IgM (Leon & Francino 2022). IgG zarnās tiek ražots mazāk kā pārējās antivielas, turklāt tas notiek neregulāri. Līdz šim ir pierādīts, ka IgG ražošana galvenokārt aktivējas dažādu patogēnu antigēnu klātbūtnē, kuri ir spējīgi šķērsot zarnu barjeru, piemēram, *Haemophilus* ģints baktērija (Janzon et al. 2019). No otras puses, IgA un IgM pārklāj līdzīgas, zarnu gļotādā mītošas, baktērijas, tomēr IgM ir 100 reizes zemākā koncentrācijās salīdzinot ar IgA (Janzon et al. 2019). Šo iemeslu dēļ, gan IgG, gan IgM ir maz pētīts saistībā ar zarnu mikrobiomu (Leon & Francino 2022).

Kā jau iepriekš tika minēts, IgA monomērā formā atrodas asinsrites sistēmā, bet tikai dimēras un citas nelielas polimēras formas ir sastopamas gļotādas sekrētā, piemēram, pirmpienā vai zarnu gļotādā (Yel 2010). Tikai polimērās IgA formas var tikt aktīvi transportētas uz zarnu gļotādas virsmu. Plazmas šūnu producētās polimērās IgA saista pIgR, ko ekspresē epitēlija šūnas, tādējādi izveidojot sIgA (Pabst & Slack 2020). Interesanti, ka pieauguša cilvēka organismā tiek saražoti aptuveni 3 g sIgA dienā, kas ir vairāk kā visi pārējie imūnglobulīnu izotipi kopā (Kaetzel et al. 2017). Jāpiemin arī tas, ka *germ free* pelēs, sIgA produkcija notiek ļoti zemā līmenī, turpretim kolonizējot gremošanas traktu, ātri seko sIgA līmeņa paaugstināšanās līdz normālam līmenim, kas liecina par to, ka mikrobiota daļēji regulē sIgA produkciju zarnu trakta gļotādā (Kaetzel 2014).

Sekretorais imūnglobulīns A var saistīt baktērijas kanoniskā un nekanoniskā veidā. Kanoniskā baktēriju saistīšana iekļauj Fab reģiona atkarīgu saistīšanos, izmantojot komplementārus reģionus, taču nekanoniskā saistīšanās notiek ar glikānu starpniecību, kas saistīti ar sIgA aminoskābēm (Pabst & Slack 2020). Zināms, ka antiViela ir izteikti glikozilētas, ar dažāda veida glikānu molekulām, dažādos antiVielu reģionos. Turklāt, esošie glikānu veidi atšķiras starp indivīdiem, balstoties uz vairākiem faktoriem, piemēram, iekaisuma statusa vai sIgA ražošanas ātruma (Leon & Francino 2022). Agrīnos pētījumos ir ticis parādīts, ka kolonizējot aksēnisku peļu zarnu traktus ar specifiskiem celmiem, noveda pie

dažādām atbildes reakcijām. Piemēram, celmi kas piederēja pie gram pozitīvām baktērijām, izraisīja vāju sIgA atbildes reakciju, bet gram negatīvas baktērijas izraisīja daudz spēcīgāku atbildes reakciju, neatkarīgi no tā vai baktērijas vēl bija dzīvas vai nē (Leon & Francino 2022 pēc Crabbe et al. 1968, Moreau et al. 1978). Līdz šim ir veikti vairāki pētījumi, lai noskaidrotu imūnglobulīnu mērķus, šķirojot baktērijas, kas ir vai nav pārklātas ar konkrēto imūnglobulīnu. Tomēr šie pētījumi ir parādījuši to, ka sIgA saistās ar daudzveidīgu mikrobiotas daļu (Magri et al. 2017; Planer et al. 2016; Kau et al. 2015). Turklāt pētījumos nav novērota konsekvence tam, kādas baktērija biežāk tiek bagātinātas, tomēr bieži konstatēta *Firmicutes* dzimtai piederošās *Lachnospiraceae* ģints baktērijas bagātināšanās (Sterlin et al. 2020). Konsekventu rezultātu trūkums tiek skaidrots ar dažādajām sekvencēšanas metodēm, kas tiek izmantotas laboratorijās (Jackson et al. 2021).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Izmantotie laboratorijas piederumi

1. tabula

Darbā izmantoto laboratorijas piederumu uzskaitījums

Table 1.

List of laboratory equipment used in the study

Laboratorijas piederumi Laboratory equipment	Ražotājs Manufacturer
1,5 ml DNS <i>LoBind</i> stobriņi	Eppendorf, Vācija
15 ml stobriņi	Sarstedt, Vācija
PCR 0,2 ml stripi	Sarstedt, Vācija
96 bedrīšu PCR plate	Sarstedt, Vācija
<i>Combitip</i> 1 ml uzgaļi	Eppendorf, Vācija
<i>Combitip</i> 10 ml uzgaļi	Eppendorf, Vācija
<i>Qubit assay tubes</i> 0,5 ml stobriņi	ThermoFisher Scientific, ASV
<i>Qubit flex assay tube strips</i> 0,5ml stobriņi	ThermoFisher Scientific, ASV
Fēču uzglabāšanas/ ievākšanas stobriņi	Sarstedt, Vācija
<i>MicroTUBE AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap</i> covaris stobriņi	Covaris, ASV
<i>Agilent High Sensitivity DNA</i> čips	Agilent Technologies, ASV
<i>Fast Prep Lysing Matrix D</i> stobriņi	MP Biomedicals, ASV
Filtra uzgaļi (20µl; 200µl; 1000µl; 1250µl)	Sarstedt, Vācija
Bio-Rad 96 bedrīšu, cieto malu PCR plate	Bio-Rad Laboratories, ASV
Uzgaļi robotam 250 µl	MGI Tech Co., Ķīna
1,3 ml dziļo bedrīšu plate	MGI Tech Co., Ķīna
1,4 ml micronic stobriņi	Micronic, Nīderlande

2.1.2. Izmantotie reaģenti

2. tabula

Darbā izmantoto reaģentu un maisījumu uzskaitījums

Table 2.

List of reagents and solutions used in the study

Reaģenti un maisījumi Reagents and solutions	Ražotājs Manufacturer
<i>Biotin-conjugated anti-human IgA</i>	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Biotin-conjugated anti-human IgG</i>	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Dynabeads MyOne Streptavidin C1</i>	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Normal mouse serum</i>	SaunthernBiotech, ASV
D-biotīns	Thermo Fisher Scientific, ASV
PBS	Sigma-Aldrich, ASV
<i>Bovine serum albumin</i>	Sigma-Aldrich, ASV
96% etanols	Jaunpagasts PLUS, Latvija
<i>MGIEasy Universal DNA Library</i> reaģentu komplekts	MGI Tech Co., Ķīna
<i>MagPure Stool DNA LQ</i> reaģentu komplekts	Angen Biotech, Ķīna
<i>MGIEasy DNA Clean Beads</i> magnētiskās lodītes	MGI Tech Co., Ķīna
<i>MGIEasy DNA 96</i> adapteru komplekts	MGI Tech Co., Ķīna
<i>MGIEasy Circularization Module</i> reaģentu komplekts	MGI Tech Co., Ķīna
<i>Qubit dsDNA HS</i> reaģentu komplekts	Life Technologies, ASV
<i>Qubit ssDNA HS</i> reaģentu komplekts	Life Technologies, ASV
<i>Agilent HS DNA</i> reaģentu komplekts	Agilent Technologies, ASV
<i>DNBSEQ-G400RS High-throughput</i> sekvencēšanas komplekts (FCL PE150)	MGI Tech Co., Ķīna
<i>ImmuChrom Secretory IgA ELISA</i> reaģentu komplekts	ImmuChrom GmbH, Vācija

2.1.3. Izmantotā aparātūra

3. tabula

Darbā izmantotās aparatūras uzskaitījums

Table 3.

List of equipment used in the study

Iekārta vai instruments Equipment	Ražotājs Manufacturer
FV-2400 mazā centrifūga/ vortekss	Biosan, Latvija
5424 centrifūga	Eppendorf, Vācija
FastPrep-24 homogenizators	MP Biomedicals, ASV
KR-130 BW laminārs	Kojair, Somija
Qubit 2.0 fluorometrs	Thermo Fisher Scientific, ASV
Qubit Flex fluorometrs	Thermo Fisher Scientific, ASV
MGISP-960 automatizētā paraugu apstrādes iekārta	MGI Tech Co., Ķīna
Concentrator Plus centrifūga	Eppendorf, Vācija
MPS C1000 PCR plašu centrifūga	Carl Roth GmbH + Co., Vācija
Milli-Q Synthesis A10	Ūdens attīrīšanas iekārta
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, ASV
DynaMag magnētiskais statīvs 96 bedrīšu platei	Thermo Fisher Scientific, ASV
DynaMag -2 magnētiskais statīvs 16 bedrītēm	Thermo Fisher Scientific, ASV
Covaris S220 sonifikators	Covaris, ASV
DNBSEQ-G400RS sekvenators	MGI Tech Co., Ķīna
MGIDL-200RS sekvenēšanas čipa uznešanas iekārta	MGI Tech Co., Ķīna
Multipette E3 1 µl - 50 ml	Eppendorf, Vācija
Olypmatic autoklāvs	International PBI, Itālija

2.1.4. Izmantotā programmatūra

- ❖ *MS Excel*
- ❖ R programma v.4.2.0 un *RStudio* v.2021.09.0
- ❖ *Galaxy Huttenhower* - LEfSE

2.2. Metodes

2.2.1. Pētījuma dizains

Pētījumā tika iekļauti paraugi no 40 pirmreizēji diagnosticētiem 2 . tipa cukura diabēta pacientiem un desmit veselām indivīdiem. 2TD pacientu paraugi tika ievākti no OPTIMED kohortas. OPTIMED pētījums nodrošina pirmreizēji diagnosticētus 2TD pacientus, kuriem vēl nav uzsākta terapija. Tas tiek nodrošināts sadarbojoties ar endokrinologiem un ģimenes ārstiem Latvijā, kuri iesaista pacientus ar E11 (ICD-11) diagnozi. Fēču paraugi no šiem pacientiem tika ievākti trīs laika punktos: (1) pirms metformīna terapijas - M0, (2) nedēļu pēc metformīna terapijas uzsākšanas - M7d un (3) trīs mēnešus pēc terapijas sākšanas - M3m. Zāļu deva tika uzņemta balstoties uz ārsta norādījumiem un pacienta klīniskajām vajadzībām.

Kontroles grupā tika iesaistīti desmit veseli brīvprātīgie, kuri tikuši iesaistīti MIKROMET16001 (EU klīniskā pētījuma reģistrācijas nr. 2016-001092-74) pētījuma ietvaros. Kontroles grupa saņēma 850 mg metformīna divas reizes dienā. Fēču paraugi veselu indivīdu kohortā tika ievākti (1) pirms metformīna lietošanas un (2) nedēļu pēc metformīna lietošanas.

Fēču paraugi no abām kohortām tika iegūti mājās sterilos, tam paredzētos, konteineros bez bufera. Iesaistītie pacienti nogādāja ievākto paraugu uz Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru (LBMC) vai tuvāko diagnostisko laboratoriju, kas sadarbojas ar LBMC. Tika lūgts paraugus nogādāt laboratorijā 24 h laikā, kur sākotnēji paraugus uzglabāja -20 °C temperatūrā, pēc piegādes LBMC paraugus uzglabā -80 °C līdz tālākai paraugu apstrādei. Dalībnieki no abām pētījuma grupām tika iesaistīti Latvijas Nacionālajā biobankā ar standarta procedūrām. Tika parakstīta informētās piekrišanas forma un pētījumu apstiprināja Centrālā medicīnas ētikas komiteja (1/19-10-22) un Latvijas Republikas Zāļu valsts aģentūra (17-1723).

2.2.2. sIgA koncentrācijas noteikšana

sIgA koncentrācija fēču paraugos tika noteikta izmantojot Secretary IgA ELISA reaģentu komplektu (ImmuChrom GmbH, Vācija). Visi protokola soļi tika pildīti balstoties uz ražotāja rekomendācijām, kas norādītas zemāk:

1. Visi reaģenti un plate tika uzsildītas līdz 20 - 30 °C temperatūrai. Nepieciešamajam paraugu skaitam, platē tika ievietoti stripi un vienu reizi skaloti ar 250 µl atšķaidīta WASHBUF. No atlikušā bufera atbrīvojās, ar plati pieskaroties absorbējošam papīram.
2. Tam sekoja paraugu inkubācija, 100 µl STD (standarts), CTRL (kontrolle) vai atšķaidīts paraugs tika iepilināti tam paredzētajās vietās. Plate tika nosepta un inkubēta uz kratītāja 60 min 20 - 30 °C.
3. Plates saturs pēc inkubācijas tika izliets, tam sekoja pieckārtēja mazgāšana ar 250 µl atšķaidīta WASHBUF. Pēc pēdējās skalošanas, no atlikušā bufera atbrīvojās, ar plati pieskaroties absorbējošam papīram.
4. Katrā bedrītē tika pievienoti 100 µl CONJ (konjugāts), plati nosedza un 60 min, 20 - 30 °C inkubēja uz kratītāja. Tam sekoja atkārtota mazgāšana piecas reizes.
5. Plates bedrītēs tika pievienoti 100 µl SUB (substrāta) un inkubēts 10 - 15 min tumsā, 20 - 30 °C.
6. Pēc inkubācijas tika pievienots 50 µl STOPP buferšķīduma un plates saturs tika labi samaisīts. Nolasījumi tika veikti 5 min laikā, absorbcijas nolasījumus veicot 450 nm viļņu garumā un kā references garumu izmantojot 620 nm garumu.

2.2.3. Uz magnētiskajām lodītēm balstīta baktēriju šķirošana

Lai iegūtu baktēriju šķīrotās frakcijas, LBMC tika izstrādāta un ieviesta jauna metode: uz magnētiskajām lodītēm balstīta baktēriju šķirošana pēc sIgA vai IgG piesaistes. Protokola izpildei bija nepieciešama šķīdumu sagatavošana, kam sekoja magnētisko, biotīna konjugēto lodīšu sagatavošana.

PBS (*phosphate buffered saline*): gatavs maisījums tika izšķīdināts 1l dejonizēta ūdens, izfiltrēts, izmantojot 0,2 µm filtru un autoklāvēts.

Staining buferis: Nepieciešamam PBS daudzumam, klāt pievienoja 1% BSA (*bovine serum albumin*) un izšķīdināja lēni invertējot.

Staining buferis (izmantots magnētiskajām lodītēm): vienam ml *staining* bufera klāt pievienoja 0,5 mg/ml D-biotīna uz katru paraugu.

Blocking buferis: 80 µl *staining* bufera pievienoja 20 µl *normal mouse serum* un 0,5 mg/ml D-biotīna.

1. Vienu µg Biotīna konjugētus *anti-human IgA* un *anti-human IgG* sajauc ar 100 µg *Dynabeads MyOne Streptavidin C1* uz katru apstrādājamo paraugu.
2. Magnētiskās lodītes inkubēja 15 min uz ledus, tās regulāri apmaisot.

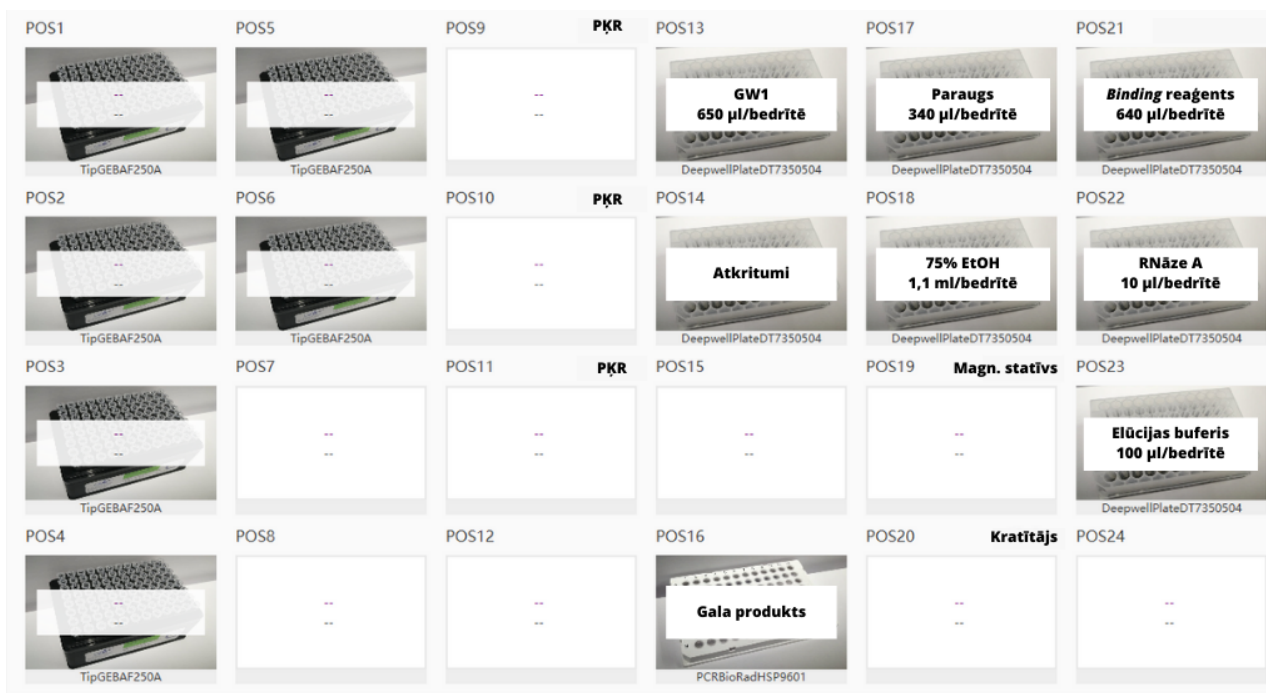
3. Izmantojot magnētisko stafīvu, tika noņemts supernatants. Pēc kā sekoja 1 ml *Staining* bufera, papildināta ar 0,5 mg/ml D-biotīna, pievienošana, lai bloķētu brīvo streptavidīnu.
4. Lodītes regulāri apmaisot, tās inkubēja 15 min uz ledus.
5. Stobriņu novietoja uz magnētiskā stafīva, noņēma supernatantu un divas reizes mazgāja magnētiskās lodītes ar 1ml *Staining* buferi.
6. Magnētiskās lodītes tika resuspendētas 20 µl *Staining* bufera uz katru paraugu.
Kad magnētiskās lodītes tika sagatavotas, tās uzglabāja ledusskapī +4 °C temperatūrā, līdz tālākai lietošanai un sāka apstrādāt paraugus, lai iegūtu šķīrotās frakcijas.
 1. Tika nosvērts un izmantots 100 mg fēču materiāls, kuru pārfasēja *Fast Prep Lysing Matrix D* stobriņā un pievienoja 1 ml ledus aukstu PBS (w/v).
 2. Stobriņu ievietoja *FastPrep-24* homogenizatorā uz 7 s, izmantojot ātrumu 4 m/s, lai resuspendētu materiālu.
 3. Lai atdalītu lielākās daļiņas, stobriņi tika centrifugēti 15 min, 4 °C temperatūrā, izmantojot ātrumu 50 x g (brīvās krišanas paātrinājums).
 4. Supernatants tika atdalīts un pārnesti uz jaunu stobriņu, kur tam pievienoja 1 ml *staining* bufera. Daļa no šī parauga tika ievākta un uzglabāta pie -80 °C, vēlāk to izmantojot kā nešķīroto frakciju.
 5. Nepiesaistītais IgA un IgG tika nomazgāts, centrifugējot paraugu 5 min (8000 x g, 4 °C) un noņemot lieko supernatantu.
 6. Nosēdušās daļiņas tika resuspendētas 1 ml *staining* bufera, atkārtoti centrifugētas 5 min (8000 x g, 4 °C) un supernatants tika izmests.
 7. Daļiņas resuspendēja 100 µl *blocking* bufera un inkubēja 20 min uz ledus.
 8. Pēc inkubācijas tika pievienoti 20 µl iepriekš sagatavoto magnētisko lodīšu un paraugus atkārtoti inkubēja 30 min tumsā uz ledus.
 9. Stobriņi, kuros atradās magnētiskās lodītes ar piesaistītām baktērijām, tika novietoti uz magnētiskā stafīva un piecas reizes mazgāti ar 1 ml *staining* bufera.
 10. Atlikušās nosēdušās daļiņas tika resuspendētas 100 µl PBS un uzglabātas -80 °C, kas vēlāk kalpoja kā sortētās frakcijas.

2.2.4. Bakteriālās DNS izolēšana

Lai izolētu bakteriālo DNS, tika izmantota MGISP-960 (*MGI Tech Co., Ltd*) automatizēta iekārta un *MagPure Stool DNA LQ* reaģentu komplekts (*Angen Biotech Co., Ltd*).

1. Viss parauga materiāls (~ 50 µl) tika pārnesti uz 2 ml *Bead tube* stobriņu, kur tam tika pievienots 600 µl ATL buferis, papildināts ar PV-10 pulveri, un 600 µl PCL buferis.
2. Stobriņi tika ievietoti *FastPrep-24* homogenizatorā uz 40 s, izmantojot ātrumu 6 m/s, kas nodrošina lielākās daļas baktēriju šūnapvalku sagraušanu.
3. Lai baktēriju lizēšana būtu veiksmīgāka, pēc homogenizēšanas paraugus uz 20 min ievietoja termostatā 65 °C temperatūrā.
4. Baktēriju lizēšanai sekoja 5 min paraugu centrifugēšana, izmantojot 13000 x g ātrumu.

Pēc paraugu sagatavošanas DNS izolēšanai, tie tika pārvietoti uz plati, izmantojot 340 µl paraugu uz bedrīti. 3. attēlā ir redzams, kā tika sagatavota automatizētā iekārta priekš DNS izdalīšanas. Pirmajās sešās pozīcijās tika novietoti uzgaļi un atlikušajās ir norādīti izmantotie reaģenti un to daudzumi, ko automatizētā iekārta izmantoja DNS izolēšanai. Tika izmantota *MGISP-960* programma un *SP960-DNAextr-MagPure Stool LQ-v1* protokols, vadoties pēc *Stool DNA Extraction v1.1.py* skripta.



3. attēls. MGISP-960 iekārtas materiālu izvietojums priekš mikrobiālās DNS izolēšanas.

Figure 3. Arrangement of MGISP-960 materials for microbial DNA isolation.

2.2.5. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana

Izdalīto paraugu koncentrācija tika noteikta izmantojot *Qubit® dsDNA HS* reaģentu komplektu pēc sekojošā protokola.

1. Tika izveidots reakcijas maisījums, izmantojot 199 µl buferšķīduma un 1 µl gaismjutīgās krāsvielas uz katru paraugu, ņemot vērā standartšķīdumiem nepieciešamos reaģentus.

2. Reakcijas tika pildītas *Qubit® Assay* stobriņos, izmantojot 198 µl iepriekš sagatavotā reakcijas maisījuma un 2 µl interesējošā parauga. Standartšķīdumu gadījumā tika izmantoti 190 µl krāsas un bufera maisījuma kā arī 10 µl standartu (S1 vai S2).
3. Stobriņi tiek vorteksēti, šķīdums nodzīts uz leju, pēc kā sekoja 2 min inkubācija.
4. Kad paraugi tika sagatavoti, to koncentrācija tika noteikta izmantojot *Qubit® 2.0* vai *Qubit® Flex* fluorometru.
5. Ierīces galvenajā ekrānā tika izvēlēts *dsDNA High Sensivity* un ar standartšķīdumiem tika veikta ierīces kalibrācija.
6. Pēc kalibrācijas, paraugi pa vienam tika ievietoti tiem paredzētajā vietā, un tiem tika veikta koncentrācijas noteikšana.

2.2.6. Izdalītās bakteriālās DNS koncentrēšana un centrifugēšanas vakuuma koncentratorā

Katra parauga mikrobiālā DNS tika izdalīta trīs alikvotās tādēļ, lai būtu iespējams nodrošināt fragmentēšanai nepieciešamo koncentrāciju, divas alikvotas tika apvienotas un iekoncentrētas, izmantojot vakuuma koncentratoru - *Eppendorf Concentrator Plus*.

1. Paraugi atradās atvērto stobriņos un tika izkārtoti līdzsvarā. Tika apvienotas un izmantotas arī izdalīšanas negatīvās kontroles, kuras arī turpmāk apstrādāja tāpat kā paraugus.
2. Tika izvēlēts +30 °C režīms un norādīts paraugu šķidrās agregātstāvoklis, izvēloties “V-Aq” funkciju.
3. Paraugi tika koncentrēti, līdz tie sasniedz aptuveni 60 µl tilpumu.

2.2.7. Bakteriālās DNS fragmentēšana

Bakteriālā DNS tika fragmentēta, izmantojot ultraskaņas sonifikācijas metodi un *Covaris* sistēmu.

1. Fragmentēšanai tika izmantoti 55 µl parauga vai, nepieciešamības gadījumā, tie tika atšķaidīti līdz 300 ng koncentrācijai 55 µl tilpumā.
2. Tika ieslēgta *Covaris* dzesēšanas sistēma, kur ir uzstādīta +4°C temperatūra.
3. Ūdens tvertne tika uzpildīta līdz 12,5 iedaļai “*Fill*” kolonnā ar dejonizētu ūdeni un ievietota tai paredzētajā vietā, sekojoši tika ieslēgts atgaisotājs.
4. Pēdējā tika ieslēgta *Covaris S220* aparatūra un dators, palaižot *Sonolabs* programmatūru un izvēloties “*400 base pair fragmentation*”.

5. Ūdens tvertnē iepildītais ūdens tika dzesēts un atgaisots apmēram 30 min, šajā laikā iepriekš atšķaidītie paraugi tika pārnesti uz speciāliem sonifikatoram paredzētiem *microTUBE AFA Fiber* stikla stobriņiem.
6. Kad ūdens tika atdzesēts, stobriņus pa vienam ievietoja sonifikatora kapsulā un spieda *Run*. Paraugu apstrāde ar ultraskaņu norisinājās 55 s, pēc kurām DNS tika sašķelts vidēji 400 bp garos fragmentos.

2.2.8. Fragmentēšanas galaprodukta attīrīšana

Lai atbrīvotos no neatbilstošā garuma fragmentiem, tika veikta fragmentētās DNS galaprodukta attīrīšana pēc sekojošā protokola.

1. Magnētiskās lodītes tika novietotas istabas temperatūrā (~20 - 22 °C) vismaz 30 min pirms to izmantošanas.
2. Tīkmēr notika fragmentēto paraugu atšķaidīšana ar TE buferi līdz 100 µl tilpumam, kam tika pievienotas 60 µl, istabas temperatūru sasniegušas, magnētiskās lodītes.
3. Paraugu un lodīšu maisījums tika samaisīts un inkubēts istabas temperatūra 5 min, lai lodītes piesaistītu DNS fragmentus.
4. Stobriņi tika novietoti uz magnētiskā statīva aptuveni 2 - 5 min, līdz atlikušais šķidrums kļuva caurspīdīgs.
5. Supernatants tika pārņemts uz jaunu stobriņu un tam tika pievienotas papildus 20 µl magnētiskās lodītes.
6. Paraugu un lodīšu maisījums tika samaisīts un inkubēts istabas temperatūra 5 min.
7. Stobriņus novietoja uz magnētiskā statīva 2 - 5 min, izmeta supernatantu un mazgāja magnētiskās lodītes divas reizes, izmantojot 200 µl ar tikko atšķaidītu 80% etanolu.
8. Supernatantu izmeta un magnētiskās lodītes tika žāvēta uz magnētiskā statīva, līdz tās zaudēja spīdumu.
9. Lodītes tika resuspendētas 32 µl TE bufera, inkubētas 5 min istabas temperatūrā un atkārtoti novietotas uz magnētiskā statīva 2 - 5 min.
10. 30 µl attīrīti DNS fragmenti, neaizskarot magnētiskās lodītes, tika pārnesti uz jaunu stobriņu. Pēc kā sekoja atkārtota DNS koncentrācijas noteikšana.

2.2.9. Fragmentētās DNS galu labošana

1. Priekš DNS galu apstrādes (*End Repair* un *A - tailing*) tika izmantots līdz 50 ng DNS 40 µl tilpumā. Nepieciešamības gadījumā paraugi tika atšķaidīti un turpmāk bibliotēku gatavošanas procesā tos turēja uz ledu.
2. Sagatavoja reakcijas maisījumu uz katru paraugu:

<i>ERAT</i> buferšķīdums	7,1 μ l
<i>ERAT</i> enzīmu maisījums	2,9 μ l
Kopējais tilpums:	50 μ l

3. Samaisa parauga un reakcijas maisījumu to trīs reizes pa 3 s vorteksējot, maisījumu nodzen uz leju un ievieto programmējamā termostatā sekojošos reakcijas apstākļos:

37 °C	30 min
65 °C	15 min
4 °C	Uzglabā

2.2.10. Adapteru ligēšana

1. Paraugiem tika pievienots 5 μ l *MGIEasy DNA* adapteri, kuri nepieciešamības gadījumā tika atšķaidīti, baltoties uz fragmentētās DNS koncentrāciju.
2. Tika sagatavots un, lēni pipetējot, pievienots sekojošais reakcijas maisījums:

Ligēšanas buferis	23,4 μ l
DNS ligāze	1,6 μ l
Kopējais tilpums:	80 μ l

3. Reakcijas maisījums ar paraugu tika samaisīts, vorteksējot stobriņus sešas reizes pa 3 s katru un nodzenot paraugu uz leju.
4. Paraugi tika ievietoti programmējamā termostatā 23 °C temperatūrā uz 30 min.
5. Reakcijas beigās paraugiem tika pievienots 20 μ l TE buferis, lai sasniegtu attīrīšanai nepieciešamo 100 μ l tilpumu.

2.2.11. Adapteru ligētās DNS attīrīšana

1. *DNA Clean Beads* magnētiskās lodītes tika novietotas istabas temperatūrā vismaz 30 min pirms to lietošanas.
2. 50 μ l lodīšu tika pievienotas 100 μ l parauga, samaisīts un inkubēts 5 min istabas temperatūrā.
3. Pēc inkubācijas, maisījumu novietoja uz magnētiskā statīva aptuveni 2 - 5 min, un izmeta supernatantu.
4. Lodītes tika divas reizes skalotas ar 200 μ l svaigi pagatavota 80% etanola, supernatants tika izmests un lodītes žāvēja, līdz izzuda to spīdums.
5. Lodītēm pievienoja 21 μ l TE buferi, tās inkubēja 5 min un atkārtoti novietoja uz magnētiskā statīva.

6. Kad supernatants bija caurspīdīgs, 19 µl pārnesa uz jaunu stobriņu tālākai bibliotēku sagatavošanai.

2.2.12. PĶR amplifikācija

1. Tika sagatavots sekojošais reakcijas maisījums, un pievienots 19 µl DNS maisījuma.

PĶR enzīmu maisījums	25 µl
PĶR praimeru maisījums	6 µl
Kopējais tilpums:	50 µl

2. PĶR amplifikācijas maisījums ar pievienoto paraugu tika samaisīts, to vorteksējot trīs reizes, katru 3 s ilgi un nodzīts.
3. Paraugus ievietoja programmējamā termostatā, sekojošos reakcijas apstākļos:

95 °C	3 min - 1 cikls
98 °C	20 s
60 °C	15 s - 13 cikls
72 °C	30 s
72 °C	10 min - 1 cikls
4 °C	Uzglabā

4. Amplifikācijas produkts tika attīrīts tāpat kā solī 2.2.10, taču šoreiz magnētisko lodīšu attiecība bija 1:1 un eluāciju veica 32 µl TE bufera, iegūstot 30 µl gala produkta.
5. Tika veikta atkārtota koncentrācijas noteikšana ar *Qubit® dsDNA HS* reaģentu komplektu.

2.2.13. DNS bibliotēkas kvalitātes noteikšana

1. Lai noteiktu DNS bibliotēku kvalitāti un to vidējo garumu, tika izmantots *Agilent High Sensitivity DNA* reaģentu komplekts, kuru vismaz 30 min pirms lietošanas novietoja istabas temperatūrā.
2. Tika sagatavots gēla un krāsas maisījums, pievienojot 15 µl *High Sensitivity DNA* krāsas koncentrātu gēlam, samaisot un pārnesot maisījumu uz filtra kolonnu, pēc kā sekoja centrifugācija 2300 g, 15 minūtes.
3. Tika sagatavota čipa uzpildes stacija, vadoties pēc ražotāja norādījumiem, čipa pamatni novietojot C pozīcijā un šļirces sviru atstājot zemākajā pozīcijā kā arī pārliedzinoties, ka šļirces virzulis ir novietots 1 ml atzīmē.
4. Uzpildes stacijā ievietoja *High Sensitivity DNA* čipu, paralēli *Agilent Bioanalyzer 2100* iekārtā ievietojot mazgāšanas čipu, uzpildītu ar dejonizētu ūdeni.

- Čipa **G** bedrītē iepilināja 9 μl gēla un krāsas maisījumu, aizvēra čipa uzpildes staciju un piespieda šļirci, līdz to nofiksēja šļirces svira, paralēli uzņemot precīzi 60 s, pēc kurām šļirce tika atlaista un atgriezās sākuma pozīcijā.
- Atlikušajās G bedrītēs tika iepilināts pa 9 μl gēla un krāsas maisījums, bet pārējās 12 iepildīja 5 μl standartmarķiera.
- Čipa bedrītē, kura ir apzīmēta ar trepēm, tikai iepilināts 1 μl *High Sensitivity DNA* garuma marķieri un 11 numurētajās bedrītēs pievienoja pa 1 μl parauga.
- Čips tika vorteksēts 1 min 2400 rpm ātrumā, paralēli izņemot mazgāšanas čipu un ievadot nepieciešamo informāciju par paraugiem bioanalizatora iekārtā.
- Kapilārās elektroforēzes čips tika ievietots iekārtā, tika atvērta *2100 Expert* programma un izvēlēts sekojošais analīzes protokols: *dsDNA High Sensitivity DNA* sadaļā *Assays*, pēc kā tika uzsākta paraugu kvalitātes noteikšana.

2.2.14. Vienpavediena DNS cirkularizācija

- Divdesmit paraugi tika sajaukti kopā, balstoties uz to garumiem un koncentrācijām tā, lai visi paraugi kopumā būtu 1pmol un tiem pievienoja TE buferi līdz 48 μl tilpumam.
- Stobriņu ar paraugiem ievietoja 3 min 95 °C programmējamā termostatā. Nekavējoties pēc reakcijas beigām, stobriņu novietoja ledus statīvā.
- Paralēli tika sagatavots sekojošais reakcijas maisījums uz katru paraugu maisījumu:

<i>Splint</i> buferšķīdums	11,6 μl
<i>DNA Rapid</i> ligāze	0,5 μl
Kopējais tilpums:	60,1 μl

- Maisījums tika vorteksēts 3 reizes pa 3 sekundēm un nocentrēts. Pēc tam to ievietoja 37 °C temperatūrā uz 30 min.
- Sekojoši tika sagatavots nākošais reakcijas maisījums:

<i>Digestion</i> buferšķīdums	1,4 μl
<i>Digestion</i> enzīms	2,6 μl
Kopējais tilpums:	64,1 μl

- Maisījums tika vorteksēts 3 reizes pa 3 sekundēm un nocentrēts. Pēc tam to ievietoja 37 °C temperatūrā uz 30 min. Reakcijas beigās nekavējoties tika pievienots 7,5 μl *Digestion Stop* buferšķīdums.

2.2.15. Cirkularizācijas galaprodukta attīrīšana un kvantificēšana

Cirkularizācijas galaprodukta attīrīšana notika vadoties pēc tādiem pašiem soļiem kā 2.2.10. apakšnodaļā. Taču 71,6 µl galaprodukta tika pievienoti 170 µl ar *DNA Clean Beads* magnētiskajām lodītēm. Inkubācijas notika 10 min un galaproduktu mazgāja ar 500 µl 80% etanola. Paraugs tika eluēts 30 µl TE buferšķīduma, iegūstot 27 µl galaprodukta.

Koncentrācija tika noteikta vadoties pēc 2.2.4. apakšnodaļā noteiktiem soļiem, taču tādēļ, ka galaprodukts ir vienpavediena DNS, koncentrācijas mērīšanai tika izmantots *ssDNA High Sensivity* reaģentu komplekts.

2.2.16. Sekvencēšana

Sekvencēšana tika veikta izmantojot *MGI DNBSEQ-G400RS* iekārtu un soļi kā paraugi tika sagatavoti sekvencēšanai ir sekojoši:

1. Tika aprēķināts nepieciešamam vienpavediena DNS daudzums sekmīgai sekvencēšanai un paraugi tika sekojoši sagatavoti:

<i>ssDNA</i> bibliotēkas	V µl
<i>Low TE</i> buferšķīdums	20 - V µl
<i>Make DNB</i> buferšķīdums	20 µl
<hr/>	
Kopējais tilpums:	40 µl

2. Paraugi tika īsi vorteksēti, nocentrēti un ievietoti programmējamā termostātā 1 min 95 °C; 1 min 65 °C un 1min 40 °C temperatūrā, pēc tam ļaujot paraugam atdzist līdz 4 °C.
3. Paraugiem tika pievienoti sekojošie reaģenti:

<i>Make DNB</i> enzīmu maisījums (I)	40 µl
<i>Make DNB</i> enzīmu maisījums (II)	4 µl
<hr/>	
Kopējais tilpums:	88 µl

4. Paraugi tika īsi vorteksēti, centrifugēti un ievietoti programmējamā termostātā 30 °C uz 30 min, iepriekš atdzesējot termostata vāku līdz 35 °C.
5. Līdz ko paraugi sasniedz 4 °C temperatūru, tika pievienots 20 µl *Stop DNB Reaction Buffer*. Paraugi tika ļoti lēni sapīpetēti ar speciāliem platiem uzgaļiem, lai nesaplēstu izveidotās DNB (DNS nanobumbiņas).
6. Tika noteikta DNB koncentrācija, izmantojot *Qubit ssDNA High Sensivity* reaģentu komplektu.
7. Iegūtajam DNB tika pievienots sekojošs reakcijas maisījums

<i>DNB Load Buffer (II)</i>	16 µl
<i>Make DNB Enzyme Mix (II)</i>	0,5 µl
DNB	50 µl
Kopējais tilpums:	66,5 µl

8. Maisījums tika ļoti lēni sapipetēts ar platiem uzgaļiem un novietots secībā kā tas atradīsies uz plūsmas šūnas. DNB ar visaugstāko koncentrāciju 1. pozīcijā, otru augstāko 4. pozīcijā, atlikušos novietojot pa vidu.
9. Pēc tam sekoja PE150 plūsmas šūnas (*flow cell*) sagatavošana: tā tika sasildīta istabas temperatūrā vismaz 60 min. Notīrīta un ievietota MGIDL-200RS DNB uznešanas iekārtā.
10. Plūsmas šūna tika novietota tai paredzētajā vietā, pārliedzinoties, ka tiek sasniegts vismaz - 80 līdz - 99 kPa negatīvs spiediens un tika sākta iegūto DNB uznešana uz plūsmas šūnas un tai sekojoša 30 min inkubācija.
11. Inkubācijas laikā iepriekš atkausēts augstas caurlaidības PE150 sekvencēšanas kārtidžs tika papildināts ar 2,4 ml *dNTPs Mix* un 2,4 ml sekvencēšanas enzīmu maisījumu 1. bedrītē. 2,1 ml *dNTPs Mix II* un 2,1 ml sekvencēšanas enzīmu maisījums tika pievienoti 2. kārtidža bedrītē.
12. Kārtidžā esošie reaģenti tika samaisīti, paralēli 500 µl *MDA Enzyme Mix* tika pievienots *MDA Reagent* un viss maisījums tika ievietots kārtidža 15. bedrītē.
13. Kad sekvencēšanas kārtidžs tika sagatavots, to ievietoja *DNBSEQ-G400RS* sekvencēšanas iekārtā, pēc tam ievietoja plūsmas šūnu, pārliedzinoties ka arī sekvencēšanas iekārtā ir sasniegts pietiekams negatīvais spiediens. Tika savādīta visa nepieciešamā informācija par paraugiem un uzsākta sekvencēšana, gala rezultātā iegūstot vismaz 20 miljonus nolasījumu uz katru paraugu.

2.2.17. Datu analīze un statistika

No iegūtajām sekvencēm tika nogriezti adapteri un tika veikta nolasījumu apgriešana, izmantojot *fastp 0.20.0*. Nolasījumi kas bija īsāki par 100 bp, tika noņemti. Lai atbrīvotos no saimniekorganisma DNS piejaukuma, iegūtie nolasījumi tika pielīdzināti ar *bowtie2* (versija 2.3.5.1) pret *GRCh38 (ensembl release 108)* references genomu. Taksonomisko sadalījumu ieguva izmantojot *Kraken2 (v2.1.2)/Bracken (v2.7)* ar uzticamības filtru 0,1. Lai izvairītos no potenciāliem kontaminantiem, no *Bracken* sugas līmeņa rezultātiem tika atfiltrēti nolasījumi, kuru īpatsvars paraugā bija zem 0,01% vai attiecīgā suga bija sastopama mazāk kā 10% paraugu. Datu pirmapstrādi veica kvalificēts bioinformātikas speciālists.

Tālāk dati tika apstrādāti izmantojot programmatūru *Microsoft Excel*, iegūstot pareizi noformatētus *CSV* un *EXCL* failus, lai tos varētu izmantot programmā *R* un tiešsaistes rīkā *Galaxy*. Tiešsaistes rīks tika izmantots LEfSE (*linear discriminant analysis (LDA) of effect size*) analīzes veikšanai, izmantojot LDA novērtējuma sliekšni 2. Iegūtie rezultāti tika vizualizēti *Galaxy* platformā. Programmas *R 4.2.0* un *R Studio (2021.09.0)* tika izmantotas lai grafiski atainotu taksonomisko sadalījumu pa grupām un attēlotu alfa un beta daudzveidības.

3. REZULTĀTI

Maģistra darba ietvaros tika ievākti klīniskie dati un fēču paraugi par 40 jaundiagnosticētiem, terapiju neuzsākušiem, 2. tipa cukura diabēta pacientiem un 10 veselīgiem indivīdiem. No pacientiem paraugi tika ievākti trīs laika posmos: M0 - pirms terapijas uzsākšanas; M7d - septiņas dienas pēc metformīna terapijas sākšanas un M3m - trīs mēnešus pēc terapijas sākuma. No veselīgiem indivīdiem paraugi tika ievākti divos laika posmos: M0 - pirms terapijas sākuma un M7d - septiņas dienas pēc metformīna terapijas uzsākšanas. Katrs no ievāktajiem paraugiem tika sadalīts trīs frakcijās: (1) nešķirots paraugs, kas būtībā ataino klasisku fēču metagenomu; (2) IgA frakcija, kur ar magnētisko lodīšu palīdzību ir atšķirtas baktērijas, kuras bija saistījušās ar sIgA, un (3) IgG frakcija, kur tika atšķirtas ar IgG saistītās baktērijas. Šādi kopsummā tika apstrādāti un sekvencēti 420 paraugi, taču trīs no tiem tika izslēgti no tālākas analīzes nepietiekamā nolasījumu skaita dēļ. Informācija par pētījumā iesaistītajiem indivīdiem ir pieejama 4. tabulā.

4. tabula.

Pētījumā iesaistīto dalībnieku raksturojums

Table 4.

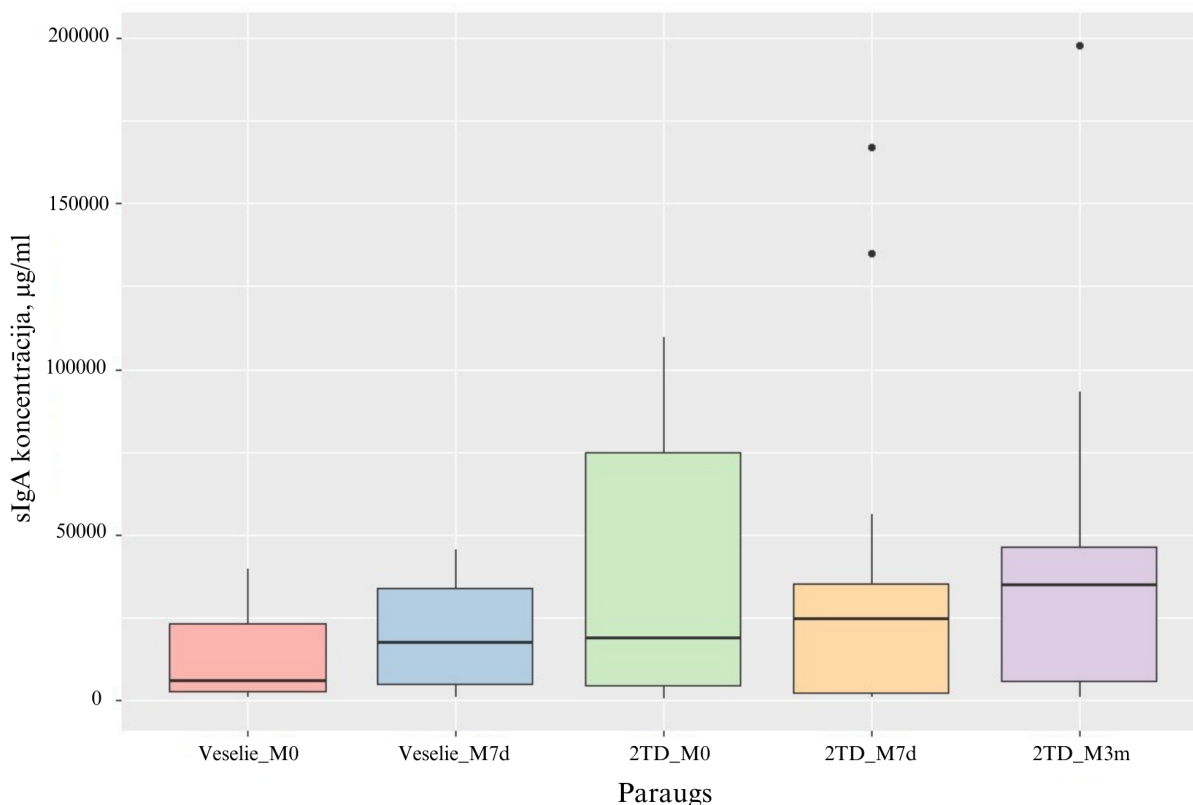
Characteristics of the participants involved in the study

Raksturojums Characteristic	2TD pacienti (N=40) T2D patients (N=40)	Veselās kontroles (N=10) Healthy controls (N=10)
Vīrietis/Sieviete, n (%) Male/Female, n (%)	19(47,5%) / 21(52,5%)	4(40%) / 6(60%)
Vecums (gados), mediāna ± IQR Age (years), median ± IQR	57,5 ± 15,25	24 ± 5,75
ĶMI, mediāna ± IQR BMI, median ± IQR	33,7 ± 3,83	24,12 ± 2,53
Pamata HbA1c (%), mediāna ± IQR Baseline HbA1c (%), median ± IQR	8,2 ± 3,3	-
Metformīna deva (mg/dienā), mediāna ± IQR Metformin dose (mg/day), median ± IQR	2000±500	1700 ± 0

ĶMI - ķermeņa masas indekss; IQR - starpkvartilu diapozons; HbA1c - glikētais hemoglobīns.

BMI - body mass index; IQR - interquartile range; HbA1c - glycated haemoglobin.

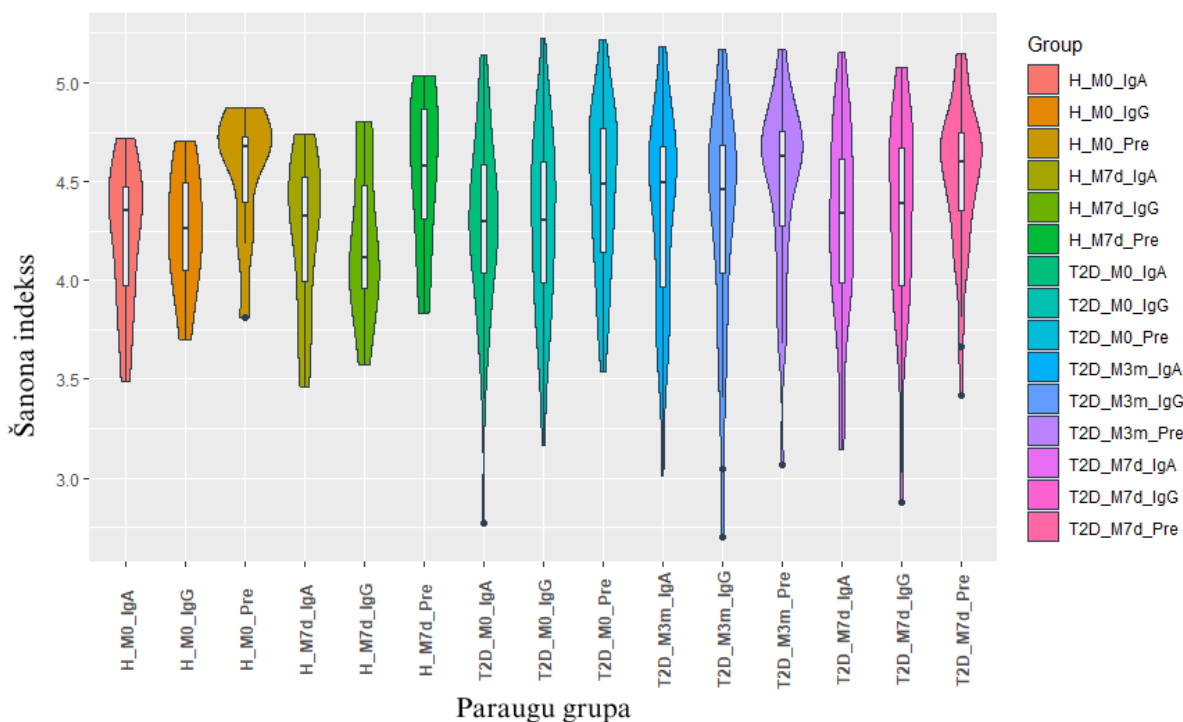
Ievāktajiem fēču paraugiem tika noteikts sIgA līmenis, izmantojot *ELISA Secretary IgA* reaģentu komplektu. sIgA koncentrāciju mērījumi tika veikti 26 2TD pacientiem un 25 veselām kontrolēm metformīna lietošanas laikā, kopsummā sIgA līmeni nosakot 128 paraugos - rezultāti ir apkopoti 4. attēlā. Redzams, ka 2TD grupā tika novērotas vairākas ekstrēmās vērtības, turklāt metformīna terapijas rezultātā, vidējā sIgA koncentrācija paaugstinās, tomēr nerasniedzot statistiskās nozīmības līmeni.



4. attēls. Fekālā sIgA līmenis ($\mu\text{g/ml}$) metformīna terapijas laikā 2TD pacientiem un veselām kontrolēm. Paraugi: M0 - pirms metformīna terapijas, M7d - vienu nedēļu pēc metformīna terapijas, M3m - trīs mēnešus pēc metformīna terapijas.

Figure 4. Faecal sIgA levels ($\mu\text{g/ml}$) during metformin administration in T2D patients and healthy controls. Samples: M0 - before metformin therapy, M7d - after one-week metformin therapy, M3m - after three months of metformin therapy.

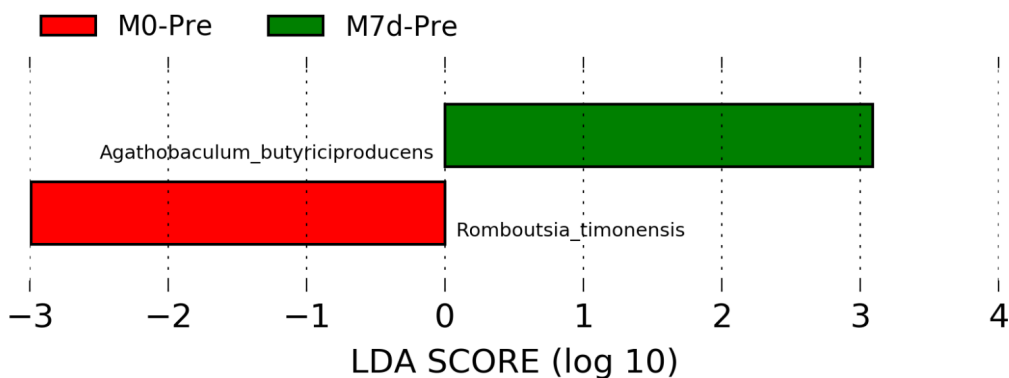
No iegūtajiem datiem tika izslēgtas iespējamās kontaminācijas ceļā radušās sugas, atfiltrējot tās, kuru īpatsvars paraugā bija zem 0,01% vai attiecīgā suga bija sastopama mazāk kā 10% paraugu. Šie dati tika izmantoti, lai vispārēji raksturotu analizētos paraugus, tika noteikta to dažādība, aprēķinot alfa jeb Šanona daudzveidību. Iegūtās Šanona indeksa vērtības un to izmaiņas ir redzamas 5. attēlā.



5. attēls. Paraugu alfa (iekšējās) daudzveidības izmaiņas metformīna lietošanas laikā. Ar violīn-grafiku (*violine plot*) ir attēlots Šenona indekss, to kombinējot ar kastveida un nogriežņu procentiņu grafiku (*boxplot*) un Karnela blīvuma grafiku.

Figure 5. Changes in alpha diversity of samples during metformin use. Shannon's index is represented by a violin plot combining a boxplot and a Kernel density plot.

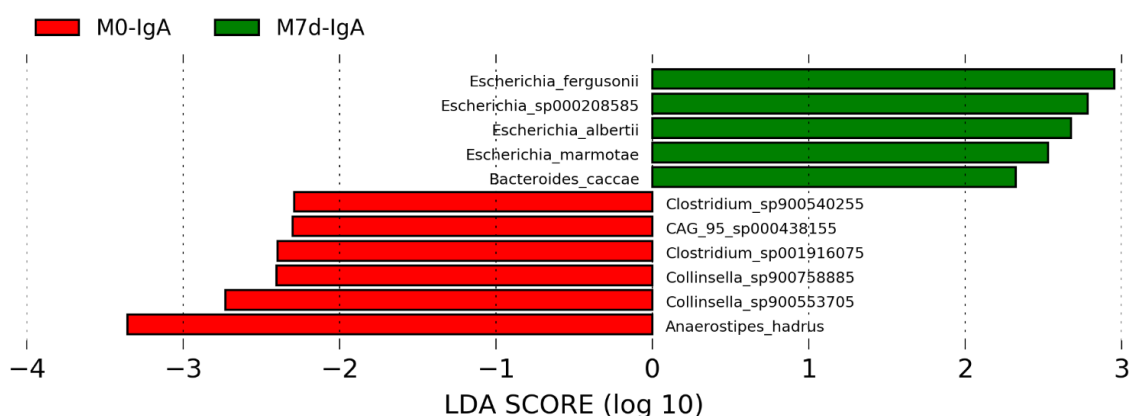
Lai noteiktu kuras baktēriju sugas tika būtiski izmainītas metformīna lietošanas laikā, sākotnēji tika salīdzināti paraugi longitudināli, katrs savas frakcijas ietvaros: nešķīrotas baktērijas (*Presort*), baktērijas apklātas ar sIgA (IgA+) un baktērijas apklātas ar IgG (IgG+). Metformīna lietošanas ietekme veselos indivīdos tika salīdzināta pirms un nedēļu pēc metformīna terapijas sākuma, lietojot to divas reizes dienā pa 850 mg. Veselos indivīdos tika novērots *Agathobaculum butyriciproducens* pieaugums metformīna lietošanas laikā un *Rombutsia timonensis* samazināšanās, nešķīrotās baktērijās, kā redzams 6. attēlā.



6. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LEfSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas veselos indivīdos. Tiek salīdzinātas nešķīrotas zarnu mikrobioma baktērijas (Pre) pirms metformīna lietošanas (M0) un septiņas dienas pēc (M7d).

Figure 6. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LEfSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in healthy individuals. Presorted gut microbiome bacteria (Pre) before (M0) and seven days after (M7d) metformin treatment are compared.

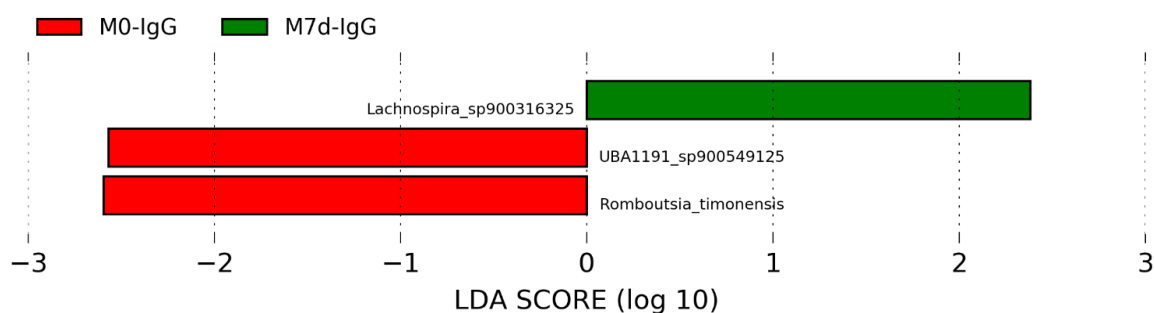
Salīdzinot IgA+ frakcijas izmaiņas metformīna lietošanas laikā veselos indivīdos, tika novērots piecu sugu relatīvās sastopamības pieaugums. *Escherichia fergusonii* suga uzrādīja vislielāko pieaugumu septiņas dienas pēc metformīna lietošanas. Savukārt būtisks samazinājums tika novērots sešās sugās. Vislielāko samazinājumu novēroja sugā *Anaerostipes hadrus* kā redzam 7. attēlā.



7. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LEfSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas veselos indivīdos. Tiek salīdzinātas ar sIgA pārklātas zarnu mikrobioma baktērijas (IgA) pirms metformīna lietošanas (M0) un septiņas dienas pēc (M7d).

Figure 7. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LEfSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in healthy individuals. sIgA-coated gut microbiome bacteria (IgA) before metformin administration (M0) and seven days after (M7d) are compared.

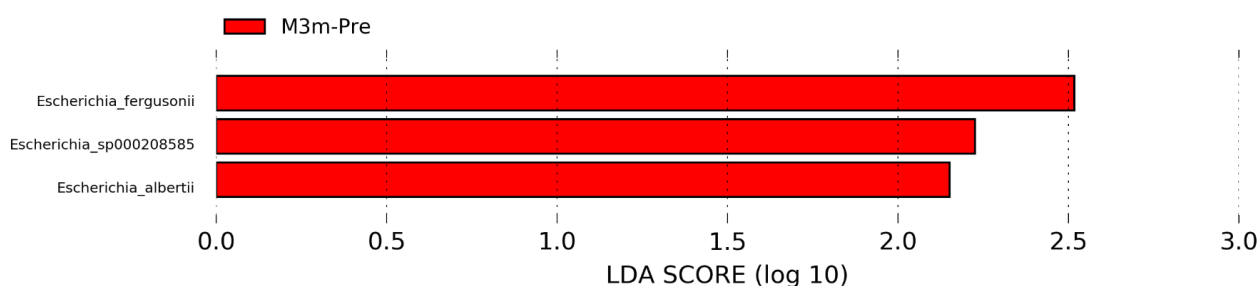
Savukārt salīdzinot izmaiņas IgG+ frakcijā veselos indivīdos (8. attēls), tika novērots vienas baktēriju sugas būtisks pieaugums - *Lachnospira sp900316325*, un divu sugu būtisks samazinājums metformīna ietekmē: *UBA1191 sp900549125*, *Romboutsia timonensis*.



8. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LEfSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas veselos indivīdos. Tiek salīdzinātas ar IgG pārklātas zarnu mikrobioma baktērijas (IgG) pirms metformīna lietošanas (M0) un septiņas dienas pēc (M7d).

Figure 8. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LEfSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in healthy individuals. IgG-coated gut microbiome bacteria (IgG) before metformin administration (M0) and seven days after (M7d) are compared.

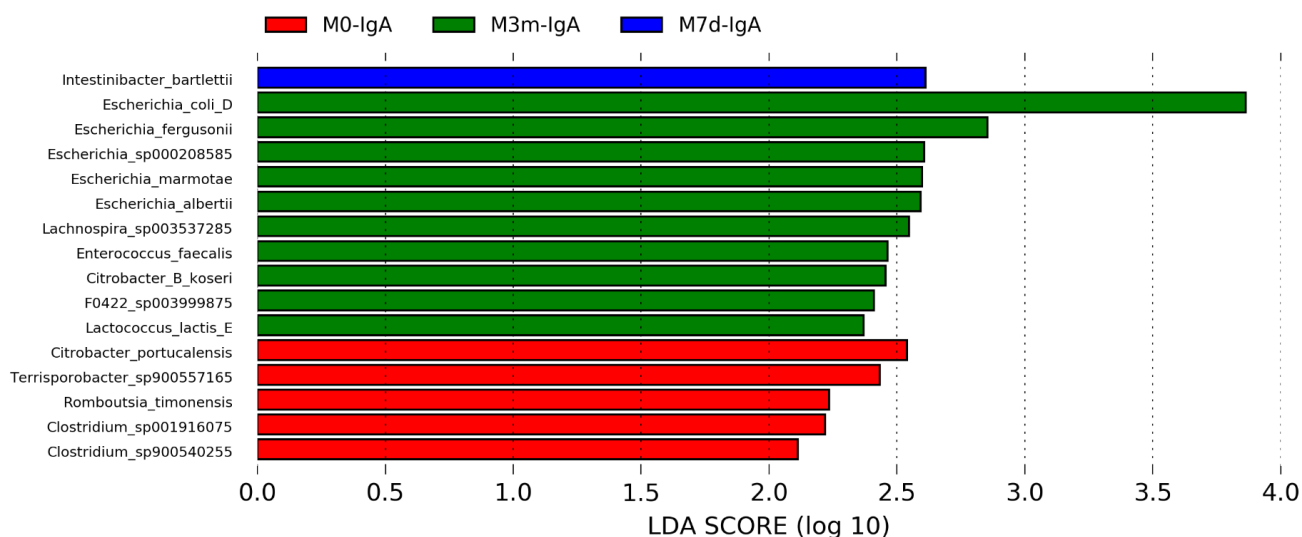
Pēc tam tika salīdzināta metformīna lietošanas ietekme uz zarnu mikrobioma baktērijām 2TD pacientos. Salīdzinājumi tika veikti longitudināli, salīdzinot trīs laika posmus, katru savā frakcijā. Sākotnējais salīdzinājums tika veikts nešķīrotās baktērijās, pirms metformīna lietošanas, nedēļu un trīs mēnešus pēc terapijas uzsākšanas 2TD pacientos. Kā redzams 9. attēlā, starp nešķīrotām baktērijām tika novērots būtisks 3 sugu pieaugums: *Escherichia fergusonii*, *Escherichia sp000208585* un *Escherichia albertii*.



9. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LEfSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas 2TD pacientos. Tiek salīdzinātas nešķīrotas zarnu mikrobioma baktērijas (Pre) pirms metformīna lietošanas (M0), septiņas dienas (M7d) un trīs mēnešus (M3m) pēc terapijas uzsākšanas.

Figure 9. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LEfSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in patients with type 2 diabetes mellitus. Presorted gut microbiome bacteria (Pre) before metformin administration (M0), seven days (M7d) and three months (M3m) after initiation of therapy are compared.

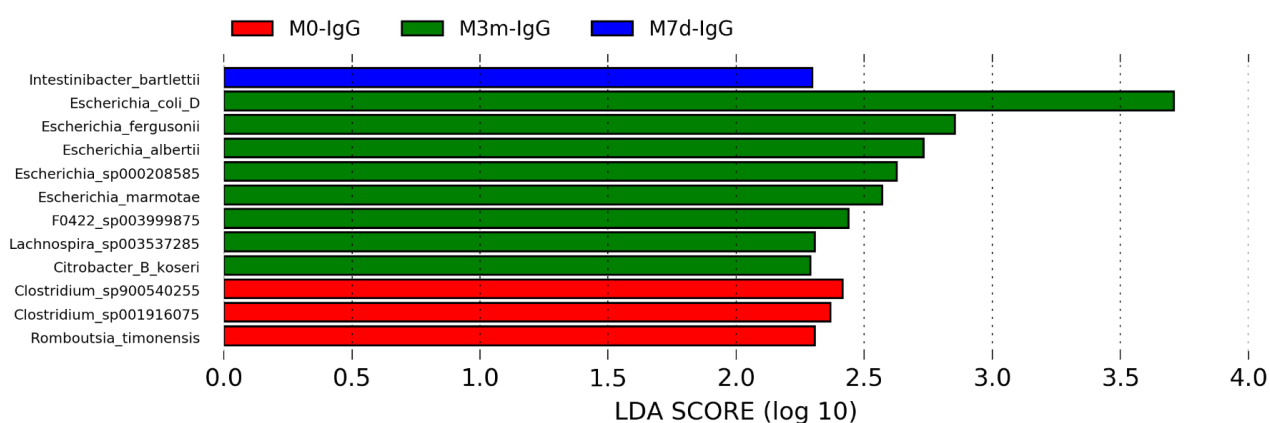
Lai noskaidrotu ar sIgA pārklāto baktēriju izmaiņas metformīna lietošanas laikā 2TD pacientos, iegūtie rezultāti par trīs laika posmiem tika salīdzināti visi pret visiem (*all against all*). Iegūtie rezultāti, kas redzami 10. attēlā, liecina, ka pirms metformīna terapijas uzsākšanas, būtiski vairāk ar sIgA tika pārklātas piecu sugu baktērijas, piemēram, *Citrobacter portucalensis*, nekā abos pārējos laika posmos. *Intestinibacter bartlettii* būtiski vairāk tika novērota septiņas dienas pēc terapijas uzsākšanas nekā pirms vai trīs mēnešus pēc terapijas sākuma. Bet vislielākās izmaiņas tika novērotas trīs mēnešus pēc terapijas sākuma, ar sIgA būtiski vairāk tika pārklātas 10 sugu baktērijas, starp tām esot *Escherichia fergusonii* un *Escherichia marmotae*.



10. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LEfSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas 2. tipa cukura diabēta pacientos. Tiek salīdzinātas ar sIgA pārklātas zarnu mikrobioma baktērijas (IgA) pirms metformīna lietošanas (M0), septiņas dienas (M7d) un trīs mēnešus (M3m) pēc terapijas uzsākšanas.

Figure 10. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LefSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in patients with type 2 diabetes mellitus. sIgA-coated gut microbiome bacteria (IgA) before metformin administration (M0), seven days (M7d) and three months (M3m) after initiation of therapy are compared.

Apskatot ar IgG pārklāto baktēriju īpatsvara izmaiņas metformīna lietošanas laikā 2TD pacientos, pirms metformīna terapijas tika novērotas trīs būtiski vairāk ar IgG pārklātas baktēriju sugas, piemēram, *Romboutsia timonensis*. *Intestinibacter bartlettii* būtiski vairāk tika novērota septiņas dienas pēc terapijas uzsākšanas nekā pirms vai trīs mēnešus pēc terapijas sākuma. Taču lietojot metformīnu trīs mēnešus, IgG frakcijā būtiski vairāk tika pārstāvētas astoņas baktēriju sugas, piecām no tām esot *Escherichia*. Šos rezultātus iespējams apskatīt 11. attēlā.



11. attēls. Lineārās diskriminantu analīzes (LDA) efekta lieluma LefSE salīdzinājuma grafiks, kas attēlo sugu relatīvās sastopamības būtiskās izmaiņas 2. tipa cukura diabēta pacientos. Tiek salīdzinātas ar IgG pārklātas zarnu mikrobioma baktērijas (IgG) pirms metformīna lietošanas (M0), septiņas dienas (M7d) un trīs mēnešus (M3m) pēc terapijas uzsākšanas.

Figure 11. Linear discriminant analysis (LDA) effect size LefSE comparison plot represents significant changes in species' relative abundance in patients with type 2 diabetes mellitus. IgG-coated gut microbiome bacteria (IgG) before metformin administration (M0), seven days (M7d) and three months (M3m) after initiation of therapy are compared.

Veicot salīdzinājumu starp frakcijām 2TD pacientu grupā, dažādos laika posmos tika novērotas vairākas būtiski izmainītas baktēriju sugas. Salīdzinot sIgA+ un nešķirotu baktēriju frakcijas, tika noteiktas 33 būtiskas izmaiņas, IgG+ un nešķirotu baktēriju salīdzinājumā noteica 36 nozīmīgas izmaiņas. Taču piektajā tabulā ir norādīti taksoni ar visbūtiskākajām izmaiņās- piecas būtiski vairāk un piecas būtiski mazāk pārstāvētas baktēriju sugas, salīdzinot

nešķirotu un šķirotu frakciju, pirms metformīna lietošanas. Starp sIgA un IgG frakcijām, netika novērota neviena būtiski izmainīta suga. Viss taksonu saraksts ir pieejams 1. pielikumā.

5. tabula.

Top 5 būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā pirms metformīna terapijas

Table 5.

Top 5 significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort before metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M0	Bacteroides thetaiotaomicron (↑) Alistipes putredinis (↑) Bacteroides xylanisolvens (↑) Bacteroides caccae (↑) Bacteroides ovatus (↑) Blautia A faecis (↓) Anaerobutyricum hallii (↓) Ralstonia pickettii (↓) Bradyrhizobium sp000015165 (↓) Caulobacter sp903900155 (↓)	Bacteroides thetaiotaomicron (↑) Alistipes putredinis (↑) Bacteroides xylanisolvens (↑) Bacteroides caccae (↑) Bacteroides ovatus (↑) Blautia A faecis (↓) Anaerobutyricum hallii (↓) Ralstonia pickettii (↓) Bradyrhizobium sp000015165 (↓) Caulobacter sp903900155 (↓)	-

M0 - pirms metformīna terapijas uzsākšanas / M0 - before metformin therapy.

Pēc tam tika veikts salīdzinājums starp frakcijām 2TD pacientu kohortā, bet nedēļu pēc metformīna terapijas uzsākšanas. Salīdzinot nešķirotu frakciju ar sIgA pārklāto frakciju, tika novērots 61 būtiski izmainīts taksons. Salīdzinot ar IgG frakciju, novēroja 70 būtiski atšķirīgi pārstāvētas sugas frakciju sastāvos. Starp sIgA un IgG frakcijām, netika novērots neviens būtiski izmainīts taksons. Piecas visvairāk izmainītās sugas, septiņas dienas pēc metformīna terapijas uzsākšanas 2TD pacientu grupā, ir uzskaitītas 6. tabulā. Pilns baktēriju taksonu saraksts ir apskatāms 2. pielikumā.

Top 5 būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā
septiņas dienas pēc metformīna terapijas uzsākšanas

Table 6.

Top 5 significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort seven
days after metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M7d	Phocaeicola dorei (↑) Bacteroides uniformis (↑) Faecalibacterium prausnitzii G (↑) Bacteroides thetaiotaomicron (↑) Alistipes putredinis (↑) Ralstonia pickettii (↓) Anaerostipes hadrus (↓) Blautia A faecis (↓) Anaerobutyricum hallii (↓) Ruminococcus C sp000980705 (↓)	Phocaeicola dorei (↑) Bacteroides uniformis (↑) Faecalibacterium prausnitzii G (↑) Bacteroides thetaiotaomicron (↑) Bacteroides xylanisolvens (↑) Ralstonia pickettii(↓) Anaerostipes hadrus(↓) Blautia A faecis(↓) Anaerobutyricum hallii(↓) UBA11524 sp000437595(↓)	-

M7d - vienu nedēļu pēc metformīna terapijas uzsākšanas / M7d- after one-week metformin therapy.

Tika veikts salīdzinājums 2TD pacientu kohortā arī trīs mēnešus pēc metformīna terapijas uzsākšanas. Salīdzinot nešķirotu frakciju ar sIgA pārklāto frakciju, tika novērots 41 būtiski izmainīts taksons. Salīdzinot ar IgG frakciju, novēroja 40 būtiski atšķirīgi pārstāvētas sugas frakciju sastāvos. Starp sIgA un IgG pārklātajām frakcijām netika novērota būtiska atšķirība. Piecas visvairāk izmainītas sugas ir redzamas 7. tabulā, taču viss taksonu saraksts ir apskatāms 3. pielikumā.

Top 5 būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā trīs mēnešus pēc metformīna terapijas uzsākšanas

Table 7.

Top 5 significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort three months after metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M3m	Phocaeicola dorei(↑) Alistipes onderdonkii(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Bacteroides ovatus(↑) Bacteroides xylanisolvens(↑) Ralstonia pickettii(↓) Blautia A faecis(↓) Bradyrhizobium sp000015165(↓) Caulobacter sp903900155(↓) Anaerobutyricum hallii(↓)	Phocaeicola dorei(↑) Dorea formicigenerans(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Bacteroides ovatus(↑) Bacteroides xylanisolvens(↑) Ralstonia pickettii(↓) Blautia A faecis(↓) Anaerobutyricum hatlii(↓) Caulobacter sp903900155(↓) Bradyrhizobium sp000015165(↓)	-

M3m - trīs mēnešus pēc metformīna terapijas uzsākšanas / M3m - after three months of metformin therapy.

4. DISKUSIJA

Otrā tipa cukura diabēta incidence joprojām turpina pieaugt, radot nozīmīgu slogu pasaules ekonomikai un dažās valstīs sasniedzot pat epidēmijas mērogu. Turklāt, novecojošās sabiedrības un dzīvesveida maiņas dēļ, tiek paredzēts arī turpmāks 2TD gadījuma skaita pieaugums (Tomic et al. 2022; Olokoba et al. 2012). Visplašāk pielietotā antidiabētiskā terapija 2TD ārstēšanā ir perorāla metformīna lietošana (Wang et al. 2017). Tomēr neskatoties uz tā seno vēsturi un plašiem pētījumiem, tā darbības mehānismi joprojām nav pilnībā noskaidroti (Prattichizzo et al. 2018). Turklāt pat 20 - 30% gadījumu tiek novērotas dažādas blaknes, kas saistītas ar kuņģa un zarnu traktu (Diabetes Prevention Program Research Group 2012). Neseni pētījumi ir parādījuši, ka metformīna lietošana ir saistīta ar sIgA līmeņa izmaiņām cilvēka zarnu traktā un pelēs ir tikusi novērota IgA producējošo imūnšūnu skaita pieaugums metformīna terapija ietekmē (Ustinova et al. 2019; Luck et al. 2019). Tādējādi norādot uz jaunu, iespējamu darbības mehānismu novērotajām mikrobioma izmaiņām un mikrobioma modulēto terapijas efektivitāti.

Maģistra darba ietvaros tika iesaistīti 40 jaundiagnosticēti 2TD pacienti un 10 veseli indivīdi, kuri uzsāka metformīna terapiju. Izvēloties indivīdus pētījumam, tika ņemts vērā dzimuma sadalījums, kā redzams 4. tabulā, grupās tas ir līdzvērtīgi sadalīts. 2TD pacientu izvēlē, tika ņemts vērā arī HbA1c sliekšnis - tika izvēlēti pacienti, kuru glikētā hemoglobīna līmenis bija >7 mmol/l. Tomēr visa pārējā fenotipiskā informācija par pacientiem starp grupām būtiski atšķīrās. ĶMI un glikētā hemoglobīna gadījumā, atšķirības starp grupām ir skaidrojamas ar slimības faktu, jo 2TD gadījumā glikētā hemoglobīna līmenis ir paaugstināts un pacientiem bieži tiek novērots liekais svars (Westman 2021; Leitner et al. 2017). Tomēr jāņem vērā iesaistīto indivīdu vecuma atšķirība, 2TD pacientu mediānais vecums bija 57,5 un veselo indivīdu - 24. Šī atšķirība skaidrojama ar to, ka ar 2TD biežāk saslimst pārsniedzot 45 gadu vecumu, tomēr mums pieejamie paraugi veselo indivīdu kohortā bija no jaunākiem indivīdiem (Centers for Disease Control and Prevention 2022). Tas ir skaidrojams ar to, ka sasniedzot lielāku vecumu, vispārīgi kļūst relatīvi mazāk veseli indivīdi.

Ievāktajos fēču paraugos sākotnēji tika noteikta sIgA koncentrācija, izmantojot ELISA, šie rezultāti ir attēloti 4. attēlā. Rezultātos ir vērojama sIgA paaugstināšanās tendence abās pētījuma grupās (2TD un veseli), metformīna terapijas ietekmē, tomēr šie rezultāti nerasniedza statistiskā būtiskuma līmeni. Jāmin tas, ka 2TD pacientu grupā vispārīgi sIgA līmenis tika novērots augstāks nekā veselo kohortā, tomēr neuzrādīja statistiski būtiskas atšķirības. Taču jāņem vērā salīdzinoši nelielais indivīdu skaits kā arī salīdzinoši garais novērošanas periods 2TD grupā, kurā varēja rasties citi, nekontrolēti faktori ar ietekmi uz sIgA līmeni. Jāpiemin arī tas, ka starp 2TD pacientiem tika novērota lielāka rezultātu variācija

ar vairākām ekstrēmām vērtībām. Jāmin tas, ka cita pētījuma autori tomēr ir novērojuši būtiski zemāku sIgA līmeni 2TD grupā, pie tam secinot, ka metformīns spēj novērst, augsta tauku satura diētas ierosinātu, sIgA samazinājumu (Luck et al. 2019).

Uzsākot baktēriju šķirošanu pa frakcijām, tika izlemts apskatīt un salīdzināt arī IgG pārklāto baktēriju izmaiņas 2TD pacientos, metformīna lietošanas ietekmē. Šāds lēmums tika pieņemts, balstoties uz citu pētījumu rezultātiem, kas pierāda gļotādas IgG saistību ar iekaisuma procesiem zarnās, piemēram, iepriekš ir ticis aprakstīts tas, kā tiek izmainīta IgG saistīšanās pie zarnu trakta baktērijām iekaisīgo zarnu slimības (IBD) pacientiem. Šajā pētījumā tika parādīts tas, ka IBD pacientos IgG būtiski vairāk saista *Streptococcus*, *Lactobacillus* un *Lactococcus* ģints baktērijas (Bourgonje et al. 2022). Citā pētījumā, IBD pacientu kohortā, tika novērots būtiski lielāks sIgA un IgG pārklāto baktēriju skaits, kas vienlaicīgi korelēja ar slimības aktivitāti (Lin et al. 2018). Cik šobrīd zināms, šādi pētījumi 2TD pacientos nav veikti un, zinot to, ka pacientiem lietojot metformīnu bieži tiek novērotas kuņģa un zarnu trakta komplikācijas, tas ieinteresēja maģistra darbā apskatīt arī IgG baktēriju pārklāšanos metformīna ietekmē.

Lai vispārīgi raksturotu paraugus, tika novērtēta to dažādība, izmantojot alfa daudzveidību. Alfa daudzveidība raksturo paraugu iekšējo daudzveidību, jeb cik dažāds ir taksonomiskais sastāvs paraugā. Apskatot 5. attēla violīn-grafiku, ir redzams, ka visās šķīrotajās frakcijās paraugu iekšējā daudzveidība ir zemāka nekā vēl nešķīrotos paraugos. Turklāt tas ir novērojams gan pirms, gan pēc metformīna lietošanas. Šāds rezultāts būtu skaidrojams ar to, ka imūnglobulīni vienlīdzīgi nesaista pilnīgi visas baktērijas jeb mijiedarbojas tikai ar daļu no kopējās mikrobiotas, tādēļ nešķīrotās frakcijās ir novērojams lielāks taksonomiskais sastāvs (Bunker & Bendelac 2018).

Iegūtie rezultāti tika attēloti ar LEfSE grafikiem, tādējādi veidojot salīdzinājumus gan longitudināli metformīna lietošanas laikā, gan starp frakcijām. Sākotnēji tika apskatīta kontroles grupa metformīna terapijas ietekmē un tika novērots vienas sugas būtisks pieaugums un vienas kritums nešķīrotajās frakcijās. Kā redzams 6. attēlā, metformīna ietekmē būtiski vairāk tika novērota *Agathobaculum butyriciproducens* sugas baktērija, bet būtiski mazāk *Rombutsia timonensis*. Iepriekš *Agathobaculum butyriciproducens* ir tikusi aprakstīta saistībā ar neiroprotektīvām īpašībām, tomēr līdz šim saistība ar metformīnu nav novērota (Lee et al. 2022). Iepriekš ir ticis aprakstīts, ka *Rombutsia timonensis* sugas baktērijas būtiski samazinās diabēta pacientos, tādēļ interesanti ir to novērot veselo indivīdu starpā (Kwan et al. 2022). Tas liecina par to, ka šīs sugas baktērijas daļēji varētu ietekmēt arī metformīna lietošana, ne tikai slimības stāvoklis.

Salīdzinājums kā metformīna lietošana ietekmē sIgA baktēriju pārklāšanos veselos indivīdos, ir novērojams 7. attēlā. Pēc nedēļu ilgas metformīna lietošanas, zarnu mikrobiomā ir novērojams piecu sugu būtisks pieaugums un sešu sugu būtisks samazinājums ar sIgA pārklātajā frakcijā. Rezultātos ir redzams, ka četras no piecām sugām ir dažādas *Escherichia* ģints baktērijas, piemēram, *Escherichia fergusonii* un *Escherichia albertii*. Abas šīs baktērijas var uzskatīt par potenciāliem cilvēku patogēniem, piemēram, *E. fergusonii* iepriekš ir tikusi aprakstīta kā rets, oportūnistisks patogēns, jo tā ir tikusi izdalīta rētu un urīnceļu iekaisumu, caurejas, bakterēmijas u.c. gadījumos, tomēr iepriekš par to bija zināms saistībā ar vides paraugiem (Zang et al. 2023). *E. albertii* ir aprakstīta kā jauns cilvēku un vairāku putnu sugu enteropatogēns, kas izraisa gastroenterītu uzliesmojumus, turklāt daži celmi producē Šiga toksīnu. Un par spīti tam, ka šī suga ir vairāk aprakstīta, arī *E. albertii* klīniskā nozīme šobrīd nav līdz galam skaidra (Gomes et al. 2020). Vienīgā *Bacteroides* ģints baktērija, kura būtiski vairāk tika novērota sIgA frakcijā veselos indivīdos, metformīna lietošanas laikā, ir *Bacteroides caccae*. Turklāt iepriekš ir ticis aprakstīts būtisks *B. caccae* pieaugums metformīna lietošanas laikā, no pelēm iegūtos fēču paraugos (Silamiķele et al. 2021). Tas varētu liecināt, ka šīs taksonomiskās izmaiņas ir veicinājis metformīns, nevis palielināta sIgA saistīšanās. Tomēr nešķirot frakciju salīdzinājumā netika novērotas šīs sugas izmaiņas, apstiprinot, ka tās īpatsvars metformīna lietošanas laikā nav būtiski pieaudzis, tomēr tā ir būtiski vairāk aplāta ar sIgA. Vislielāko samazinājumu sIgA+ frakcijā uzrādīja *Anaerostipes hadrus*, citos pētījumos ir atrodami secinājumi, ka šīs sugas baktērija ir negatīvi asociēta ar 2TD pacientiem, kuri lieto metformīnu, salīdzinot terapiju uzsākušus un neuzsākušus pacientus (Balvers et al. 2021). Citas mazāk pārstāvētās baktērijas bija, piemēram, *Collinsella sp900553705* un *Clostridium sp001916075*. Informācija par šiem taksoniem nebija pieejama, tomēr vispārīgi iepriekš ir tikusi aprakstīta *Clostridium* ģints īpatsvara samazinājums pēc metformīna lietošanas (Lee et al. 2021). Savukārt paaugstināts *Collinsella* ģints baktērijas īpatsvars ir asociēts ar 2TD un veselos indivīdos ir novērota saistība ar paaugstinātu vispārējo un zema blīvuma holesterīna līmeni (Frost et al. 2019).

Informācija par izmaiņām IgG+ frakcijā, metformīna lietošanas laikā veselos indivīdos, ir pieejama 8. attēlā. Pēc nedēļu ilgas terapijas, būtisks īpatsvara pieaugums tik novērots tikai vienai baktērijai - *Lachnospira sp900316325*. Šīs ģints baktērijas tiek raksturotas kā labvēlīgas cilvēka organismam, tomēr to īpatsvara pieaugums ir ticis asociēts ar metaboliskām saslimšanām (Palmas et al. 2021). Samazinājums tiks novērots: *UBA1191 sp900549125* un *Romboutsia timonensis* taksonos. Informācija par *UBA1191 sp900549125* pagaidām vēl nav atrodama, taču tāpat kā nešķirotajos paraugos, metformīna ietekmē arī IgG+ frakcijā tika novērota *Romboutsia timonensis* īpatsvara samazināšanās. Tas vēl vairāk uzsver

iespēju, ka 2TD pacientos, šī baktērija iepriekš ir tikusi novērota mazākā īpatsvarā, metformīna ietekmes dēļ (Kwan et al. 2022).

Tālāk tika apskatītas metformīna ierosinātās izmaiņas 2TD pacientu starpā. Sākotnēji tika salīdzināts kā izmaiņas taksonu īpatsvars nešķīrotās baktērijās, lai būtu iespējams secināt, kādas izmaiņas ierosina tikai metformīns, bez imūnglobulīnu iesaistes. Un kā redzams 9. attēlā, metformīna ietekmē tika novērota trīs *Escherichia* ģints baktēriju pieaugums. Šo pašu taksonu pieaugums tika novērots sIgA+ frakcijā veselajos indivīdos, turklāt to pieaugums bija visnozīmīgākais attiecīgajā salīdzinājumā (7. attēls). Tomēr šis nav pārsteidzošs rezultāts, jo literatūrā pieejamā informācija liecina, ka arī oportūnistiskā patogēna *Escherichia spp.* īpatsvara pieaugums metformīna lietošanas ietekmē ir novērots vairākos pētījumos (Forslund et al. 2015; Wu et al. 2017).

Iegūtie rezultāti par sIgA+ frakcijas izmainītajiem taksoniem 2TD pacientos, uzrādīja vairākas būtiskas izmaiņas. Kā redzams 10. attēlā, metformīna lietošanas ietekmē samazinājās piecu taksonu īpatsvars, M7d laika punktā tika novērots vienas sugas būtisks pieaugums, taču salīdzinājuma beigās būtiski vairāk tika novēroti desmit taksoni. Apskatot baktērijas, kuru īpatsvars samazinājās metformīna lietošanas laikā, ir iespējams novērot, ka šī salīdzinājuma rezultāti sakrīt ar iepriekšējiem rezultātiem, piemēram, *Rombutsia timonensis* samazinājums tika novērots arī veselajos indivīdos gan nešķīrotā, gan IgG+ frakcijā. *Clostridium* taksoni mazāk bija novērojami arī sIgA+ frakcijā veselajos indivīdos pēc metformīna lietošanas. Taču visbūtiskāko izmaiņu uzrādīja *Citrobacter portucalensis*, kas iepriekš ir tikusi aprakstīta kā vairāku antibiotiku rezistenta baktērija (Sellera et al. 2022). Interesanti, ka M7d periodā varēja novērot būtisku *Intestinibacter bartlettii* pieaugumu, taču ilgākā M3m periodā to vairs nenovēroja. To ir vērts pieminēt arī tādēļ, ka vairāki pētījumi ir aprakstījuši to, ka šīs sugas īpatsvars samazinās metformīna lietošanas ietekmē (Mueller et al. 2021). Tas varētu liecināt, ka sIgA pastiprināti saista *Intestinibacter bartlettii* metformīna lietošanas ietekmē, tādēļ šīs baktērijas īpatsvars ilgtermiņā sāk kristies. Tomēr pagaidām šāda informācija nav pieejama, kas varētu apstiprināt vai noliegt šādu metformīna efektu. Ilgtermiņā lielākoties novēroja vairāku *Escherichia* taksonu pieaugumu, tāpat tika novērots atkārtots *Lachnospira* ģints baktērijas pieaugums. Starp unikālām izmaiņām var minēt, piemēram, *Enterococcus faecalis*, ir zināms ka tā ir plaši sastopama komensāla, zarnu traktā sastopama baktērija, tomēr tai ir aprakstīti vairāki celmi, kuri ir rezistenti pret antibiotikām (Van Tyne et al. 2013). Papildus izmainītas tika arī *Citrobacter B koseri* un *Lactococcus lactis E* baktēriju sugas. Literatūrā pieejamā informācija liecina, ka ir novērots *C. koseri* īpatsvara pieaugums metformīna lietošanas ietekmē (35600606). Taču kā tika novērots pēc 9. attēla pieejamās informācijas, pieaugums tikai metformīna ietekmē nebija statistiski būtisks, tas liecina arī par paaugstinātu

sIgA saistīšanu. Interesanti, ka iepriekš *E. faecali* un *L. lactis* pieaugums, metformīna lietošanas ietekmē, ir novērots pacientu grupā, kuriem metformīna lietošana uzrādīja labu rezultātus, salīdzinot ar pacientiem, kuriem šīs zāles bija neefektīvas (Elbere et al. 2020).

Tālāk tika apskatīti IgG+ frakcijā iegūtie rezultāti 2TD pacientu kohortā, kas redzami 11. attēlā. Šajā frakcijā tika novēroti trīs taksoni, kuri metformīna lietošanas ietekmē samazinājās. Un ir redzams, ka zemāks baktēriju īpatsvars tika novērots tajos pašo taksonos kā sIgA+ frakcijā: *Clostridium sp001916075*, *Clostridium sp900540255* un *Romboutsia timonensis*. *Intestinibacter bartlettii* pieaugumu M7d laika periodā tika novērots arī IgG+ frakcijā, un vēlāk sekoja šīs sugas īpatsvara kritums, tieši tāpat kā varēja novērot sIgA+ frakcijā. Tas akcentē metformīna iespējamo saistību ar pastiprinātu imūnglobulīnu saistīšanos pie šīs baktērijas īstermiņā. Ilgākā laika periodā - M3m - varēja novērot astoņas būtiski vairāk sastopamas sugas IgG+ frakcijā diabēta pacientos. Interesanti, ka pilnīgi visi taksoni tika novēroti arī sIgA+ frakcijā, kas liecina par imūnglobulīnu kopīgām mērķa baktērijām. Tomēr šajā frakcijā netika novērots ne *E. faecali*, ne *L. lactis* pieaugums, kuri tika novēroti sIgA+ grupā.

Lai novērtētu kādas baktēriju sugas vispārīgi saista imūnglobulīni, iegūtās frakcijas tika savstarpēji salīdzinātas vienā laikā posmā. Tādējādi novērtējot tikai imūnglobulīnu saistīšanās izmaiņas, jo metformīns ietekmēja arī nešķirotu frakciju, pret ko tika veikts salīdzinājums. Sākotnēji tika apskatīti būtiski ietekmētie taksoni 2TD pacientu grupā pirms metformīna lietošanas. Kopumā atšķīrās 33 taksoni sIgA+ un nešķirotu baktēriju salīdzinājumā, un 35 taksoni salīdzinot IgG+ un nešķirotas baktērijas. Taču 5. tabulā ir pieejams saraksts ar piecām būtiski vairāk un piecām būtiski mazāk sastopamām baktēriju sugām attiecīgajos salīdzinājumos. Salīdzinot abas frakcijas pret nešķirotajām baktērijām, tika novēroti vienādi taksoni, pat tajā pašā būtiskuma secībā. Respektīvi, visvairāk ar sIgA un IgG tika saistīta *Bacteroides thetaiotaomicron* sugas baktērija, tam sekoja *Alistipes putredinis*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides caccae* un *Bacteroides ovatus*. *Bacteroides thetaiotaomicron* ir vairākkārt tikusi aprakstīta saistībā ar sIgA saistīšanos, piemēram, vienā no pētījumiem tiek spekulēts, ka šī baktērija ar sIgA varētu saistīties nekanoniski, ar glikānu starpniecību, tomēr ir vēl citi pētījumi, kuros ir aprakstīti uz sIgA balstīti regulējošie mehānismi saistībā ar šo sugu (Pabst & Slack 2020; Peterson et al. 2015; 31690674). Tomēr literatūra par IgG saistību ar *Bacteroides thetaiotaomicron* ir ierobežota. Tāpat netika atrasta informācija par *Alistipes putredinis* saistību ar imūnglobulīniem, tomēr ir aprakstīts, ka *Bacteroides ovatus* izraisa spēcīgu sIgA atbildi cilvēkos (León & Francino 2022). Ņemot vērā, ka četras no piecām visvairāk pārstāvētajām baktērijām gan sIgA+, gan IgG+ frakcijās ir *Bacteroides* ģints baktērijas, tas varētu liecināt, ka šī ģints izraisa spēcīgu sIgA un IgG atbildi,

turklāt pētījumos iepriekš ir ticis aprakstīts tas, ka *Bacteroides* izraisa spēcīgu sIgA atbildi (León & Francino 2022; Sterlin et al. 2020).

Taksoni, kuru īpatsvars bija mazāk sastopams sIgA+ un IgG+ frakcijās, salīdzinot ar kopējo mikrobiomu ir *Blautia A faecis*, *Anaerobutyricum hallii*, *Ralstonia pickettii*, *Bradyrhizobium sp000015165* un *Caulobacter sp903900155*, kas liecina par vāju imūnglobulīnu atbildi. Tomēr jāmin, ka *Bradyrhizobium* iepriekš ir aprakstīta kā kontaminants, atrodams DNS izolēšanas reaģentu komplektos un īpaši tīrā ūdens attīrīšanas sistēmās, turklāt tas tika konstatēts arī aptuveni pusē no norādītajā publikācijā apskatītajiem sekvenčēšanas rezultātiem (Laurence et al. 2014). Savstarpēji tika salīdzinātas arī sIgA+ un IgG+ frakcijas, bet netika novērots neviens statistiski nozīmīgs rezultāts, kas liecina par līdzīgām sIgA un IgG mērķa baktērijām.

Starp frakcijām tika veikts tāds pats salīdzinājums 2. tipa cukura diabēta pacientu grupā arī pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas. Ņemot vērā šos rezultātus, ir iespējams sākt spriest par iespējamo metformīna efektu uz imūnglobulīnu saistīšanu. Kopumā tika novērots 61 būtiski atšķirīgs taksons, salīdzinot sIgA+ un nešķirotu frakciju, bet IgG un nešķirotu baktēriju salīdzinājumā, tika novērotas 70 būtiskas izmaiņas. Sestajā tabulā ir iespējams apskatīt piecus taksonus, kuru īpatsvars ir visvairāk pieaudzis un visvairāk samazinājies, salīdzinot attiecīgās frakcijas. Ir iespējams novērot, ka taksoni starp salīdzinājumiem pārklājas, tomēr metformīna lietošanas ietekmē ir novērojamas jaunas baktēriju sugas, kuras ir tikušas būtiski vairāk saistītas gan ar sIgA, gan IgG, piemēram, *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides uniformis* un *Faecalibacterium prausnitzii* G. Ir ticis aprakstīts, ka *Phocaeicola dorei* (iepriekš *Bacteroides dorei*) īpatsvara pieaugumu īstermiņā izraisa metformīna lietošana (Robeson et al. 2022). Ir tikusi aprakstīta arī *Faecalibacterium prausnitzii* mijiedarbība ar metformīnu, tā lietošanas ietekmē ir novērots taksona īpatsvara samazinājums peļu modeļos, taču iepriekš ir minēts *Faecalibacterium prausnitzii* īpatsvara pieaugums sIgA+ frakcijā starp čūlainā kolīta un krona slimības pacientiem (Huang et al. 2022; Silamiķele et al. 2021). Savukārt tas, ka starp pieciem taksoniem, kuru īpatsvars ir visvairāk pieaudzis, tika novērotas trīs *Bacteroides* ģints baktērijas, tikai liecina par iepriekš izteikto faktu, ka šīs ģints baktērija izraisa spēcīgu sIgA atbildi. Turklāt mūsu rezultāti liecina arī par spēcīgu IgG atbildes reakciju (León & Francino 2022; Sterlin et al. 2020).

Taksoni, kuru īpatsvara zudums tika novērtēts kā visbūtiskākais, gan sIgA+, gan IgG+ frakcijās 2TD pacientu kohortā, savstarpēji pārklājās - četras no piecām baktēriju sugām abās grupās bija vienādas. Turklāt, arī pirms metformīna lietošanas, tika novērots, ka imūnglobulīniem ir vāja reakcija uz *Ralstonia pickettii*, *Blautia A faecis* un *Anaerobutyricum hallii* sugu baktērijām, tāpat kā pēc nedēļu ilgas metformīna terapijas. Tomēr iepriekš netika

novērota *Anaerostipes hadrus* sugas baktērija, kura gan sIgA+, gan IgG+ salīdzinājumā ar nešķīrotajām baktērijām uzrāda otru būtiskāko atšķirību. Tomēr literatūrā ir pieejama informācija, ka šīs sugas īpatsvara samazinājums iepriekš ir ticis novērots 2TD pacientos, kuri lietoja metformīnu (Balvers et al. 2021). Vērts pieminēt, ka arī pēc nedēļu ilgas metformīna lietošanas netika novērota neviena būtiska izmaiņa, savstarpēji salīdzinot sIgA+ un IgG+ frakcijas.

Protams, tālāk bija interesanti noteikt izmaiņas, kas radušās pēc trīs mēnešu ilgas metformīna terapijas. Kopsummā tika novērotas 40 statistiski būtiskas atšķirības sIgA+ un nešķīroto baktēriju salīdzinājumā, kā arī 41 atšķirība, salīdzinot IgG+ ar nešķīrotajām baktērijām. Tomēr arī 7. tabulā ir ievietota informācija tikai par piecām būtiski vairāk un piecām būtiski mazāk sastopamām baktēriju sugām attiecīgajos salīdzinājumos. Apskatot iegūtos rezultātus, ir redzams ka rezultāti lielākoties starp salīdzinājumiem atkal pārklājas. Baktēriju taksoni, kuru īpatsvars ir būtiski mazāks šķīrotajās frakcijās, ir tie paši kas tik novēroti jau iepriekš. Liecinot par to, ka imūnglobulīniem ir vāja reakcija uz šīm baktērijām, visticamāk neatkarīgi no metformīna lietošanas.

Pievēršot uzmanību taksoniem, kuri tika visvairāk aplāti ar imūnglobulīniem, rezultāti ir līdzīgi. Lai gan ir zināms, ka IgG tiek producēts mazākā apjomā, jo tā producēšanu aktivē dažādu patogēnu antigēnu klātbūtne, vai tas nonāk zarnu lūmenā iekaisuma dēļ. Tomēr ir zināms, ka IgG pastiprinātu produkciju ierosina arī cukura diabēts, tādēļ, iespējams, baktērijas, kuru īpatsvars ir audzis 2TD ietekmē, tiek saistītas gan ar sIgA, gan IgG (León & Francino 2022; DuPont et al. 2022). Visbūtiskāk metformīna terapijas ietekmē tika izmainīta *Phocaeicola dorei*, tāpat kā pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas. Nozīmīgas izmaiņas tika novērotas arī *Parabacteroides distasonis* sugas baktērijai. Interesanti, ka pētījumos ir izteiks *Parabacteroides distasonis* sugas protektīvais efekts pret dažādām slimībām, ieskaitot 2TD, un pat tiek apsvērta šīs baktēriju sugas probiotiku potenciāls, lai uzlabotu gremošanas trakta darbību (Ezeji et al. 2021; Wu 2023). Tomēr ir pētījumi, kas ar saviem eksperimentālajiem datiem uzrāda pretrunīgus rezultātus, parādot šīs baktērijas potenciāli patogēno dabu (Ezeji et al. 2021). Turklāt agrāk ir ticis novērots šīs sugas īpatsvara kritums metformīna lietošanas ietekmē, tādēļ interesanti ir novērot šīs sugas būtisko pieaugumu gan sIgA+, gan IgG+ frakcijās (Elbere et al. 2020). M3m laika punktā, starp nozīmīgākajām baktērijām, parādījās jaunas sugas, kuras netika novērotas iepriekš, turklāt abiem salīdzinājumiem atšķirīgas. sIgA+ un nešķīroto baktēriju salīdzinājumā tika novērots būtisks *Alistipes onderdonkii* pieaugums, bet IgG+ un nešķīroto baktēriju salīdzinājumā - *Dorea formicigenerans*. Arī informācija, kas ir pieejama par *Alistipes onderdonkii* taksonu ir pretrunīga, tā ir aprakstīta ar potenciāli protektīvu efektu dažādām slimībām, piemēram,

kolītam vai kardiovaskulārām saslimšanām. Tajā pašā laikā, ir pieejama informācija par *Alistipes* patogēno potenciālu kolorektālā vēža gadījumā, kā arī ir tikusi aprakstīta saistība ar depresijas pazīmēm (Parker et al. 2020). 2TD pacientos šīs baktērija ir tikusi aprakstīta kā iekaisuma marķieris (Sugawara et al. 2022). Iepriekš ir ticis novērots baktērijas *Dorea formicigenerans* īpatsvara pieaugums sIgA+ frakcijā čūlainā kolīta un iekaisīgo zarnu slimības pacientos (Brand et al. 2020). Taču interesanti, ka metformīna lietošanas ietekmē ir novērots šīs sugas īpatsvara kritums gan cilvēkos, gan peļu modeļos (Silamiķele et al. 2021; Le Bastard et al. 2018).

Svarīgi ir pieminēt, ka visi dati būtu vieglāk interpretējami, ja kā šūnu šķirošanas metode būtu izvēlēta fluorescenti aktivētā šūnu šķirošana ar plūsmas citometru. Tādējādi tiktu iegūtas sIgA+, IgG+ un sIgA-, IgG- frakcijas, tās savstarpēji būtu vieglāk salīdzināmas un varētu droši apgalvot, ka baktērijas ir vai attiecīgi nav saistītas ar imūnglobulīnu. Šajā darbā tika izmantota alternatīva, uz magnētiskām lodītēm balstīta, šūnu šķirošanas metode. Nākotnē būtu noderīgi atkārtot šo pētījumu ar fluorescenti aktivēto šūnu šķirošanu ar plūsmas citometru, lai salīdzinātu iegūtos rezultātus. Tas ļautu vairāk spriest par magnētisko lodīšu šķirošanas metodes efektivitāti, un iespējams to varētu izmantot kā alternatīvu biežāk. Pētījumā noderīgi ir integrēt metatranskriptoma rezultātus, lai varētu spriest ne tikai par taksonomiskām, bet arī par funkcionālām signālceļu izmaiņām. Tas dotu pilnvērtīgāku ieskatu tam, kā metformīns ietekmē baktērijas un to imūnglobulīnu piesaisti. Šobrīd maģistra darbā iegūties dati tiek izmantoti publikācijas manuskripta sagatavošanai, šie dati tiks papildināti arī ar metatranskriptoma analīzes rezultātiem, ļaujot iegūt plašāku ieskatu metformīna darbības rezultātos. Nākotnē līdzīgu pētījumu varētu veikt izmantojot informāciju par terapijas efektivitāti, tiktu izmantotas grupas ar efektīvu un neefektīvu metformīna terapiju. Tādējādi varētu salīdzināt imūnglobulīnu saistīšanās izmaiņas, ņemot vērā faktu par terapijas efektivitāti un mēģināt noteikt konkrētus taksonus, kuri nākotnē varētu kalpot kā biomarķieri terapijas efektivitātei.

SECINĀJUMI

1. Uz magnētiskajām lodītēm balstīta baktēriju šķirošana ir piemērota metode antivielu saistošo taksonomisko grupu noskaidrošanai, tomēr nesniedz informāciju par antivielu nesaistošo frakciju.
2. Starp salīdzināto frakciju iekšējās daudzveidības rādītājiem netika novērota būtiska atšķirība. Tomēr šķirotajās frakcijās novēroja samazinātu daudzveidību, kas liecina, ka sIgA un IgG saista tikai daļu no baktērijām.
3. Metformīna lietošanas ietekmē tika novērota *Escherichia fergusonii*, *E. marmotae*, *E. albertii*, *E. coli* u.c. baktēriju īpatsvara pieaugums gan 2TD pacientos, gan veselos indivīdos, izceļot metformīna būtisko ietekmi uz *Escherichia* ģints pārstāvjiem.
4. *Intestinibacter bartletti* īpatsvars pēc nedēļu ilgas metformīna lietošanas 2TD pacientiem bija būtiski pieaudzis gan sIgA+, gan IgG+ frakcijās. Pēc 3 mēnešu ilgas terapijas, baktēriju īpatsvars nebija būtiski mainījies, kas liecina par iespējamām metformīna īstermiņa efektiem.
5. *Bacteroides* ģints baktērijas tika būtiski vairāk saistītas ar imūnglobulīniem, pierādot spēcīgu humorālās imunitātes atbildi cilvēkā pret šīs ģints baktērijām.
6. Starp sIgA+ un IgG+ frakcijām longitudināli tika uzrādīti līdzīgi rezultāti un, tās salīdzinot savstarpēji, nenovēroja būtiskas atšķirības, kas liecina par līdzīgām mērķa baktērijām metformīna lietošanas ietekmē.
7. *Phocaeicola dorei* suga uzrādīja visbūtiskāko īpatsvara pieaugumu gan sIgA+, gan IgG+ frakcijās pēc metformīna lietošanas abos laika punktos, tas varētu liecināt par metformīna ietekmē izmainītu sIgA un IgG piesaisti.

KONFERENČU TĒZES

Gut Microbiota for Health World Summit 2023: “Interaction of secretory IgA, IgG, and gut microbiome profile during metformin therapy”. L. Birzniece, J. Purina, L. Ansonē, M. Duka, I. Atava, A. Voronova, I. Elbere, M. Briviba, J. Klovins.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt lielu pateicību maģistra darba vadītājām Dr.biol. Ilzei Elberei un Dr.biol. Montai Brīvībai, kuras pat savas prombūtnes laikā atrada iespēju palīdzēt darba izstrādē. Liels paldies zinātniskās grupas vadītājam Dr.biol. Jānim Kloviņam par iespēju izstrādāt maģistra darbu cilvēka ģenētikas un molekulārās medicīnas grupā. Kā arī vēlos pateikties Dr.biol. Artūram Ābolam par šī darba recenzēšanu.

Paldies Dr.biol Nilam Rostokam par neatkārtojamo iespēju izstrādāt darbu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā zinošu un aizrautīgu kolēģu sabiedrībā.

Protams, izsaku lielu pateicību pārējiem kolēģiem gan zinātniskajā grupā, gan Genoma centrā, it sevišķi Dr.biol. Ivaram Silamiķelim par sekvencēšanas datu pirmapstrādi un Mg.biol. Laurai Ansonei par konsultēšanu un padomiem.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), 237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bailey, C. J., & Day, C. (2004). Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*, 21(3), 115–117. <https://doi.org/10.1002/pdi.606>
- Balvers, M., Deschasaux, M., van den Born, B. J., Zwinderman, K., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2021). Analyzing Type 2 Diabetes Associations with the Gut Microbiome in Individuals from Two Ethnic Backgrounds Living in the Same Geographic Area. *Nutrients*, 13(9), 3289. <https://doi.org/10.3390/nu13093289>
- Banday, M. Z., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna journal of medicine*, 10(4), 174–188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20
- Barnett R. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 391(10117), 195. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30024-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30024-2)
- Boes M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular immunology*, 37(18), 1141–1149. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00025-6](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00025-6)
- Bourgonje, A. R., Roo-Brand, G., Lisotto, P., Sadaghian Sadabad, M., Reitsema, R. D., de Goffau, M. C., Faber, K. N., Dijkstra, G., & Harmsen, H. J. M. (2022). Patients With Inflammatory Bowel Disease Show IgG Immune Responses Towards Specific Intestinal Bacterial Genera. *Frontiers in immunology*, 13, 842911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842911>
- Brand, E., Laenen, Y., van Wijk, F., de Zoete, M., Oldenburg, B. (2020) On behalf of the Dutch TWIN-IBD Consortium, OP10 IgA coating of intestinal microbiota is associated with inflammatory bowel disease in twin pairs discordant for inflammatory bowel disease, *Journal of Crohn's and Colitis*, 14, S1, S010–S011, <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz203.009>
- Brown, E. L., Essigmann, H. T., Hoffman, K. L., Palm, N. W., Gunter, S. M., Sederstrom, J. M., Petrosino, J. F., Jun, G., Aguilar, D., Perkison, W. B., Hanis, C. L., & DuPont, H. L. (2020). Impact of Diabetes on the Gut and Salivary IgA Microbiomes. *Infection and immunity*, 88(12), e00301-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00301-20>
- Bunker, J. J., & Bendelac, A. (2018). IgA Responses to Microbiota. *Immunity*, 49(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011>
- Campbell, J. M., Bellman, S. M., Stephenson, M. D., & Lisy, K. (2017). Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing research reviews*, 40, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.003>
- Centers for Disease Control and Prevention, 2022. <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/type2.html>
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports*, 6, 23129. <https://doi.org/10.1038/srep23129>

D'Alessio D. (2011). The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*, 13 Suppl 1, 126–132. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01449.x>

Damelang, T., Rogerson, S. J., Kent, S. J., & Chung, A. W. (2019). Role of IgG3 in Infectious Diseases. *Trends in immunology*, 40(3), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.005>

de la Cuesta-Zuluaga, J., Mueller, N. T., Corrales-Agudelo, V., Velásquez-Mejía, E. P., Carmona, J. A., Abad, J. M., & Escobar, J. S. (2017). Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading Akkermansia muciniphila and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes care*, 40(1), 54–62. <https://doi.org/10.2337/dc16-1324>

Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., & Verma, A. K. (2020). Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of microbiology*, 202(8), 2147–2167. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>

de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71(5), 1020–1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789>

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>

Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler, W. C., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Christophi, C. A., Hoffman, H. J., Brenneman, A. T., Brown-Friday, J. O., Goldberg, R., Venditti, E., & Nathan, D. M. (2009). 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet (London, England)*, 374(9702), 1677–1686. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61457-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61457-4)

Diabetes Prevention Program Research Group (2012). Long-term safety, tolerability, and weight loss associated with metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes care*, 35(4), 731–737. <https://doi.org/10.2337/dc11-1299>

DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)

DuPont, H. L., Jiang, Z. D., Alexander, A. S., DuPont, A. W., & Brown, E. L. (2022). Intestinal IgA-Coated Bacteria in Healthy- and Altered-Microbiomes (Dysbiosis) and Predictive Value in Successful Fecal Microbiota Transplantation. *Microorganisms*, 11(1), 93. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010093>

Durack, J., & Lynch, S. V. (2019). The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *The Journal of experimental medicine*, 216(1), 20–40. <https://doi.org/10.1084/jem.20180448>

Elbere, I., Silamikelis, I., Dindune, I. I., Kalnina, I., Ustinova, M., Zaharenko, L., Silamikele, L., Rovite, V., Gudra, D., Konrade, I., Sokolovska, J., Pirags, V., & Klovins, J. (2020). Baseline gut microbiome composition predicts metformin therapy short-term efficacy in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *PloS one*, 15(10), e0241338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241338>

Ellard, S., Bellanné-Chantelot, C., Hattersley, A. T., & European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group (2008). Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*, 51(4), 546–553. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-0942-y>

Ezeji, J. C., Sarikonda, D. K., Hopperton, A., Erkkila, H. L., Cohen, D. E., Martinez, S. P., Cominelli, F., Kuwahara, T., Dichosa, A. E. K., Good, C. E., Jacobs, M. R.,

Khoretonenko, M., Veloo, A., & Rodriguez-Palacios, A. (2021). Parabacteroides distasonis: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health. *Gut microbes*, 13(1), 1922241. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1922241>

Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Pedersen, H. K., Arumugam, M., Kristiansen, K., Voigt, A. Y., Vestergaard, H., Hercog, R., Costea, P. I., Kultima, J. R., Li, J., Jørgensen, T., Levenez, F., Pedersen, O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 528(7581), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>

Frost, F., Storck, L. J., Kacprowski, T., Gärtner, S., Rühlemann, M., Bang, C., Franke, A., Völker, U., Aghdassi, A. A., Steveling, A., Mayerle, J., Weiss, F. U., Homuth, G., & Lerch, M. M. (2019). A structured weight loss program increases gut microbiota phylogenetic diversity and reduces levels of *Collinsella* in obese type 2 diabetics: A pilot study. *PloS one*, 14(7), e0219489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219489>

Genuth, S. M., Palmer, J. P., & Nathan, D. M. (2018). Classification and Diagnosis of Diabetes. In C. C. Cowie (Eds.) et. al., *Diabetes in America*. (3rd ed.). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US).

Gomaa E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>

Gomes, T. A. T., Ooka, T., Hernandez, R. T., Yamamoto, D., & Hayashi, T. (2020). *Escherichia albertii* Pathogenesis. *EcoSal Plus*, 9(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2019. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2019>

Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(11), 820–827. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283559b22>

Gormsen, L. C., Sundelin, E. I., Jensen, J. B., Vendelbo, M. H., Jakobsen, S., Munk, O. L., Hougaard Christensen, M. M., Brøsen, K., Frøkiær, J., & Jessen, N. (2016). In Vivo Imaging of Human ¹¹C-Metformin in Peripheral Organs: Dosimetry, Biodistribution, and Kinetic Analyses. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57(12), 1920–1926. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.177774>

Gutzeit, C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018). The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European journal of immunology*, 48(7), 1101–1113. <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>

Hand, T. W., & Reboldi, A. (2021). Production and Function of Immunoglobulin A. *Annual review of immunology*, 39, 695–718. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-074236>

Hattersley, A. T., Greeley, S. A. W., Polak, M., Rubio-Cabezas, O., Njølstad, P. R., Mlynarski, W., Castano, L., Carlsson, A., Raile, K., Chi, D. V., Ellard, S., & Craig, M. E. (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes*, 19 Suppl 27, 47–63. <https://doi.org/10.1111/pedi.12772>

He, L., & Wondisford, F. E. (2015). Metformin action: concentrations matter. *Cell metabolism*, 21(2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.003>

Hills, R. D., Jr, Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C., & Theberge, C. R. (2019). Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*, 11(7), 1613. <https://doi.org/10.3390/nu11071613>

Howell, J. J., Hellberg, K., Turner, M., Talbott, G., Kolar, M. J., Ross, D. S., Hoxhaj, G., Saghatelian, A., Shaw, R. J., & Manning, B. D. (2017). Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell metabolism*, 25(2), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.009>

- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England journal of medicine*, 345(11), 790–797. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492>
- Huang, W. Q., Huang, H. L., Peng, W., Liu, Y. D., Zhou, Y. L., Xu, H. M., Zhang, L. J., Zhao, C., & Nie, Y. Q. (2022). Altered Pattern of Immunoglobulin A-Targeted Microbiota in Inflammatory Bowel Disease After Fecal Transplantation. *Frontiers in microbiology*, 13, 873018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873018>
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium (2019). The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 569(7758), 641–648. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>
- International Diabetes Federation, 2022. <https://diabetesatlas.org/>
- Isho, B., Florescu, A., Wang, A. A., & Gommerman, J. L. (2021). Fantastic IgA plasma cells and where to find them. *Immunological reviews*, 303(1), 119–137. <https://doi.org/10.1111/imr.12980>
- Jackson, M. A., Pearson, C., Ilott, N. E., Huus, K. E., Hegazy, A. N., Webber, J., Finlay, B. B., Macpherson, A. J., Powrie, F., & Lam, L. H. (2021). Accurate identification and quantification of commensal microbiota bound by host immunoglobulins. *Microbiome*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00992-w>
- Janić, M., Volčanšek, S., Lunder, M., Janež, A. Metformin: from mechanisms of action to advanced clinical use. *Zdravniški Vestnik*. (2017) 1;86. <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.1503>
- Janzon, A., Goodrich, J. K., Koren, O., TEDDY Study Group, Waters, J. L., & Ley, R. E. (2019). Interactions between the Gut Microbiome and Mucosal Immunoglobulins A, M, and G in the Developing Infant Gut. *mSystems*, 4(6), e00612-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00612-19>
- Jefferis, R., & Kumararatne, D. S. (1990). Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and experimental immunology*, 81(3), 357–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05339.x>
- Jones, A. G., & Hattersley, A. T. (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 30(7), 803–817. <https://doi.org/10.1111/dme.12159>
- Kaetzel C. S. (2014). Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunology letters*, 162(2 Pt A), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.008>
- Kaetzel, C. S., Mestecky, J., & Johansen, F. E. (2017). Two Cells, One Antibody: The Discovery of the Cellular Origins and Transport of Secretory IgA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(5), 1765–1767. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700025>
- Kaneto, H., Kimura, T., Obata, A., Shimoda, M., & Kaku, K. (2021). Multifaceted Mechanisms of Action of Metformin Which Have Been Unraveled One after Another in the Long History. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2596. <https://doi.org/10.3390/ijms22052596>
- Kau, A. L., Planer, J. D., Liu, J., Rao, S., Yatsunenko, T., Trehan, I., Manary, M. J., Liu, T. C., Stappenbeck, T. S., Maleta, K. M., Ashorn, P., Dewey, K. G., Houpt, E. R., Hsieh, C. S., & Gordon, J. I. (2015). Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Science translational medicine*, 7(276), 276ra24. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4877>
- Kc, K., Shakya, S., & Zhang, H. (2015). Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Annals of nutrition & metabolism*, 66 Suppl 2, 14–20. <https://doi.org/10.1159/000371628>
- Khan, S. R., van der Burgh, A. C., Peeters, R. P., van Hagen, P. M., Dalm, V. A. S. H., & Chaker, L. (2021). Determinants of Serum Immunoglobulin Levels: A Systematic Review

- and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology*, 12, 664526. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664526>
- Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, 6(6), 850–867. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in microbiology*, 9, 1835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>
- King, C. H., Desai, H., Sylvetsky, A. C., LoTempio, J., Ayanyan, S., Carrie, J., Crandall, K. A., Fochtman, B. C., Gasparyan, L., Gulzar, N., Howell, P., Issa, N., Krampis, K., Mishra, L., Morizono, H., Pisegna, J. R., Rao, S., Ren, Y., Simonyan, V., Smith, K., Mazumder, R. (2019). Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PloS one*, 14(9), e0206484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484>
- Kwan, S. Y., Sabotta, C. M., Joon, A., Wei, P., Petty, L. E., Below, J. E., Wu, X., Zhang, J., Jenq, R. R., Hawk, E. T., McCormick, J. B., Fisher-Hoch, S. P., & Beretta, L. (2022). Gut Microbiome Alterations Associated with Diabetes in Mexican Americans in South Texas. *mSystems*, 7(3), e0003322. <https://doi.org/10.1128/msystems.00033-22>
- Laurence, M., Hatzis, C., & Brash, D. E. (2014). Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes. *PloS one*, 9(5), e97876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097876>
- Le Bastard, Q., Al-Ghalith, G. A., Grégoire, M., Chapelet, G., Javaudin, F., Dailly, E., Batard, E., Knights, D., & Montassier, E. (2018). Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(3), 332–345. <https://doi.org/10.1111/apt.14451>
- Lee, D. W., Ryu, Y. K., Chang, D. H., Park, H. Y., Go, J., Maeng, S. Y., Hwang, D. Y., Kim, B. C., Lee, C. H., & Kim, K. S. (2022). *Agathobaculum butyriciproducens* Shows Neuroprotective Effects in a 6-OHDA-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of microbiology and biotechnology*, 32(9), 1168–1177. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05032>
- Lee, Y., Kim, A. H., Kim, E., Lee, S., Yu, K. S., Jang, I. J., Chung, J. Y., & Cho, J. Y. (2021). Changes in the gut microbiome influence the hypoglycemic effect of metformin through the altered metabolism of branched-chain and nonessential amino acids. *Diabetes research and clinical practice*, 178, 108985. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108985>
- Leighton, E., Sainsbury, C. A., & Jones, G. C. (2017). A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*, 8(3), 475–487. <https://doi.org/10.1007/s13300-017-0265-4>
- Leitner, D. R., Frühbeck, G., Yumuk, V., Schindler, K., Micic, D., Woodward, E., & Toplak, H. (2017). Obesity and Type 2 Diabetes: Two Diseases with a Need for Combined Treatment Strategies - EASO Can Lead the Way. *Obesity facts*, 10(5), 483–492. <https://doi.org/10.1159/000480525>
- León, E. D., & Francino, M. P. (2022). Roles of Secretory Immunoglobulin A in Host-Microbiota Interactions in the Gut Ecosystem. *Frontiers in microbiology*, 13, 880484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.880484>
- Leviatan, S., Shoer, S., Rothschild, D., Gorodetski, M., & Segal, E. (2022). An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species. *Nature communications*, 13(1), 3863. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31502-1>
- Lin, R., Chen, H., Shu, W., Sun, M., Fang, L., Shi, Y., Pang, Z., Wu, W., & Liu, Z. (2018). Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of translational medicine*, 16(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1723-0>
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology*, 204(1), 1–11. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0260>

- Luck, H., Khan, S., Kim, J. H., Copeland, J. K., Revelo, X. S., Tsai, S., Chakraborty, M., Cheng, K., Tao Chan, Y., Nøhr, M. K., Clemente-Casares, X., Perry, M. C., Ghazarian, M., Lei, H., Lin, Y. H., Coburn, B., Okrainec, A., Jackson, T., Poutanen, S., Gaisano, H., ... Winer, D. A. (2019). Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nature communications*, 10(1), 3650. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11370-y>
- Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 39(3), 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011>
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Poeso, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients*, 12(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Magri, G., Comerma, L., Pybus, M., Sintes, J., Lligé, D., Segura-Garzón, D., Bascones, S., Yeste, A., Grasset, E. K., Gutzeit, C., Uzzan, M., Ramanujam, M., van Zelm, M. C., Albero-González, R., Vazquez, I., Iglesias, M., Serrano, S., Márquez, L., Mercade, E., Mehandru, S., ... Cerutti, A. (2017). Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals. *Immunity*, 47(1), 118–134.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.013>
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- McIntyre, H. D., Kapur, A., Divakar, H., & Hod, M. (2020). Gestational Diabetes Mellitus-Innovative Approach to Prediction, Diagnosis, Management, and Prevention of Future NCD-Mother and Offspring. *Frontiers in endocrinology*, 11, 614533. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.614533>
- Modzelewski, R., Stefanowicz-Rutkowska, M. M., Matuszewski, W., & Bandurska-Stankiewicz, E. M. (2022). Gestational Diabetes Mellitus-Recent Literature Review. *Journal of clinical medicine*, 11(19), 5736. <https://doi.org/10.3390/jcm11195736>
- Mohammed, I., Hollenberg, M. D., Ding, H., & Triggle, C. R. (2021). A Critical Review of the Evidence That Metformin Is a Putative Anti-Aging Drug That Enhances Healthspan and Extends Lifespan. *Frontiers in endocrinology*, 12, 718942. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.718942>
- Moor, K., Diard, M., Sellin, M. E., Felmy, B., Wotzka, S. Y., Toska, A., Bakkeren, E., Arnoldini, M., Bansept, F., Co, A. D., Völler, T., Minola, A., Fernandez-Rodriguez, B., Agatic, G., Barbieri, S., Piccoli, L., Casiraghi, C., Corti, D., Lanzavecchia, A., Regoes, R. R., Slack, E. (2017). High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature*, 544(7651), 498–502. <https://doi.org/10.1038/nature22058>
- Mueller, N. T., Differding, M. K., Zhang, M., Maruthur, N. M., Juraschek, S. P., Miller, E. R., 3rd, Appel, L. J., & Yeh, H. C. (2021). Metformin Affects Gut Microbiome Composition and Function and Circulating Short-Chain Fatty Acids: A Randomized Trial. *Diabetes care*, 44(7), 1462–1471. <https://doi.org/10.2337/dc20-2257>
- Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., & Olasehinde, G. I. (2020). The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International journal of microbiology*, 2020, 8045646. <https://doi.org/10.1155/2020/8045646>
- Ohta, Y., & Flajnik, M. (2006). IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28), 10723–10728. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601407103>
- Okon, E. B., Chung, A. W., Zhang, H., Laher, I., & van Breemen, C. (2007). Hyperglycemia and hyperlipidemia are associated with endothelial dysfunction during the development of type 2 diabetes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(5), 562–567. <https://doi.org/10.1139/y07-026>

Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269–273. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.68>

Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*, 348 Pt 3(Pt 3), 607–614.

Pabst, O., & Slack, E. (2020). IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal immunology*, 13(1), 12–21. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4>

Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., Uva, P., Vascellari, S., Loviselli, A., Manzin, A., & Velluzzi, F. (2021). Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific reports*, 11(1), 5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>

Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in immunology*, 11, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>

Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3770–3783. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001>

Peters, A. L., Ahmann, A. J., Battelino, T., Evert, A., Hirsch, I. B., Murad, M. H., Winter, W. E., & Wolpert, H. (2016). Diabetes Technology-Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Therapy and Continuous Glucose Monitoring in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 101(11), 3922–3937. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2534>

Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>

Peterson, D. A., Planer, J. D., Guruge, J. L., Xue, L., Downey-Virgin, W., Goodman, A. L., Seedorf, H., & Gordon, J. I. (2015). Characterizing the interactions between a naturally primed immunoglobulin A and its conserved *Bacteroides thetaiotaomicron* species-specific epitope in gnotobiotic mice. *The Journal of biological chemistry*, 290(20), 12630–12649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633800>

Piya, M. K., Tahrani, A. A., & Barnett, A. H. (2010). Emerging treatment options for type 2 diabetes. *British journal of clinical pharmacology*, 70(5), 631–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03711.x>

Planer, J. D., Peng, Y., Kau, A. L., Blanton, L. V., Ndao, I. M., Tarr, P. I., Warner, B. B., & Gordon, J. I. (2016). Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature*, 534(7606), 263–266. <https://doi.org/10.1038/nature17940>

Prakash, J., Mittal, B., Srivastava, A., Awasthi, S., & Srivastava, N. (2016). Association of FTO rs9939609 SNP with Obesity and Obesity- Associated Phenotypes in a North Indian Population. *Oman medical journal*, 31(2), 99–106. <https://doi.org/10.5001/omj.2016.20>

Prattichizzo, F., Giuliani, A., Mensà, E., Sabbatinelli, J., De Nigris, V., Rippo, M. R., La Sala, L., Procopio, A. D., Olivieri, F., & Ceriello, A. (2018). Pleiotropic effects of metformin: Shaping the microbiome to manage type 2 diabetes and postpone ageing. *Ageing research reviews*, 48, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.003>

Qin, L., Tang, L. F., Cheng, L., & Wang, H. Y. (2022). The clinical significance of allergen-specific IgG4 in allergic diseases. *Frontiers in immunology*, 13, 1032909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1032909>

Rabbits TH. Intracellular Antibodies for Drug Discovery and as Drugs of the Future. *Antibodies*. 2023; 12(1):24. <https://doi.org/10.3390/antib12010024>

Ramachandran, A., Snehalatha, C., Mary, S., Mukesh, B., Bhaskar, A. D., Vijay, V., & Indian Diabetes Prevention Programme (IDPP) (2006). The Indian Diabetes Prevention Programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). *Diabetologia*, 49(2), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0097-z>

Reed, J., Bain, S., & Kanamarlapudi, V. (2021). A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 14, 3567–3602. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895>

Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>

Reynoso-García, J., Miranda-Santiago, A.E., Meléndez-Vázquez, N.M., Acosta-Pagán, K., Sánchez-Rosado, M., Díaz-Rivera, J., Rosado-Quiñones, A.M., Acevedo-Márquez, L., Cruz-Roldán, L., Tosado-Rodríguez, E.L., Figueroa-Gispert, M.D.M., & Godoy-Vitorino, F. (2022) A complete guide to human microbiomes: Body niches, transmission, development, dysbiosis, and restoration. *Front. Syst. Biol.* 2:951403. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.951403>

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

Ripsin, C. M., Kang, H., & Urban, R. J. (2009). Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *American family physician*, 79(1), 29–36.

Robeson, M. S., 2nd, Manna, K., Randolph, C., Byrum, S., & Hakkak, R. (2022). Short-Term Metformin Treatment Enriches *Bacteroides dorei* in an Obese Liver Steatosis Zucker Rat Model. *Frontiers in microbiology*, 13, 834776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834776>

Rodríguez, J., Hiel, S., & Delzenne, N. M. (2018). Metformin: old friend, new ways of action-implication of the gut microbiome?. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 21(4), 294–301. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000468>

Rojas, L. B., & Gomes, M. B. (2013). Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-6>

Ross, F. A., MacKintosh, C., & Hardie, D. G. (2016). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS journal*, 283(16), 2987–3001. <https://doi.org/10.1111/febs.13698>

Roswall, J., Olsson, L. M., Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., Simon, M. C., Kiilerich, P., Akrami, R., Krämer, M., Uhlén, M., Gummesson, A., Kristiansen, K., Dahlgren, J., & Bäckhed, F. (2021). Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell host & microbe*, 29(5), 765–776.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.021>

Sakran, N., Graham, Y., Pintar, T., Yang, W., Kassir, R., Willigendael, E. M., Singhal, R., Kooreman, Z. E., Ramnarain, D., Mahawar, K., Parmar, C., Madhok, B., & Pouwels, S. (2022). The many faces of diabetes. Is there a need for re-classification? A narrative review. *BMC endocrine disorders*, 22(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00927-y>

Scarpello, J. H., & Howlett, H. C. (2008). Metformin therapy and clinical uses. *Diabetes & vascular disease research*, 5(3), 157–167. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.027>

Schauer, U., Stemberg, F., Rieger, C. H., Büttner, W., Borte, M., Schubert, S., Möllers, H., Riedel, F., Herz, U., Renz, H., & Herzog, W. (2003). Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(2), 202–207. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.2.202-207.2003>

- Schlender, L., Martinez, Y. V., Adeniji, C., Reeves, D., Faller, B., Sommerauer, C., Al Qur'an, T., Woodham, A., Kunnamo, I., Sönnichsen, A., & Renom-Guiteras, A. (2017). Efficacy and safety of metformin in the management of type 2 diabetes mellitus in older adults: a systematic review for the development of recommendations to reduce potentially inappropriate prescribing. *BMC geriatrics*, 17(Suppl 1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12877-017-0574-5>
- Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Sellera, F. P., Fernandes, M. R., Fuga, B., Fontana, H., Vásquez-Ponce, F., Goldberg, D. W., Monte, D. F., Rodrigues, L., Cardenas-Arias, A. R., Lopes, R., Cardoso, B., Costa, D. G. C., Esposito, F., & Lincopan, N. (2022). Phylogeographical Landscape of *Citrobacter portucalensis* Carrying Clinically Relevant Resistomes. *Microbiology spectrum*, 10(2), e0150621. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01506-21>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., Ianculescu, A. G., Yue, L., Lo, J. C., Burchard, E. G., Brett, C. M., & Giacomini, K. M. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1422–1431. <https://doi.org/10.1172/JCI30558>
- Shurrah, N. T., & Arafa, E. A. (2020). Metformin: A review of its therapeutic efficacy and adverse effects. *Obesity Medicine*, 17, 100186. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2020.100186>
- Silamiķele, L., Silamiķelis, I., Ustinova, M., Kalniņa, Z., Elbere, I., Petrovska, R., Kalniņa, I., & Kloviņš, J. (2021). Metformin Strongly Affects Gut Microbiome Composition in High-Fat Diet-Induced Type 2 Diabetes Mouse Model of Both Sexes. *Frontiers in endocrinology*, 12, 626359. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.626359>
- Sterlin, D., Fadlallah, J., Adams, O., Fieschi, C., Parizot, C., Dorgham, K., Rajkumar, A., Autaa, G., El-Kafsi, H., Charuel, J. L., Juste, C., Jönsson, F., Candela, T., Wardemann, H., Aubry, A., Capito, C., Brisson, H., Tresallet, C., Cummings, R. D., Larsen, M., ... Gorochoy, G. (2020). Human IgA binds a diverse array of commensal bacteria. *The Journal of experimental medicine*, 217(3), e20181635. <https://doi.org/10.1084/jem.20181635>
- Sugawara, Y., Kanazawa, A., Aida, M., Yoshida, Y., Yamashiro, Y., & Watada, H. (2022). Association of gut microbiota and inflammatory markers in obese patients with type 2 diabetes mellitus: post hoc analysis of a synbiotic interventional study. *Bioscience of microbiota, food and health*, 41(3), 103–111. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2021-081>
- Syed, R., Jamil, K., Asimuddin, M., Alqahtani, M. S., Alshehri, M., Mateen, A., Wahab Ali Aduderman, A., Shamsul Ola, M., & Malik, A. (2020). Molecular & biochemical analysis of Pro12Ala variant of PPAR- γ 2 gene in type 2 diabetes mellitus. *Saudi journal of biological sciences*, 27(9), 2439–2443. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.046>
- Thomas, N. J., Jones, S. E., Weedon, M. N., Shields, B. M., Oram, R. A., & Hattersley, A. T. (2018). Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 6(2), 122–129. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30362-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30362-5)
- Tomic, D., Shaw, J. E., & Magliano, D. J. (2022). The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology*, 18(9), 525–539. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

Urakami T. (2019). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 12, 1047–1056. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S179793>

Ustinova, M., Silamikelis, I., Kalnina, I., Ansone, L., Rovite, V., Elbere, I., Radovica-Spavina, I., Fridmanis, D., Aladyeva, J., Konrade, I., Pirags, V., & Klovins, J. (2019). Metformin strongly affects transcriptome of peripheral blood cells in healthy individuals. *PloS one*, 14(11), e0224835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224835>

Van der Waaij, L. A., Limburg, P. C., Mesander, G., & van der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut*, 38(3), 348–354. <https://doi.org/10.1136/gut.38.3.348>

Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895–911. <https://doi.org/10.3390/toxins5050895>

Veselibas statistikas datubāze 2023. <https://statistika.spkc.gov.lv/>

Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Viladomiu, M., Kivolowitz, C., Abdulhamid, A., Dogan, B., Victorio, D., Castellanos, J. G., Woo, V., Teng, F., Tran, N. L., Sczesnak, A., Chai, C., Kim, M., Diehl, G. E., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Zhou, X. K., Schwartzman, S., Mandl, L. A., Abramowitz, M., Jacob, V., ... Longman, R. S. (2017). IgA-coated *E. coli* enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. *Science translational medicine*, 9(376), eaaf9655. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9655>

Wang, D. S., Jonker, J. W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A. H., & Sugiyama, Y. (2002). Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(2), 510–515. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.034140>

Wang, J., Zhang, J., Li, L., Wang, Y., Wang, Q., Zhai, Y., You, H., & Hu, D. (2013). Association of rs12255372 in the TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 46(4), 382–393. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20132677>

Wang, Y. W., He, S. J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y. T., Tian, L., & Huang, Q. (2017). Metformin: a review of its potential indications. *Drug design, development and therapy*, 11, 2421–2429. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S141675>

Wernroth, M. L., Peura, S., Hedman, A. M., Hetty, S., Vicenzi, S., Kennedy, B., Fall, K., Svenblad, B., Andolf, E., Pershagen, G., Theorell-Haglöw, J., Nguyen, D., Sayols-Baixeras, S., Dekkers, K. F., Bertilsson, S., Almqvist, C., Dicksved, J., & Fall, T. (2022). Development of gut microbiota during the first 2 years of life. *Scientific reports*, 12(1), 9080. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13009-3>

Westman E. C. (2021). Type 2 Diabetes Mellitus: A Pathophysiologic Perspective. *Frontiers in nutrition*, 8, 707371. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.707371>

Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M. T., Caesar, R., Mannerås-Holm, L., Ståhlman, M., Olsson, L. M., Serino, M., Planas-Fèlix, M., Xifra, G., Mercader, J. M., Torrents, D., Burcelin, R., Ricart, W., Perkins, R., Fernández-Real, J. M., & Bäckhed, F. (2017). Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nature medicine*, 23(7), 850–858. <https://doi.org/10.1038/nm.4345>

Wu W. K. K. (2023). Parabacteroides distasonis: an emerging probiotic?. *Gut*, gutjnl-2022-329386. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-329386>

Yahaya, T. O., & Ufuoma, S. B. (2020). Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends. *Oman medical journal*, 35(3), e126. <https://doi.org/10.5001/omj.2020.44>

- Yang, C., Chen-Liaw, A., Spindler, M. P., Tortorella, D., Moran, T. M., Cerutti, A., & Faith, J. J. (2022). Immunoglobulin A antibody composition is sculpted to bind the self gut microbiome. *Science immunology*, 7(73), eabg3208. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg3208>
- Yang, Y., & Palm, N. W. (2020). Immunoglobulin A and the microbiome. *Current opinion in microbiology*, 56, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.08.003>
- Yang W, Lin L, Qi J: The preventive effect of acarbose and metformin on the IGT population from becoming diabetes mellitus: a 3-year multicentral prospective study. *Chin J Endocrinol Metab.* 2001, 17: 131-134.
- Yel L. (2010). Selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology*, 30(1), 10–16. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9357-x>
- Zang, Y. M., Liu, J. F., Li, G., Zhao, M., Yin, G. M., Zhang, Z. P., & Jia, W. (2023). The first case of *Escherichia fergusonii* with biofilm in China and literature review. *BMC infectious diseases*, 23(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-07985-8>
- Zeng, M. Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, H. S., Cascalho, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2016). Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity*, 44(3), 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006>
- Zhang, Q., & Hu, N. (2020). Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 13, 5003–5014. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S286430>

PIELIKUMI

1. tabula.

Būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā pirms metformīna terapijas

Table 1.

Significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort before metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M0	Bacteroides thetaiotaomicron(↑) Alistipes putredinis (↑) Bacteroides xylanisolvens (↑) Bacteroides caccae (↑) Bacteroides ovatus (↑) Parabacteroides distasonis (↑) Phocaeicola massiliensis (↑) Alistipes senegalensis (↑) Bacteroides sp900761785 (↑) Bacteroides faecis (↑) Collinsella sp900544755(↑) Collinsella sp900554255(↑) Bacteroides congonensis (↑) Parabacteroides johnsonii (↑) Bacteroides sp902362375 (↑) Collinsella sp900553705 (↑) Bacteroides acidifaciens (↑) Bacteroides fluxus (↑) Actinomyces oris (↓) Enterobacter asburiae B (↓) Pseudomonas citronellolis (↓) Acidovorax sp000302535 (↓) Afipia broomeae (↓) Cutibacterium acnes (↓) Bradyrhizobium sp003020075 (↓) Intestinibacter bartlettii (↓) Stenotrophomonas maltophilia AM (↓) Blautia A obeum B (↓) Caulobacter sp903900155 (↓) Bradyrhizobium sp000015165 (↓) Ralstonia pickettii (↓) Anaerobutyricum hallii (↓) Blautia A faecis (↓)	Bacteroides thetaiotaomicron(↑) Alistipes putredinis(↑) Bacteroides xylanisolvens(↑) Bacteroides caccae(↑) Bacteroides ovatus(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Phocaeicola massiliensis(↑) Alistipes senegalensis(↑) Bacteroides sp900761785(↑) Bacteroides fingoldii(↑) Bacteroides sp900765785(↑) Bacteroides faecis(↑) Collinsella sp900544755(↑) Collinsella sp900554255(↑) Bacteroides congonensis(↑) Parabacteroides johnsonii(↑) Bacteroides sp902362375(↑) Collinsella sp900553705(↑) Bacteroides acidifaciens(↑) Bacteroides fluxus(↑) Actinomyces oris(↓) Enterobacter asburiae B(↓) Pseudomonas citronellolis(↓) Acidovorax sp000302535(↓) Afipia broomeae(↓) Cutibacterium acnes(↓) Bradyrhizobium sp003020075(↓) Intestinibacter bartlettii(↓) Stenotrophomonas maltophilia AM(↓) Blautia A obeum B(↓) Caulobacter sp903900155(↓) Bradyrhizobium sp000015165(↓) Ralstonia pickettii(↓)	-

		Anaerobutyricum hallii(↓) Blautia A faecis(↓)	
--	--	--	--

Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski pieauga, ir sakārtotas dilstošā secībā, tabulas augšā esot ar visbūtiskāko pieaugumu. Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski samazinājās, ir sakārtotas augošā secībā, tabulas apakšā esot ar visnozīmīgāko samazinājumu. Bacteria, whose proportion increased significantly, are arranged in descending order, with the most significant increase at the top of the table. Bacteria, whose proportion decreased significantly, are arranged in ascending order, with the most significant decrease at the bottom of the table.

2. tabula.

Būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā septiņas dienas pēc metformīna terapijas uzsākšanas

Table 2.

Significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort seven days after metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M7d	Phocaeicola dorei (↑) Bacteroides uniformis (↑) Faecalibacterium prausnitzii G(↑) Bacteroides thetaiotaomicron (↑) Alistipes putredinis (↑) Bacteroides xyloxylians (↑) Bacteroides ovatus (↑) Faecalibacterium prausnitzii I(↑) Ruthenibacterium lactatiformans (↑) Alistipes finegoldii (↑) Dysosmobacter welbionis (↑) Bacteroides caccae (↑) Parabacteroides distasonis (↑) Phocaeicola sartorii (↑) Phocaeicola massiliensis(↑) Alistipes shahii(↑) Eisenbergiella sp900066775(↑) Alistipes senegalensis(↑) Lawsonibacter asaccharolyticus(↑) Bacteroides congolensis(↑) Bacteroides sp002491635(↑) Collinsella sp900554985(↑) NSJ 32 sp014384895(↑) Collinsella sp900553705(↑) Collinsella sp900554255(↑) Collinsella sp900546825(↑) Bacteroides finegoldii(↑) Prevotella corporis(↑) Collinsella sp900556205(↑) Collinsella sp900556515(↑) Collinsella sp900544755(↑) Bacteroides sp902362375(↑)	Phocaeicola dorei(↑) Bacteroides uniformis(↑) Faecalibacterium prausnitzii G(↑) Bacteroides thetaiotaomicron(↑) Bacteroides xyloxylians(↑) Alistipes putredinis(↑) Bacteroides ovatus(↑) Bacteroides caccae(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Alistipes finegoldii(↑) Dysosmobacter welbionis(↑) Faecalibacterium prausnitzii E(↑) Phocaeicola sartorii(↑) Phocaeicola massiliensis(↑) Eisenbergiella sp900066775(↑) Alistipes shahii(↑) Collinsella sp900546825(↑) Prevotella corporis(↑) Collinsella sp900553705(↑) Alistipes senegalensis(↑) Phocaeicola sp900551645(↑) Collinsella sp900556205(↑) Collinsella sp900554255(↑) Bacteroides acidifaciens(↑) Bacteroides stercorisoris(↑) Collinsella sp900556515(↑) Collinsella sp900554985(↑) NSJ 32 sp014384895(↑) Lawsonibacter asaccharolyticus(↑) Alistipes sp900541585(↑) Dysosmobacter	-

<p> <i>Bacteroides oleiciplenus</i>(↑) <i>Dysosmobacter</i> sp014297375(↑) <i>Bacteroides stercorisoris</i>(↑) NSJ 63 sp014384805(↑) <i>Bacteroides</i> sp900761785(↑) OF09 33XD sp003481995(↑) <i>Neobittarella massiliensis</i>(↑) <i>Agathobaculum</i> sp900291975(↑) <i>Bacteroides</i> sp900765785(↑) UMGS856 sp900546265(↑) <i>Lawsonibacter</i> sp900754605(↑) </p> <p> <i>Enterobacter asburiae</i> B(↓) <i>Cutibacterium acnes</i>(↓) <i>Actinomyces oris</i>(↓) <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> AM(↓) <i>Pseudomonas citronellolis</i>(↓) HGM04593 sp900769465(↓) <i>Acidovorax</i>: sp000302535(↓) <i>Enterobacter hormaechei</i> A(↓) <i>Bradyrhizobium</i> sp003020075(↓) <i>Afipia broomeae</i>(↓) <i>Caulobacter</i> sp903900155(↓) <i>Bradyrhizobium</i> sp000015165(↓) <i>Ruminococcus C</i> sp000980705(↓) <i>Anaerobutyricum hallii</i>(↓) <i>Blautia A faecis</i>(↓) <i>Anaerostipes hadrus</i>(↓) <i>Ralstonia pickettii</i>(↓) </p>	<p> sp014297375(↑) <i>Bacteroides</i> sp900765785(↑) <i>Lawsonibacter</i> sp900754605(↑) <i>Alistipes dispar</i>(↑) <i>Collinsella</i> sp900544755(↑) <i>Agathobaculum</i> sp900555465(↑) <i>Bittarella massiliensis</i>(↑) <i>Neobittarella massiliensis</i>(↑) <i>Bacteroides</i> sp902362375(↑) <i>Bacteroides finegoldii</i>(↑) <i>Lawsonibacter</i> sp900066645(↑) <i>Bacteroides</i> sp900761785(↑) <i>Bacteroides fluxus</i>(↑) <i>Bacteroides faecis</i>(↑) <i>Faecalibacterium</i> sp900551435(↑) <i>Faecalibacterium</i> sp900765105(↑) <i>Alistipes timonensis</i>(↑) <i>Collinsella</i> sp900541665(↑) OF09 33XD sp003481995(↑) NSJ 63 sp014384805(↑) </p> <p> <i>Intestinibacter</i> sp900540355(↓) <i>Actinomyces oris</i>(↓) <i>Cutibacterium acnes</i>(↓) CAG 632 sp002406015(↓) <i>Clostridium</i> AQ sp900552125(↓) <i>Enterobacter asburiae</i> B(↓) HGM04593 sp900769465(↓) <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> AM(↓) <i>Acidovorax</i> sp000302535(↓) <i>Afipia broomeae</i>(↓) <i>Pseudomonas</i> <i>citronellolis</i>(↓) <i>Intestinibacter bartlettii</i>(↓) <i>Bradyrhizobium</i> sp003020075(↓) <i>Enterobacter hormaechei</i> A(↓) <i>Bradyrhizobium</i> sp000015165(↓) <i>Caulobacter</i> sp903900155(↓) UBA11524 sp000437595(↓) </p>
---	--

		Anaerobutyricum hallii(↓) Blautia A faecis(↓) Anaerostipes hadrus(↓) Ralstonia pickettii(↓)	
--	--	--	--

Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski pieauga, ir sakārtotas dilstošā secībā, tabulas augšā esot ar visbūtiskāko pieaugumu. Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski samazinājās, ir sakārtotas augošā secībā, tabulas apakšā esot ar visnozīmīgāko samazinājumu. Bacteria, whose proportion increased significantly, are arranged in descending order, with the most significant increase at the top of the table. Bacteria, whose proportion decreased significantly, are arranged in ascending order, with the most significant decrease at the bottom of the table.

3. tabula.

Būtiski izmainītie baktēriju taksoni starp paraugu frakcijām 2TD kohortā trīs mēnešus pēc metformīna terapijas uzsākšanas

Table 3.

Significantly altered bacterial taxa among sample fractions in the T2D cohort three months after metformin therapy

Laika posms Time point	sIgA+ vs nešķirots sIgA+ vs Presort	IgG+ vs nešķirots IgG+ vs Presort	sIgA+ vs IgG+
M3m	Phocaeicola dorei(↑) Alistipes onderdonkii(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Bacteroides ovatus(↑) Bacteroides xyloxylians(↑) Parabacteroides merdae(↑) Bacteroides thetaiotaomicron(↑) Alistipes communis(↑) Phocaeicola sartorii(↑) Bacteroides congolensis(↑) Phocaeicola sp900551645(↑) Bacteroides finegoldii(↑) Bacteroides sp902362375(↑) Collinsella sp900553705(↑) Bacteroides sp900761785(↑) Collinsella sp900544755(↑) Alistipes senegalensis(↑) Neobittarella massiliensis(↑) Parabacteroides johnsonii(↑) Collinsella sp900554255(↑) Collinsella sp900541665(↑) NSJ 63 sp014384805(↑) Bacteroides faecis(↑) Clostridium AQ sp900552125(↓) HGM04593 sp900769465(↓) Pseudomonas citronellolis(↓) Actinomyces oris(↓) Stenotrophomonas maltophilia AM(↓) Enterobacter asburiae B(↓) Acidovorax sp000302535(↓) Ruminococcus C sp000980705(↓) Cutibacterium acnes(↓) Afipia broomeae(↓) Enterobacter hormaechei A(↓)	Phocaeicola dorei(↑) Dorea formicigenerans(↑) Parabacteroides distasonis(↑) Bacteroides ovatus(↑) Bacteroides xyloxylians(↑) Ruthenibacterium lactatiformans(↑) Bacteroides thetaiotaomicron(↑) Alistipes communis(↑) Phocaeicola sartorii(↑) Bacteroides sp902362375(↑) Collinsella sp900544755(↑) Bacteroides finegoldii(↑) Alistipes senegalensis(↑) Collinsella sp900554255(↑) Collinsella sp900553705(↑) Gemmiger variabilis A(↑) Collinsella sp900556205(↑) Bacteroides congolensis(↑) Phocaeicola sp900551645(↑) Gemmiger sp900554145(↑) Bacteroides sp900761785(↑) NSJ 63 sp014384805(↑) Neobittarella massiliensis(↑) Collinsella sp900550815(↑) Actinomyces oris(↓) HGM04593 sp900769465(↓) Cutibacterium acnes (↓) Pseudomonas citronellolis(↓) Enterobacter asburiae B(↓) Stenotrophomonas maltophilia AM(↓) Acidovorax sp000302535(↓) Afipia broomeae(↓) Bradyrhizobium sp003020075(↓) Enterobacter hormaechei	-

	Bradyrhizobium sp003020075(↓) Anaerobutyricum hallii(↓) Caulobacter sp903900155(↓) Bradyrhizobium sp000015165(↓) Blautia A faecis(↓) Ralstonia pickettii(↓)	A(↓) Ruminococcus C sp000980705(↓) Bradyrhizobium sp000015165(↓) Caulobacter sp903900155(↓) Anaerobutyricum hatlii(↓) Blautia A faecis(↓) Ralstonia pickettii(↓)	
--	--	--	--

Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski pieauga, ir sakārtotas dilstošā secībā, tabulas augšā esot ar visbūtiskāko pieaugumu. Baktērijas, kuru īpatsvars būtiski samazinājās, ir sakārtotas augošā secībā, tabulas apakšā esot ar visnozīmīgāko samazinājumu. Bacteria, whose proportion increased significantly, are arranged in descending order, with the most significant increase at the top of the table. Bacteria, whose proportion decreased significantly, are arranged in ascending order, with the most significant decrease at the bottom of the table.

Maģistra darbs “Sekretorā IgA, IgG un zarnu mikrobioma mijiedarbība metformīna terapijas laikā 2. tipa cukura diabēta pacientos un veselos indivīdos” izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai estudijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autors: Līga Birzniece

24.05.2023.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai.

Darba vadītāji: Dr. biol., Monta Brīvība

24.05.2023.

Dr. biol., Ilze Elbere

24.05.2023.

Recenzents: Dr. biol., Artūrs Ābols

___.05.2023.

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

24.05.2023.

Studiju metodiķe:

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: