

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ANTIDIABĒTISKĀ MEDIKAMENTA METFORMĪNA  
IZRAISĪTĀS FUNKCIONĀLĀS IZMAIŅAS CILVĒKA  
ZARNU MIKROBIOMĀ

Bakalaura darbs

Autors:	Ilze Izabella Dindune
Stud. apl.nr.	id15012
Darba vadītājs:	MSc.biol. Ilze Elbere
Recenzents:	Dr.biol. Renāte Ranka

RĪGA 2018

## Saturs

Kopsavilkums .....	3
Summary.....	4
Darbā izmantotie saīsinājumi .....	5
Ievads.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Cilvēka mikrobioms.....	8
1.2. Zarnu mikrobioms .....	9
1.2.1. Zarnu mikrobioma vispārīgs raksturojums.....	9
1.2.2. Paraugu ievākšana, apstrāde, analīze.....	12
1.3. Cukura diabēts .....	13
1.4. Metformīns un tā darbības mehānismi .....	15
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	19
2.1. Materiāli .....	19
2.2. Metodes .....	22
2.2.1. Pētījuma dizains.....	22
2.2.3. Bakteriālās DNS izdalīšana no fēcēm, izmantojot <i>FastDNA Spin Kit for Soil</i> .....	23
2.2.4. DNS agarozes gēla elektroforēze .....	24
2.2.5. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana.....	25
2.2.6. DNS sonifikācija ar <i>Covaris</i> .....	26
2.2.7. “ <i>End repair</i> ” un inkubācija .....	26
2.2.8. Attīrīšana ar <i>NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select</i> magnētiskajām lodītēm DNS fragmentu garuma selekcijai.....	27
2.2.9. Ligēšana.....	27
2.2.10. Fragmentu selekcija pēc to garuma, izmantojot <i>BluePippin</i> instrumentu .....	28
2.2.11. Amplifikācija .....	30
2.2.12. DNS kvalitātes noteikšana, izmantojot <i>Agilent 2100</i> bioanalizatora instrumentu.....	30
2.2.13. Sekvenēšana ar <i>IonTorrent Proton</i> sekvenatoru.....	32
2.2.14. Datu analīze un statistika .....	32
3. REZULTĀTI .....	34
4. DISKUSIJA .....	41
Secinājumi .....	45
Pateicības .....	46
Izmantotās literatūras avotu saraksts .....	47

## Kopsavilkums

Metformīns ir antidiabētisks medikaments, kas samazina glikozes līmeni asinīs un nerada hipoglikēmiju, tomēr ~25% pacientu attīstās gastrointestinālas blaknes. Ir veikti pētījumi par metformīna terapijas ietekmi uz 2. tipa cukura diabēta pacientu zarnu mikrobiomu, tomēr pilnīga metformīna un zarnu mikrobioma mijiedarbības raksturojuma joprojām nav. Darba mērķis bija noskaidrot, kā metformīns ietekmē vesela cilvēka zarnu mikrobioma taksonomisko un funkcionālo profilu. Mikrobiālajai DNS no fēču paraugiem tika veikta metagenoma analīze ar lielapjoma paralēlo sekvenēšanu. Rezultāti parāda vairākas izmaiņu tendences gan taksonomisko grupu, gan signālceļu un gēnu saimju īpatsvarā jau 24 stundas pēc pirmās metformīna devas, novērotās tendences saglabāšanās arī pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas.

Bakalaura darbs tika izstrādāts no 2016. gada maija līdz 2018. gada maijam Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Atslēgas vārdi: cukura diabēts, metformīns, metagenoms, zarnu mikrobioms.

## Summary

Metformin is an antidiabetic drug used to reduce blood glucose levels without causing hypoglycaemia, however, ~25% of patients under its treatment develop gastrointestinal side effects. Studies have been carried out about metformin treatment and its effects on type 2 diabetes patients, though there is no full clarity about metformin and gut microbiome interaction. The aim of this course work was to find out how metformin affects healthy individual gut microbiome taxonomic and functional profiles. Microbial DNA obtained from faecal samples underwent metagenomic analysis performed with parallel sequencing. Results display several trends across all – taxonomic groups, pathways and gene families – beginning at 24 hours after first metformin dose, these trends are also observed after seven days of metformin use.

Bachelor thesis “The Impact on The Human Gut Microbiome’s Functional Profile Caused by The Antidiabetic Drug Metformin” was conducted at the Latvian Biomedical Research and Study Centre from May 2016 to May 2018.

Keywords: diabetes, metformin, metagenome, gut microbiome.

## Darbā izmantotie saīsinājumi

1. tabula

Saīsinājumu saraksts un atšifrējumi angļu un latviešu valodās.

Table 1

List of abbreviations and their meaning in English and Latvian.

Saīsinājums	Angliski	Latviski
<b>ACC</b>	acetyl-CoA carboxilase	acetil-CoA karboksilāze
<b>ADF</b>	adenosine di-phosphate	adenozīna di-fosfāts
<b>AMF</b>	adenosine mono phosphate	adenozīna mono fosfāts
<b>AMPK</b>	AMF-activated protein kinase	AMF-aktivētā proteīnu kināze
<b>ATF</b>	adenosine triphosphate	adenozīna tri-fosfāts
<b>bp</b>	base pairs	bāzu pāri
<b>DES</b>	DNA elutions solution – ultra pure water	ultra attīrīts ūdens
<b>DM</b>	diabetes mellitus	cukura diabēts
<b>DNS</b>	deoxyribonucleic acid	dezoksiribonukleīnskābe
<b>dNTP</b>	deoxynucleoside triphosphate	deoksiribonukleozīda trifosfāts
<b>DPP4</b>	dipeptidyl-peptidase-4	dipeptidil peptidāze-4
<b>ETDA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid	etilēndiamīntetraetiķskābe
<b>FDR</b>	false discovery rate	kļūdaino atklājumu līmenis
<b>FXR</b>	farnesoid X receptor	farnesoīda X faktors
<b>GDF</b>	guanosine-di-phosphate	guanozīn-di-fosfāts
<b>GI</b>	gastrointestinal	gastrointestināls
<b>GLP-1</b>	glucagon-like peptide-1	glikogēn-līdzīgais peptīds-1
<b>HbA1c</b>	glycosylated haemoglobin	glikētais hemoglobīns
<b>IBS</b>	irritable bowel syndrome	kairināto zarnu sindroms
<b>IGT</b>	impaired glucose tolerance	glikozes tolerances traucējumi
<b>LPS</b>	lipopolysaccharides	lipopolisaharīdi
<b>M0</b>	microbiome samples before metformin use	mikrobioma paraugi pirms metformīna lietošanas
<b>M24h</b>	microbiome samples after 24 hours of metformin use	mikrobioma paraugi pēc 24 stundu metformīna lietošanas
<b>M7d</b>	microbiome samples after 7 days of metformin use	mikrobioma paraugi pēc 7 dienu metformīna lietošanas

<b>MP</b>	microbiome sample	mikrobioma paraugs
<b>MRCC1</b>	mitochondrial respiratory chain complex -1	mitohondriālās elpošanas ķēdes komplekss-1
<b>NADH</b>	reduced nicotinamide adenine dinucleotide	reducēts nikotinamīda adenīna dinukleotīds
<b>OCT1</b>	organic cation transporter-1	organiskais katjonu transportieris-1
<b>OCT2</b>	organic cation transporter-2	rganiskais katjonu transportieris-2
<b>OGTT</b>	oral glucose tolerance test	orālais glikozes tolerances tests
<b>PERMANOVA</b>	permutational multivariate analysis of variance	permutāciju multivariācijas analīze
<b>PFGE</b>	pulsed-field gel electrophoresis	pulsējošā lauka gēla elektroforēze
<b>PĶR</b>	polimerase chain reaction	polimerāzes ķēdes reakcija
<b>PMAT</b>	plasma membrane monoamine transporter	plazmatiskās membrānas monoamīna transportieris
<b>PPS</b>	protein precipitation solution	proteīna izgulsnēšanās šķīdums
<b>RNS</b>	ribonucleic acid	ribonukleīnskābe
<b>SCFA</b>	short-chain fatty acids	Īso ķēžu taukskābes
<b>SERT</b>	serotonin transporter	serotonīna transportieris
<b>T2D</b>	Type 2 diabetes	2. tipa cukura diabēts
<b>UV</b>	ultraviolet light	ultravioletais starojums
<b>VIGDB</b>	Genome Database of Latvian Population	Valsts iedzīvotāju genoma datu bāze

## Ievads

Metformīns jeb 1,1-dimetilbiguanīds ir orāli lietojams antidiabētiskais medikaments, kas, galvenokārt, samazina glikozes līmeni asinīs un nerada hipoglikēmiju. Pēdējo 15 gadu laikā metformīns ir kļuvis par galveno 2. tipa cukura diabēta (T2D) ārstniecības un prevencijas līdzekli. Tomēr aptuveni ceturtdaļai pacientu attīstās gastrointestinālas (GI) blaknes (Gunton *et al.* 2003; Dujic *et al.* 2014; McCreight *et al.* 2016). Pētījumos aprakstīts, ka ievadot metformīnu intravenozi netiek sasniegts tikpat augsts terapeitiskais efekts, kā lietojot medikamentu orāli (Pentikäinen *et al.* 1979), līdz ar to ir izvirzīta hipotēze par iespējamo zarnu mikrobioma lomu metformīna darbības mehānismu realizēšanā.

Līdzšinējie pētījumi par metformīna terapijas ietekmi uz 2. tipa cukura diabēta pacientu zarnu mikrobiomu apraksta asociācijas starp metformīna lietošanu un paaugstinātu īso ķēžu taukskābju producējošu baktēriju īpatsvaru (piemēram, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium adolescentis*) (De La Cuesta-Zuluaga *et al.* 2017; Forslund *et al.* 2015), kā arī paaugstinātu pārstāvniecību dažādiem signālceļiem, kas, piemēram, atbild par lipopolisaharīdu sintēzi, butirātu un piruvātu metabolismu (Wu *et al.* 2017). Tomēr vairāki metformīna darbības mehānismi joprojām nav izskaidroti un ir nepieciešama tālāka zarnu mikrobioma kompozīcijas un funkcionalitātes analīze metformīna lietošanas laikā, lai pilnveidotu šīs zināšanas un nodrošinātu iespēju personalizētai terapijai.

**Darba mērķis:** Noskaidrot, kā antidiabētiskais medikaments metformīns ietekmē vesela cilvēka zarnu mikrobioma funkcionālo un taksonomisko profilu.

Konkrētā mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi**:

- Novērtēt un vispārīgi raksturot pētījuma dalībnieku zarnu mikrobioma funkcionalitāti un savstarpējo līdzību;
- Analizēt metformīna ierosinātās zarnu mikrobioma kompozīcijas izmaiņas dažādos taksonomiskajos līmeņos;
- Raksturot cilvēka zarnu mikrobioma funkcionālā profila izmaiņas metformīna lietošanas ietekmē.

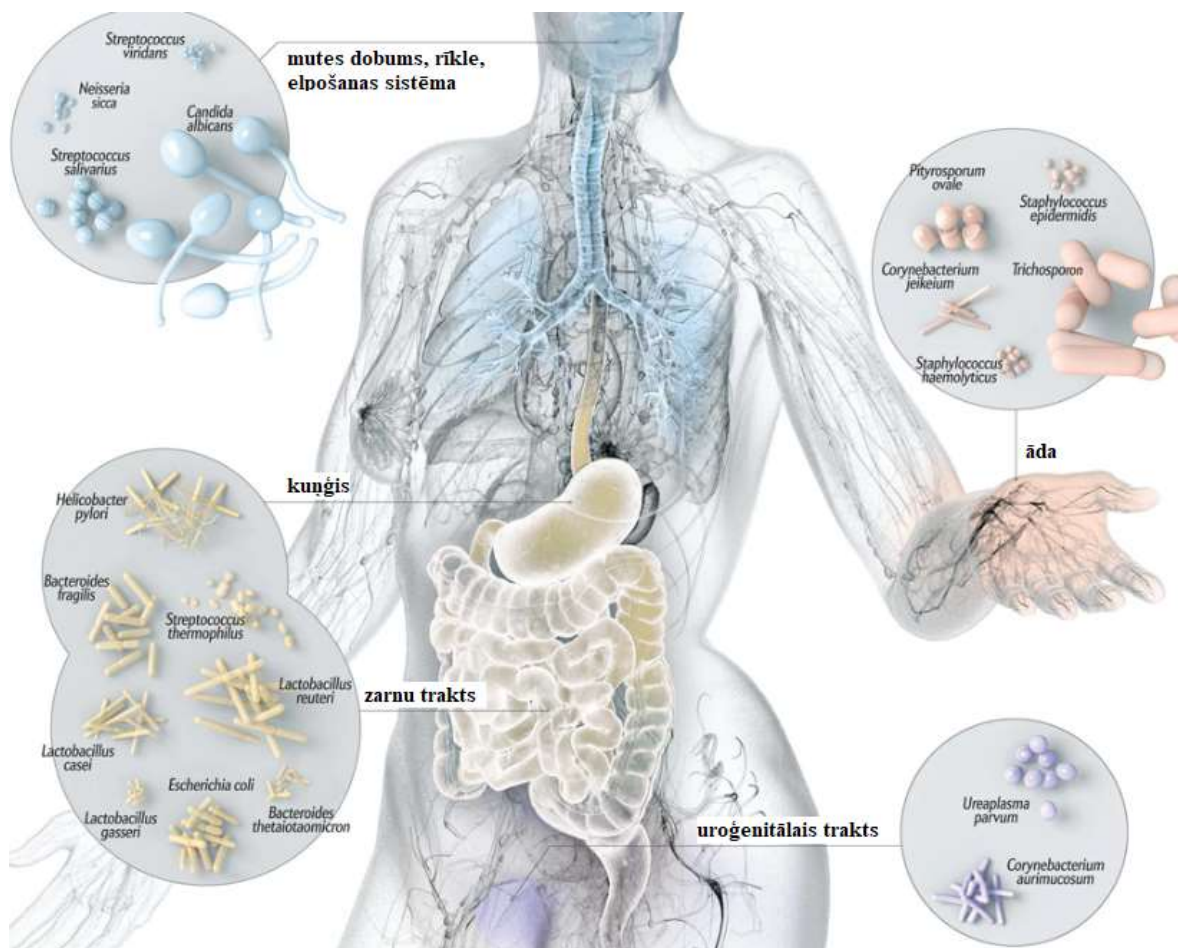
# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Cilvēka mikrobioms

Pēc piedzimšanas pirmo dzīves gadu laikā cilvēka organismu kolonizē baktērijas, arheji, sēnes un vīrusi, ieņemot tādas nišas kā ādas virsma, zarnu trakts, mutes dobums un citas. Sabiedrību, kas veidojas no mikroorganismiem, sauc par cilvēka mikrobiomu. Tas satur aptuveni tikpat daudz šūnu, cik ir cilvēka organismā, kodējot ap 100 reižu vairāk unikālu gēnu nekā mūsu organisms (Qin *et al.* 2010; Huttenhower *et al.* 2012; Sender *et al.* 2016). Cilvēka mikrobioma pētījumos ir atklāts, ka pat vispārēji veseliem cilvēkiem, savstarpēji būtiski atšķiras mikroorganismu daudzveidība, kas apdzīvo zarnu traktu, ādas virsmu, maksti vai citas lokalizācijas. Daudzi no šiem dažādību ietekmējošiem faktoriem vēl nav izskaidroti, taču ir zināms, ka diētai, vides apstākļiem, saimniekorganismu raksturojošiem ģenētiskiem faktoriem un pakļaušanai agrīnai mikrobu ietekmei ir būtiska nozīme mikroorganismu sabiedrības stabilitātes regulācijā (Huttenhower *et al.* 2012). Uzturs, iedzimtība, un zarnu mikrobioms ir metaboliskā statusa noteicēji, galvenokārt, zarnu mikrobioma producēto metabolītu dēļ (Fujisaka *et al.* 2018).

No ekoloģiskā viedokļa, sabiedrības stabilitāte (bakteriālas vai kādas citas) var tikt uzskatīta par funkcionējošas kopienas veselības aprakstošu īpašību. Stabilitāte ir attiecināma uz kopienas spējām pretoties vides pārmaiņām un stresam jeb pretestību, vai arī spējai atgriezties līdzsvara stāvoklī pēc apkārtējās vides inducētas krīzes jeb izturību. Šie jēdzieni – pretestība un izturība – ir attiecināmi arī uz cilvēka mikrobiomu un saskan ar mikroorganismu ekoloģijas principiem (Bäckhed *et al.* 2012).

Vienā organisma daļā esošo mikroorganismu daudzveidības stabilitāti var aprakstīt ar to skaitlisko daudzumu un izplatīšanos citās cilvēka organisma nišās. Šādas stabilitātes izmaiņas ir sasaistītas ar dažādām slimībām, piemēram, zema mikrobioma daudzveidība zarnās ir asociēta ar aptaukošanās un iekaisīgu zarnu slimībām (Huttenhower *et al.* 2012; Hildebrandt *et al.* 2009). Tāpat, izmaiņas mikroorganismu īpatsvarā un daudzveidībā var paaugstināt cilvēka organisma uzņēmību pret infekcijām vai citām slimībām. Piemēram, infekciju risku saskaroties ar patogēniem var paaugstināt antibiotiku izraisītas izmaiņas zarnu mikrobiotā (Bäckhed *et al.* 2012).



1.attēls. Vispārīgs cilvēka mikrobioma raksturojums, kas iekļauj galvenās mikrobioma nišas cilvēka organismā un to galvenos pārstāvjus ar lielāko skaitlisko īpatsvaru. Attēls adaptēts no Anonymous 2017a.

Figure 1. General characterization of the human microbiome, involving the main microbiome locations in the human body and its main representatives after numeric values. Figure adapted from Anonymous 2017a.

## 1.2. Zarnu mikrobioms

### 1.2.1. Zarnu mikrobioma vispārīgs raksturojums

Zarnu mikrobioms ir dinamisks, vitāli svarīgu mikroorganismu kopums, kura sastāvu un funkcijas ietekmē vairāki faktori – ģenētiskā iedzimtība, apkārtējā vide, uzturs, slimības u.c. Mikrobiālā kompozīcija GI traktā atšķiras dažādos zarnu nodaļumos un starp indivīdiem. Kopējais zarnu mikrobioma pārstāvju daudzums pārsniedz visa cilvēka organisma šūnu skaitu, un tajā ietilpst vairāk nekā 500 mikroorganismu ģintis, veidojot 35-50% no zarnu tilpuma. Pie zarnu mikrobioma funkcijām pieder pareizas imūnsistēmas darbības nodrošināšana un

stimulācija ar specifisku baktēriju ģinšu producētu vielu starpniecību, epitēlijšūnu proliferācijas un diferenciācijas kontrole, svarīgu, gļotādas šūnām nepieciešamu, barības vielu produkcija, piemēram, īso-ķēžu taukskābju (SCFA), aminoskābju sintēze un uzturvielu šķelšana (Tappenden *et al.* 2007).

Pirmā dzīves gada beigās, katra bērna GI trakta kompozīcija, lai arī atšķirīga, jau līdzinās pieauguša cilvēka GI trakta profilam (Palmer *et al.* 2007). Līdz pat trīs gadu vecumam, radikālas pārmaiņas uzturā (saistītas ar pāriešanu no mātes piena uz cieto barību), antibiotiku lietošana un izmaiņas saimniekorganisma fizioloģijā veicina zarnu mikrobioma dinamisko sastāvu (Koenig *et al.* 2011).

Ar cilvēka zarnu mikrobiomu saistītie pētījumi iedala indivīdus enterotipos vai grupās, atkarībā no to GI trakta baktēriju kopuma. Enterotipu klasifikācija ir atkarīga no specifisku baktēriju ģinšu īpatsvara attiecībām zarnu mikrobiomā – *Bacteroides* (pirmais enterotips), *Prevotella* (otrais enterotips) un *Ruminococcus* (trešais enterotips) (Arumugam *et al.* 2013). Pētījumos minēts, ka cilvēkiem, kuru diētā vairāk dominē dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielas un tauki, *Bacteroides* īpatsvars ir lielāks nekā to diētu pārstāvjiem, kurās dominē ogļhidrāti – līdz ar to ir lielāks *Prevotella* daudzums (Wu *et al.* 2012). Par visbiežāko enterotipu uzskata trešo, kas bagāts ar *Ruminococcus*, kā arī *Akkermansia* - abas ģintis spēj degradēt mucīnu (Arumugam *et al.* 2013). Daži jaunākie pētījumi gan apstrīd termina ‘enterotips’ pareizību, minot, ka mikrobiomā nav viendabīga sadalījuma bakteriālajās kopās, kas atbilstu noteiktam enterotipam (Gorvitovskaia *et al.* 2016).

Raksturojot zarnu mikrobioma augstākos taksonomiskos līmeņus, galvenie baktēriju tipi ir *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* un *Fusobacteria* (Hermann-Bank *et al.* 2013). *Firmicutes* ir gram-pozitīvu baktēriju tips, kura klašu piemēri ir *Clostridia* un virkne laktātu producējošas baktērijas. Piemēram, *Lactobacillus* un *Leuconostoc spp.* ir galvenās zarnās sastopamās laktātu producējošās baktērijas, bet *Actinobacteria* ir gram-pozitīvas baktērijas ar augstu G+C bāzu sastāvu genomā, ieskaitot *Colinsella* un *Bifidobacterium spp.* Laktātu producējošās un *Bifidobacteria* ir svarīgas zarnu mikrobioma sastāvā esošas baktēriju grupas, kuras mantojam no mātes mikrobioma vai uzņemam ar pārtiku (Vaughan *et al.* 2005).

Interesanti arī, ka, piemēram, ietekmi uz zīdaiņu zarnu mikrobioma kompozīciju rada saskarsmes biežums ar mājdzīvniekiem. Tā variē atkarībā no piedzimšanas veida, taču pieminams, ka pakļaušana mājdzīvnieku klātbūtnei palielina divu baktēriju grupu – *Ruminococcus* un *Oscillospira* – daudzumu. Šīm baktērijām novērota negatīva korelācija starp to īpatsvaru un bērnu atopiju un aptaukošanos (Tun *et al.* 2017).

Pēdējo 20 gadu laikā ir strauji palielinājusies interese par zarnu mikrobioma kompozīciju un funkcijām, sekvenēšanas metožu attīstības un pieejamības dēļ (Derrien *et al.* 2015). Pateicoties plašam un koncentrētam mikroorganismu gēnu katalogam, kas iegūts no zarnu mikrobioma pētījumiem, šobrīd ir pieejama iespēja identificēt baktēriju funkcijas, kuras ir specifiskas eksistencei zarnu vidē (De La Cuesta-Zuluaga *et al.* 2017). Funkciju kopumu, kas nodrošina mikroorganismu dzīvot un attīstīties spēju zarnu vidē, sauc par minimālo zarnu mikrobioma genomu, bet tās baktēriju funkcijas, kas nepieciešamas homeostāzes nodrošināšanā visai ekosistēmai un kuru komponentus kodējošie gēni ir sastopami dažādām sugām, sauc par minimālo zarnu mikrobioma metagenomu. Paredzams, ka minimālais genoms ir sastopams lielākajā daļā vai visās zarnu baktēriju sugās, bet minimālais metagenoms – lielākajā daļā vai visos cilvēka zarnu mikrobioma paraugos. Lai noteiktu minimālā genoma kodētās funkcijas, pieņem, ka tās kodējošie gēni atrodami lielākajai daļai baktēriju sugu un tāpēc frekvence gēnu katalogā būtu augstāka nekā gēniem, kas atbild par tikai atsevišķiem mikroorganismiem piemītošām funkcijām (Qin *et al.* 2010).

Pētījumos tiek arī definētas divas svarīgākās baktēriju funkciju grupas: (1) kas nepieciešamas visām baktērijām un (2) tās, kuras ir specifiskas zarnu traktam. Pirmās kategorijas funkcijas saistītas ar galvenajiem metabolajiem ceļiem – centrālajiem oglekļa signālceļiem, aminoskābju sintēzi, un nozīmīgiem proteīnu kompleksiem – ribonukleīnskābju (RNS) un dezoksiribonukleīnskābju (DNS) polimerāzēm, adenozin-tri-fosfāta (ATF) sintēzi –, proteīniem, kas iesaistīts dažādu vielu sekrēcijā (Qin *et al.* 2010). Otrās kategorijas funkcijas zarnu traktā dzīvojošie mikroorganismi, kuri potenciāli sastāda minimālo zarnu mikrobiomu, galvenokārt izmanto enerģijas ieguvei fermentācijas procesos, daļēji pārvēršot cukurus par SFCA. Kā piemērus būtiskām SCFA var minēt acetātu, kas ir svarīgs muskuļu, sirds un smadzeņu šūnām (Wong *et al.* 2006), turpretī propionāts piedalās aknu glikoneoģenēzes procesos, kamēr butirāti ir nepieciešami enterocītu proliferācijā un darbībā (Hamer *et al.* 2008).

Zarnu mikrobioms ir svarīgs priekšnosacījums organisma dzīvotspējai, līdz ar to izmaiņas tā taksonomiskajā un/vai funkcionālajā sastāvā bieži tiek asociētas ar dažādām slimībām. Diēta ir viens no būtiskākajiem faktoriem, kas ietekmē zarnu mikrobiomu. Uzturs ar augstu tauku saturu, it sevišķi piesātinātajām un trans-taukskābēm, ir saistīts ar aptaukošanos, metabolo sindromu un GI saslimšanām. Pētījumos pierādīts, ka augsta tauku satura diēta palielina *Firmicutes*, bet samazina *Bacteroidetes* bagātību cilvēka zarnu traktā, bet, iespējams, ka ievērojot zema tauku satura diētu var novērot tieši pretēju efektu. Tas liecina par to, ka palielināts *Bacteroidetes* daudzums un noteiktai diētai raksturīgas izmaiņas zarnu mikrobiomā var tikt asociētas ar imūnsistēmas, metabolisma un zarnu darbības traucējumiem (Zhang *et al.* 2015). Rietumu populācijās arī novērojama zemāka *Prevotella*, bet lielāka *Bacteroides* un

*Bifidobacterium* sastopamība, jāmin arī, ka Rietumu diēta samazina *Cantenibacterium*, *Succinovibrio* un *Treponema* daudzumu zarnās (Amato *et al.* 2015). GI traktā sastopamā *Treponema* parasti atrasta ne-cilvēku primātos, kā arī cilvēku pētījumos, pieņemot, ka minētās baktērijas ir artefakti, kas mitinās pilsētu un rūpniecisko sabiedrību populācijās (Obregon-Tito *et al.* 2015). Interesanti, ka nesēnā pētījumā saistībā ar autismu un zarnu traktu problēmām, zinātnieki atklājuši, ka autisma pacientiem ir izteikti mazāk dažāda zarnu mikrobiālā kompozīcija, ar zemākiem *Prevotella*, *Coprococcus*, kā arī neklasificētā *Veillonellaceae* daudzumiem (Kang *et al.* 2013).

GI traktā mītošās mikrobiālās sabiedrības (rezident-sabiedrības) tiek regulāri pakļautas alohtonisku baktēriju, kuras tiek uzņemtas ar uzturu, ietekmei. Neskatoties uz rezident-sabiedrību rezistenci pret uzņemto baktēriju kolonizācijas mēģinājumiem, daudzas ar uzturu uzņemtās baktērijas spēj īslaicīgi integrēties zarnu mikrobioma sastāvā, kur tās var ietekmēt tā kompozīciju un rezident-baktēriju aktivitāti. Tādējādi šīs baktērijas var uzskatīt par “pārejošā” jeb tranzīt-mikrobioma pārstāvēm, šim mikrobiomam esot pietiekami dinamiskam un individuālam. Pie iepriekšminētajām baktērijām, galvenokārt, pieder bifidobaktērijas, laktātu producējošas baktērijas, kā arī propionibaktērijas. Šīs baktērijas visbiežāk sastopamas fermentētos ēdienos un probiotiķu sastāvā, tādēļ kvantitatīvi pieskaitāmas pie biežāk uzņemtajām baktērijām (Derrien *et al.* 2015). Pētījumos, kur piedalījušies kairinātā zarnu sindroma (IBS) pacienti, noskaidrots, ka fermentēti piena produkti, kura sastāvā ir *Bifidobacterium animalis*, salīdzinot ar parastiem piena produktiem, stiprina butirātu un citu SCFA ražošanu zarnās, kā arī samazina oportunistiskā patogēna *Bilophila wadsworthia* daudzumu, tādējādi samazinot IBS simptomus. Zināmu un *de novo* sugu metaboliskā rekonstrukcija liecina par iespējamu mijiedarbību starp rezident-baktērijām un ar uzturu uzņemtajām baktērijām, kas varētu būt nozīmīgs faktors kopējai zarnu homeostāzei. Tiek uzskatīts, ka pārejošā mikrobioma baktērijām ir maza ietekme uz zarnu mikrobioma funkcionalitāti, taču drīzāk nodrošina labvēlīgu ietekmi uz zarnu mikrobiomu (Veiga *et al.* 2015). Zarnu mikrobioma sastāva, kā arī mikroorganismu daudzveidības un funkcionalitātes noteikšana ir nepieciešama, lai labāk izprastu un varētu pielietot zināšanas par zarnu mikrobioma ietekmi uz cilvēka veselību un labklājību (Qin *et al.* 2010).

### **1.2.2. Paraugu ievākšana, apstrāde, analīze**

Lai analizētu cilvēka mikrobiomu, nepieciešams ievākt atbilstošus paraugus, kas zarnu mikrobioma gadījumā ir fēču paraugi vai zarnu biopsijas (Tyler *et al.* 2014). Fēču paraugi precīzāk reprezentēs zarnu lūmenu, bet biopsijas – ar zarnu gļotādu asociētos mikrobioma pārstāvjus. Tāpat ir būtiski uzsvērt, ka fēču paraugu iegūšana ir neinvazīva. Toties neskatoties

uz būtiskās informācijas potenciālu biopsiju paraugos, tos ir grūti iegūt un pacientiem tiek doti caurejas līdzekļi, kas var ietekmēt kompozīciju iegūtajā paraugā (Donaldson *et al.* 2015).

Sākotnēji mikrobioma analīzes metodes tiek iedalītas kultūras-atkarīgās un kultūras-neatkarīgās. Kultūras-atkarīgās metodes ietver atsevišķu mikroorganismu kultivēšanu laboratorijas apstākļos. Tomēr lielākā daļa zarnu mikrobioma pārstāvju joprojām nav izaudzēti mākslīgos apstākļos, jo nav zināmas to augšanas prasības un vajadzības kompleksai mijiedarbībai ar citiem zarnu mikrobioma pārstāvjiem, bez kurām nav iespējama to izdzīvošana (Lau *et al.* 2016). Šis trūkums ir viens no iemesliem, kas veicināja kultūras-neatkarīgo metožu attīstību. Divas galvenās kultūras-neatkarīgās metodes mikrobioma analīzei ir marķierģēnu amplikonu (piemēram, 16S ribosomālā RNS (rRNS) gēna) vai visa mikrobiālā DNS (metagenoma jeb *shotgun*) sekvenēšana (Jovel *et al.* 2016).

16S rRNS ir marķierģēns, kuram ir deviņi variabli reģioni, izmantojami prokariotu klasifikācijai. Katrs reģions nodrošina atšķirīgu taksonomiskās izšķirtspējas dziļumu. Metodes galvenie trūkumi ir nedefinētais gēna kopiju skaits katrā šūnā, un ne visi variablie reģioni ir ar pietiekami labu izšķirtspēju visām taksonomiskajām grupām. Tāpat arī rezultāti var būt pielietoto polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) oligonukleotīdu specifiski. Kā alternatīva metode eikariotisko mikrobioma pārstāvju identificēšanai tiek izmantota 23S rRNS marķierģēna analīze (Cox *et al.* 2013; Chakravorty *et al.* 2007).

Turpretī metagenomika ļauj pētīt mikroorganismu funkcijas jeb mikrobiomā pārstāvētos signālceļus, gēnu saimes, kā arī taksonomisko informāciju (Arumugam *et al.* 2013). Metagenoma sekvenēšana ir spēcīga alternatīva 16S rRNS sekvenēšanai, īpaši analizējot sarežģītas mikrobiālās sabiedrības. Īso-nolasījumu metagenomisko sekvenēšanu var izmantot ekoloģiski komplicētu paraugu ģenētiskā potenciāla vispārīgam raksturojumam (Qin *et al.* 2010). Šīs metodes trūkumi ir vēl nepilnīgās datubāzes, tā ir dārgāka par 16S rRNS marķierģēna izmantošanu, kā arī potenciāls cilvēka DNS piejaukums paraugos (Methé *et al.* 2012). Mūsdienās populāri ir kombinēt metagenoma analīzi ar proteomiku, metabolomiku, transkriptomiku u.c. metodēm, lai iegūtu pilnvērtīgāku priekšstatu par zarnu mikrobiomu, tā funkcijām un mijiedarbību ar samniekorganismu un vides apstākļiem (Qin *et al.* 2010).

### 1.3. Cukura diabēts

Cukura diabēts (lat. *diabetes mellitus*) (DM), ir vairāku vielmaiņas slimību kopums, kuru galvenā pazīme ir hiperglikēmija jeb paaugstināts glikozes līmenis asinīs. Cukura diabēta diagnostikas galvenie kritēriji (skatīt 2.tabulu): (1) glikozes līmenis asins plazmā tukšā dūšā (vismaz astoņu stundu ilgs periods bez kaloriju uzņemšanas) virs 7.0 mmol/l, (2) divu stundu laikā pēc orālā glikozes tolerances testa glikozes mērījums virs 11.1 mmol/l, (3) glikozes

līmenis asins plazmā virs 11.1 mmol/l, neatkarīgi no tā, pirms cik ilga laika tikusi ieturēta maltīte, kā arī (4) hiperglikēmijas simptomi. Galvenie neārstētas hiperglikēmijas simptomi ietver regulāru urinēšanu (poliūriju), izteiktas slāpes vai palielinātu šķidruma uzņemšanu (polidipsiju), neizskaidrojamu svara zudumu, palielinātu ēstgribu (polifāģiju), kā arī redzes traucējumus. Akūta hiperglikēmija var izraisīt dzīvībai bīstamas sekas – ketoacidozi vai neketonisko hiperosmolāro sindromu, kas var radīt smagu organisma dehidrāciju. Ilgtermiņā hiperglikēmija ir saistīta ar dažādu orgānu – galvenokārt acu, nieru, nervu, sirds un asinsvadu – bojājumiem un darbības traucējumiem (American Diabetes Association 2010).

Aptuveni 59.8 miljoni jeb 9% eiropiešu vecumā no 20 līdz 79 gadiem, ieskaitot 23.5 miljonus nediagnosticētu slimnieku, slimo ar DM. Paredzams, ka līdz 2040.gadam DM slimnieku skaits Eiropā varētu sasniegt 10.7%. Tiek uzskatīts, ka 31.7 miljoni jeb 4.8% no eiropiešiem dzīvo ar glikozes tolerances traucējumiem (IGT) un ir 2.tipa cukura diabēta riska grupā. Ik gadu no DM Eiropas reģionā mirst aptuveni 627 000 cilvēku, 26.3% no tiem ir zem 60 gadu vecuma (Anonymous 2015).

Cilvēka organismā aizkuņģa dziedzerī ir  $\beta$ -šūnas, kuru galvenā loma ir ražot, glabāt un sekretēt hormonu insulīnu. Kad organismā strauji pieaug glikozes līmenis, piemēram, gremošanas procesu laikā, notiek atbildes reakcija, un  $\beta$ -šūnas izdala insulīna rezerves, vienlaicīgi palielinot tā produkciju. Šī atbildes reakcija veseliem cilvēkiem aizņem apmēram desmit minūtes (Gong *et al.* 2012). DM attīstās defektīvas insulīna sekrēcijas, traucētas tā darbības, vai abu faktoru kombinācijas dēļ. Cukura diabēts tiek iedalīts vairākos veidos, no kuriem biežāk sastopamie ir 1.tipa cukura diabēts (T1D), 2.tipa cukura diabēts (T2D), kā arī gestācijas cukura diabēts (American Diabetes Association 2010).

Aptuveni 5-10% visu cukura diabēta pacientu slimo ar T1D, kas attīstās autoimūnas  $\beta$ -šūnu iznīcināšanas dēļ. Visstraujāk  $\beta$ -šūnu iznīcināšana noris bērniem un jauniešiem, lēnāk – pieaugušajiem, un šis process rezultējas ar absolūtu insulīna trūkumu un insulīna terapijas nepieciešamību. Dažiem pacientiem, it sevišķi bērniem, var būt smagi simptomi slimības sākumstadijā, tādi kā ketoacidoze, un infekciju slimību gadījumā var krasi iestāties izteikta hiperglikēmija (American Diabetes Association 2010).

Visizplatītākais no cukura diabēta veidiem ir T2D, ar kuru slimo ~90-95% no visiem DM slimniekiem. T2D pacientiem novērojama insulīna rezistence, un parasti ir relatīvs (nevis absolūts kā T1D gadījumā) insulīna trūkums, līdz ar to nav nepieciešama insulīna terapija. Lielākā daļa šī tipa slimnieku ir ar lieko svaru (BMI>30), jo aptaukošanās, it īpaši palielināta tauku masa ap iekšējiem orgāniem, ir viens no galvenajiem faktoriem, kas izraisa insulīna rezistenci. Citi T2D riska faktori ietver novecošanos, nepietiekamu fizisko aktivitāšu un intensitātes daudzumu, kā arī nesabalansētu uzturu (Goodpaster *et al.* 1999). Tāpat tiek

uzskatīts, ka viens no svarīgākajiem faktoriem, kas veicina T2D un arī IGT prevalences pieaugumu, ir populācijas novecošanās – 30.8% no visas Eiropas populācijas ir vecumā starp 50 un 79 gadiem (Anonymous 2015).

Gestācijas cukura diabēts ir jebkuras pakāpes glikozes nepanesamība ar pirmo uzliesmojumu grūtniecības laikā. Šī cukura diabēta paveida sastopamība ir no 1 līdz 14 %, atkarībā no pētītās populācijas. Citi, retāk sastopami, veidi ietver cukura diabētu, kuru izraisa ģenētiski defekti  $\beta$ -šūnās vai insulīna darbībā, punktveida mutācijas mitohondriālajā DNS, dažādas aizkuņģa dziedzera slimības, endokrinopātijas, vīrusi (citomegalovīruss, adenovīruss un citi), dažādu medikamentu vai ķīmisku vielu lietošana un citi faktori (American Diabetes Association 2010).

2.tabula

Kritēriji cukura diabēta diagnozes noteikšanai.

Table 2

Diagnostic criteria for diabetes mellitus.

Diagnoze	Glikoze plazmā tukšā dūšā	2h glikoze (OGTT)*
Traucēta glikēmija tukšā dūšā	6.1 - 6.9 mmol/l (110–125 mg/dl)	< 7.8 mmol/l (140 mg/dl)
Glikozes tolerances traucējumi	< 7.0 mmol/l (126 mg/dl)	7.8 - 11.0 mmol/L
Diabēts	$\geq 7.0$ mmol/l (126mg/dl)	$\geq 11.0$ mmol/l (200mg/dl)
	<b>HbA1c** <math>\geq 6.5\%</math></b>	

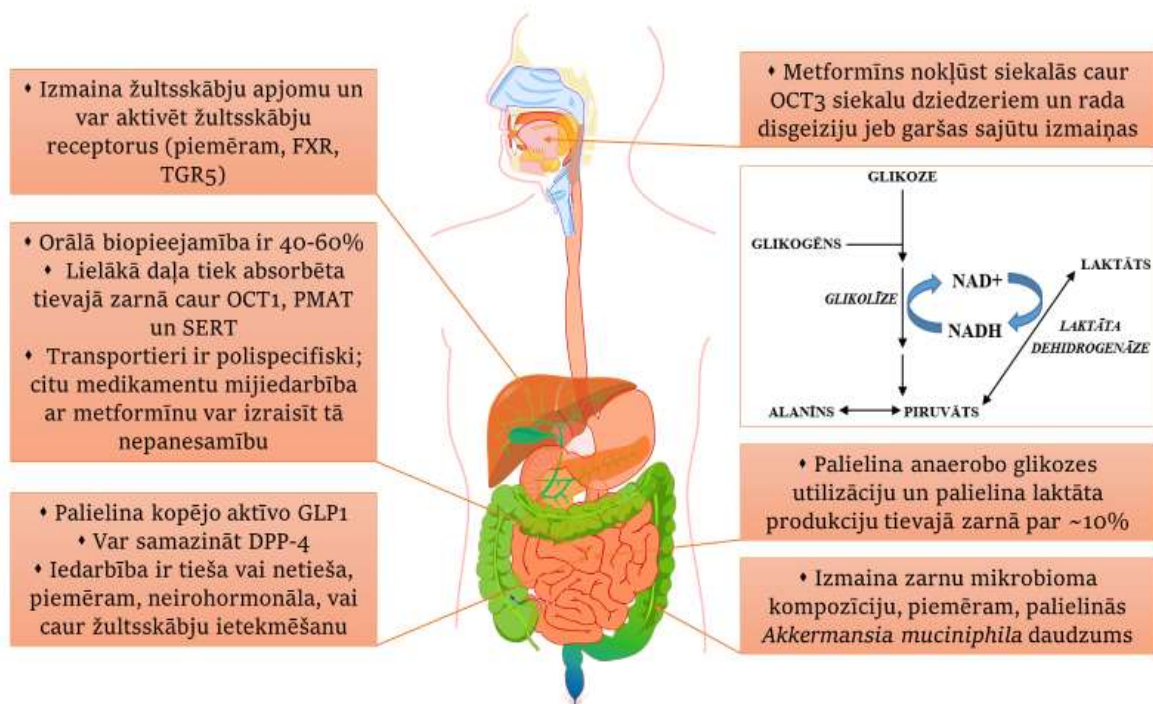
\*OGTT – Orālais glikozes tolerances tests: glikozes mērījumi plazmā 2h pēc 75g glikozes uzņemšanas;

\*\*HbA1c - glikētais hemoglobīns. Adaptēts pēc (World Health Organization, 2006).

#### 1.4. Metformīns un tā darbības mehānismi

Metformīns jeb 1,1-dimetilbiguanīds ir orāli lietojams antidiabētiskais medikaments, kas, galvenokārt samazina glikozes līmeni asinīs. Pēdējo 15 gadu laikā metformīns ir kļuvis par galveno T2D ārstniecības un prevencijas līdzekli. Plaši atzīts, ka metformīns uzlabo glikēmijas kontroli ar augstu drošuma profilu, svara nemainīguma vai samazināšanas efektu, nerada hipoglikēmiju, samazina mirstību no kardiovaskulārajām slimībām, kā arī ir relatīvi lēts (McCreight *et al.* 2016; Gunton *et al.* 2003). Metformīna izraisītās nevēlamās GI blaknes terapijas laikā attīstās aptuveni ceturtdaļai pacientu, un aptuveni 5% pacientu metformīna nepanesamības dēļ pārtrauc terapiju. Biežākie metformīna izraisītie GI simptomi ietver sliktu dūšu, caureju, vemšanu, vēdera pūšanos un vēdersāpes (Dujic *et al.* 2014).

Zīdītājos metformīna biopieejamība sasniedz 50%, un visvairāk tas tiek absorbēts tievajā zarnā, turpinot ceļu uz aknām, pēc tam tiek izfiltrēts caur nierēm un no organisma izvadīts ar urīnu un fecēm (2.attēls). . Piemēram, pētījumos aprakstītas kavētās iedarbības metformīna tabletes, kuru dēļ metformīna uzsūkšanās organismā notiek tikai, kad tabletes sasniegušas zarnu (Goodyear *et al.* 2001). Cilvēka organismā metformīns netiek metabolizēts un tā struktūra nemainās no uzņemšanas līdz izvadīšanai (Song 2016 a). Fizioloģiskos apstākļos metformīns eksistē pozitīvi lādētā protonu formā, kā rezultātā plazmatisko membrānu spēj šķērsot pasīvi difundējot. Turpretī tā intracellulārais transports notiek pateicoties organisko katjonu transportierim 1 (OCT1) aknās vai organisko katjonu transportierim 2 (OCT2) nierēs. Kad metformīns nokļūst citosolā, mitohondriji kalpo kā primārais mērķis, jo pozitīvā lādiņa dēļ mitohondriju matriksā notiek tā uzkrāšanās. Medikamenta apolārā ogļūdeņraža sānu ķēde nodrošina metformīna saistīšanos pie hidrofobām struktūrām, kā piemēram, mitohondriju membrānās esošajiem fosfolipīdiem. Kaut gan precīzi metformīna molekulārie darbības mehānismi nav zināmi, ir pierādīts, ka tas inhibē mitohondriālo elpošanas ķēdes kompleksu 1 (MRCC1), neietekmējot pārējās mitohondriju funkcijas. Metformīns līdz ar to netieši samazina NADH oksidāciju, protonu sūkņēšanu pāri mitohondriālajai membrānai, skābekļa patēriņu, novedot pie mazāka protonu gradienta, līdz ar to samazinot adenozīna trifosfāta (ATF) no adenozīna difosfāta (ADF) sintēzi un neorganisko fosfātu sintēzi (Viollet *et al.* 2012). Adenozīna monofosfāta (AMF) aktivētā proteīnu kināze (AMPK) ir svarīgs taukskābju un glikozes metabolisma regulētājs, un antidiabētiskais medikaments metformīns aktivē AMPK aknās, kā rezultātā acetil-CoA karboksilāzes (ACC) aktivitāte tiek samazināta, palielinās taukskābju oksidācija, kā arī tiek nomākta lipoģenēzes enzīmu ekspresija (Goodyear *et al.* 2001). AMPK aktivācija tiek tieši saistīta ar metformīna plejotropiskajiem efektiem. Tā ir filoģenētiski konservatīva serīna/treonīna proteīnkināze, kas aizsargā šūnu funkciju veiksmīgu darbību ierobežotos enerģijas pieejas apstākļos. AMPK aktivācija notiek metformīna sekundārās darbības ietekmē, palielinoties iekššūnas AMF un ATF attiecībai. Aktivētā stāvoklī AMPK pārslēdz šūnas no anaboliska uz katabolisku stāvokli. Rezultātā glikozes, lipīdu un proteīnu sintēze, kā arī šūnu augšana tiek inhibēta, bet taukskābju oksidācija un glikozes uzņemšana šūnās tiek stimulēta, tādējādi panākot glikozes līmeņa asinīs samazināšanos (Viollet *et al.* 2012).



2.attēls. Metformīna iedarbība uz cilvēka organismu, tās piemēri. (DPP4 – dipeptidil peptidāze-4; FXR – farnesoīda X faktors; GLP-1 – glikagonam-līdzīgais peptīds – 1; OCT – organisko katjonu transporteris; PMAT – plazmatiskās membrānas monoamīna transporteris; SERT – serotonīna transporteris. Adaptēts pēc (McCreight *et al.* 2016).

Figure 2. Examples of the actions of metformin within the GI tract. (DPP4 – dipeptidyl-peptidase-4; FXR – farnesoid X receptor; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; OCT – organic cation transporter; PMAT – plasma membrane monoamine transporter; SERT – serotonin transporter. Adapted from (McCreight *et al.* 2016).

Medikamenta koncentrācija hepatocītos ir augsta, tādēļ aknas tiek uzskatītas par tā darbības primāro lokalizāciju, taču pētījumi liecina, ka metformīna terapeitisko efektu sasniegšanai būtiski ir arī tā darbības mehānismi cilvēka zarnās. Tās ir noderīgas pacientiem ar metformīna izraisītās laktacidozes risku, nieru darbības traucējumiem, kardiovaskulārām disfunkcijām, kā arī īslaicīgu dehidrāciju (Goodyear *et al.* 2001).

Antidiabētiskā medikamenta metformīna ietekme uz cilvēka zarnu traktu nav skaidra, taču zināms, ka tas palielina glikozes uzņemšanu zarnās, līdz ar to, palielinot laktāta koncentrāciju enterocītos, kas var sekmēt metformīna nepanesamību (Bailey *et al.* 2008) un izraisīt laktacidozi (Lalau 2010). Metformīns rada pastiprinātu GI hormonu vai peptīdu, kas satur GLP-1, sekrēciju, ietekmē žultsskābju enterohepatisko cirkulāciju (kas var ietekmēt fēču

konsistenci, holesterola līmeni), kā arī maina zarnu mikrobioma kompozīciju, tādējādi uzlabojot glikozes līmeņa asinīs samazināšanu vai veicinot metformīna nepanesamību (McCreight *et al.* 2016; Song 2016).

Mūsdienās pieaug metformīna izmantošana arī citu terapeitisku mērķu sasniegšanai. Piemēram, ir zināms, ka cilvēka vēža šūnās metformīns inhibē MRCC1 (NADH dehidrogenāzes) aktivitāti un šūnu elpošanu. Tas inhibē šūnu proliferāciju glikozes klātbūtnē, bet izraisa šūnu nāvi, kad ir zems glikozes līmenis (Wheaton *et al.* 2014). Pētījumos pierādīts, ka metformīnam ir zināma ietekme arī uz neurodeģeneratīvām slimībām, piemēram, Alcheimera slimniekos samazinot oksidatīvo stresu, līdz ar to šūnu bojāeju (Rojas *et al.* 2013). Metformīns regulē sistēmisko metabolismu un palēnina novecošanos *Caenorhabditis elegans* ietekmējot mikrobiālā folāta un metionīna metabolismu, norādot uz iespējami svarīgo metformīna lomu zarnu mikrobiomā un šīs mijiedarbības ietekmi uz cilvēka vielmaiņu (Song 2016 a).

Metformīnu bieži apraksta kā insulīna jutīguma palielinātāju, kas noved pie insulīna rezistences samazināšanās. To var izskaidrot ar metformīna pozitīvo ietekmi uz insulīna receptoru ekspresiju un tirozīnkināzes aktivitāti (Gunton *et al.* 2003). Metformīna pozitīvais efekts uz asinīs cirkulējošām taukskābēm samazina arī aptaukojušās aknas simptomus (Goodyear *et al.* 2001).

Līdzšinējie pētījumi par metformīna terapijas ietekmi uz T2D pacientu zarnu mikrobiomu apraksta asociācijas starp metformīna lietošanu un paaugstinātu SCFA producējošu baktēriju īpatsvaru (piemēram, *Akkermansia* spp.), arī *Escherichia coli*, *Intestinibacter* spp., *Bifidobacterium adolescentis*, kā arī izmaiņām dažādos zarnu mikrobioma pārstāvju veidotajos signālceļos, kas atbildīgi par LPS sintēzi, butirātu un piruvātu metabolismu. Papildus novērots arī pieaugums signālceļos, kas saistīti ar kofaktoru un vitamīnu metabolismu (Forslund *et al.* 2015; De La Cuesta-Zuluaga *et al.* 2017; Wu *et al.* 2017).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

3. tabula

Izmantotās aparatūras uzskaitījums.

Table 3

List of equipment used.

<b>Aparatūra</b>	<b>Nosaukums</b>	<b>Ražotājs</b>	<b>Valsts</b>
Autoklāvs	<i>"Olympatic"</i>	INTERNATIONAL PBI	Itālija
Bioanalizatora instruments	<i>Agilent 2100</i>	Agilent Technologies	ASV
<i>BluePippin</i> instruments	<i>BluePippin</i>	Sage Science	ASV
Centrifūga	<i>MiniSpin Plus</i>	Eppendorf	Vācija
Digitālā fotokamera	<i>E.A.S.Y. 429K</i>	Herolab	Vācija
Ekrāns	<i>IM 2305-SQ</i>	Pieper GmbH	Vācija
Elektroforēzes barošanas bloks	<i>EPS-600</i>	Pharmacia Biotech	Spānija
Elektroforēzes vannīņa	<i>Mini-Sub Cell GT Cell</i>	Bio-Rad	ASV
Fluorometrs	<i>Qubit 2.0</i>	Invitrogen	ASV
Homogenizētājs	<i>FastPrep-24 Classic Instrument</i>	MP Biomedicals	ASV
Laboratorijas sviri	<i>BP610 (+/-0,01g)</i>	Sartorius	Vācija
Mikroviļņu krāsns	-	SCARLETT	Krievija
PĶR aparāts	<i>GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 9700</i>	Life Technologies	ASV
Sekvenators	<i>Ion Torrent PGM</i>	ThermoFisher Scientific	ASV
Sonifikators	<i>Covaris S220</i>	Covaris	ASV
Termostats	<i>TDB-120</i>	BioSan	Latvija
Ūdens attīrīšanas sistēma	<i>Milli-Q Advantage A10</i>	Millipore Merck	ASV
Vortekss	<i>FV-2400 Micro-Spin</i>	BioSan	Latvija
Vortekss	<i>MS 3 digital</i>	IKA	ASV

Izmantoto laboratorijas piederumu uzskaitījums.

Table 4

List of laboratory equipment used.

Nosaukums	Ražotājs	Valsts
0.5 ml stobriņi	Deltalab	Spānija
0.5 ml stobriņi – <i>Qubit assay tubes</i>	ThermoFisher Scientific	ASV
1.5 ml stobriņi	Eppendorf	Vācija
15 ml stobriņi	Sarstedt	Vācija
Bioanalizatora <i>dsDNA HS kit</i> čipi	Agilent Technologies	ASV
<i>BluePippin</i> 2% DF V1 kasetes	Sage Science	ASV
Laboratorijas cimdi	Top Glove	China
Pipešu uzgaļi – <i>Biosphere Filter tips</i> (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt	Vācija
Pipete – <i>FinnPipette</i> (0.2-2 µl)	ThermoFisher Scientific	ASV
Pipetes – <i>Pipetman Ultra</i> (20-200 µl; 200-1000 µl)	Gilson	ASV
Statīvs ar magnētu – <i>DynaMag-2 Magnet</i>	ThermoFisher Scientific	ASV

5.tabula

Izmantotie reaģenti, maisījumi un buferšķīdumi.

Table 5

List of reagents, solutions and buffer solutions used.

<b>Viela</b>	<b>Nosaukums</b>	<b>Ražotājs</b>	<b>Valsts</b>
Agaroze	<i>TopVision</i> agaroze 1.2%	Thermofisher Scientific	ASV
96% etanols	-	Jaunpagats PLUS	Latvija
TAE buferis	Tris bāze	POCH	Polija
	0.5M EDTA	SIGMA	ASV
	Ledus etiķskābe	SIGMA	ASV
Etīdija bromīds	-	SIGMA	ASV
Mikrobiālās DNS izdalīšanas reaģentu komplekts	<i>FastDNA® SPIN Kit for soil</i>	MP Biomedicals, LCC	Francija
Reaģentu komplekts <i>Qubit</i> sistēmai	<i>Qubit dsDNA HS Assay Kit</i>	Life Technologies	ASV
Reaģentu komplekts bioanalizatora sistēmai	<i>Agilent HS DNA Analysis Kit</i>	Agilent Technologies	ASV
Krāsa	<i>6 X Loading Dye</i>	Thermofisher Scientific	ASV

6.tabula

Izmantotās datorprogrammas.

Table 6

List of software used.

<b>Nosaukums</b>	<b>Versija</b>
Rstudio	1.1.453
R	3.5.0
HUMAnN2	0.11.1
MetaPhlAn	1.7.8
Microsoft Office Excel	2016

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Pētījuma dizains

Pētījumā (3.attēls) tika iesaistīti veseli cilvēki, kas atbilda noteiktajiem pētījuma kritērijiem. Par veselu tiek uzskatīta persona, kurai nav zināmu saslimšanu pieteikšanās brīdī, kas varētu ietekmēt pētījuma rezultātus. Iekļaušanas galvenie kritēriji: vecums no 18 līdz 64 gadiem; eiropiešu izcelsme. Izslēgšanas kritēriji: alerģija pret kādu no antidiabētisko medikamenta *Metforal* 850 mg sastāvā esošajām vielām; citu medikamentu lietošana, kas nav savietojami ar *Metforal* 850 mg lietošanu; slimo ar slimībām, kuru ārstēšanai izmanto metformīnu saturošus medikamentus (piemēram, 2. tipa cukura diabēts, policistisko olnīcu sindroms u.c.); pēdējo divu mēnešu laikā lietoti sekojoši medikamenti – antibiotikas, probiotiķi, imūnsupresīvi medikamenti u.c.; sievietēm – iestājusies grūtniecība vai ir ar krūti barojams bērns. Pilns iekļaušanas/izslēgšanas kritēriju saraksts skatāms 1. pielikumā. Pirms piedalīšanās pētījumā, katrs dalībnieks tika iepazīstināts ar pētījuma aprakstu un parakstīja informētās piekrišanas formu (skatīt 2. pielikumu).

Pārbaudes perioda laikā dalībnieki aizpildīja vispārējo aptaujas anketu (skatīt 3. pielikumu) un trešajā dienā nodeva asins paraugu (11 ml) hematoloģisko un bioķīmisko analīžu veikšanai. Pētījuma laikā tā dalībnieki lietoja vienu *Metforal* 850 mg tableti divas reizes dienā (ar 10-12 stundu intervālu) nedēļas garumā. Visa pētījuma garumā, diēta un fizisko aktivitāšu līmenis tika reģistrēti specifiskās dienasgrāmatās (skatīt 4. pielikumu) un pētījuma noslēgumā aizpildīta blakņu anketa (skatīt 5. pielikumu). Dalībnieki tika lūgti nemainīt sev ierasto dzīvesveidu un uzturu.

Fēču paraugi tika patstāvīgi ievākti mājas apstākļos divās alikvotās, sausā un tīrā tvertnē, atbilstoši izsniegtajam paraugu ievākšanas protokolam (skatīt 6. pielikumu), tam paredzētajos stobriņos trīs laika posmos: pirms metformīna pirmās devas (M0), dienu pēc metformīna lietošanas uzsākšanas (M24h) un pēc nedēļu ilgās metformīna lietošanas (M7d). Mikrobioma paraugi pēc ievākšanas tika turēti +4°C (ledusskapī) un 24 stundu laikā nogādāti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, kur uzreiz ievietoti -80°C saldētavā līdz tālākai apstrādei.

Pētījums tika veikts VPP “Biomedicīna sabiedrības veselībai” (BIOMEDICINE) projekta *apakšprojekta Nr.2.8.* un Eiropas Reģionālā attīstības fonda (ERAF) 1.1.1.1/16/A/091 “Metformīna terapijas ietekmējošo faktoru savstarpējās mijiedarbības izpēte 2.tipa cukura diabēta ārstēšanas efektivitātes prognozēšanai” ietvaros, un ir saņēmis atļaujas no Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrības Klīniskās izpētes ētikas komitejas

(Nr.2012.1212 – 10L), Centrālās Medicīnas Ētikas komitejas (Nr.1/16-05-12) un Zāļu valsts aģentūras (Nr.17-1723).

	Pētījuma periods (dienās)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Iepazīšanās ar pētījuma aprakstu; Informētās piekrišanas formas parakstīšana	Pārbaudes periods			Atklāts pētāmo zāļu lietošanas periods						Apsekošanas periods				
	Diētas dienasgrāmatas aizpildīšana												Telefonvizīte	
		Asins paraugi (tukšā dūšā)		MP ievākšana						MP ievākšana				
		MP ievākšana		Metformīns 2x dienā / 850mg										
		Aptaujas anketas, VIGDB anketas aizpildīšana									Blakņu anketas aizpildīšana			

3.attēls. Pētījuma dizains. MP – mikrobioma paraugs; VIGDB – Valsts iedzīvotāju genoma datu bāze.

Figure 3. Study design. MP- microbiome sample; VIGDB – Genome Database of the Latvian Population.

### 2.2.3. Bakteriālās DNS izdalīšana no fēcēm, izmantojot *FastDNA Spin Kit for Soil*

1. Pievieno 100-150 mg fēcū parauga lizēšanas matricas E stobriņā;
2. Lizēšanas matricas E stobriņam ar paraugu pievieno 978 µl nātrija fosfāta bufera;
3. Pievieno 122 µl MT bufera. Enerģiski sakrata stobriņu, lai samaisītu;
4. Paraugu 40 sekundes ar ātruma iestatījumu 6.0 homogenizē, izmantojot *FastPrep® Instrument* ierīci;
5. Centrifugē 10 minūtes pie 14 000 x g;
6. Ar pipeti pārnes supernatantu tīrā 2 ml mikrocentrifugēšanas stobriņā. Pievieno 250 µl PPS (*Protein Precipitation Solution*) un samaisa, apvēršot stobriņu 10 reizes. Nevorteksē!
7. Centrifugē pie 14 000 x g 5 minūtes, lai nogulsnes nosēstos. Ar pipeti pārnes supernatantu tīrā 15 ml stobriņā;
8. Resuspendē saistīšanas matricas maisījumu un pievieno 1 ml supernatantam 15 ml stobriņā;
9. Stobriņu uzmanīgi sakrata ar roku, tad novieto uz maisītāja vai maisa, apvēršot ar roku 2 minūtes, tad stobriņu 3 minūtes atstāj statīvā, tādējādi ļaujot DNS piesaistīties matricai;

10. Uzmanīgi atdala un izlej 500 µl supernatanta tā, lai neaizskartu nosēdušos saistīšanas matriksa slāni;
11. Sakrata atlikušo saistīšanas matriksa un supernatanta maisījumu. Ar pipeti pārnes 600 µl šķīduma uz tīru *SPIN*<sup>TM</sup> filtru, centrifugē 1 minūti pie 14 000 x g. Filtrātu izlej. Atkārti maisīšanu, stobriņā atlikušā šķīduma pārnesšanu uz *SPIN*<sup>TM</sup> filtru un centrifugēšanu. Filtrātu izlej;
12. Uz *SPIN*<sup>TM</sup> filtra saistīšanas matriksa slāņa pievieno 500 µl SEWS-M (sajaukts ar etanolu attiecībā 1,2:1), uzmanīgi samaisa pipetējot tā, lai neaizskartu filtru;
13. Centrifugē pie 14 000 x g 1 minūti. Filtrātu izlej;
14. Nepievienojot papildus šķidrumu, atkārtoti centrifugē stobriņu ar *SPIN*<sup>TM</sup> filtru 2 minūtes pie 14 000 x g, lai atbrīvotos no atlikušā mazgāšanas šķīduma;
15. Pārnes *SPIN*<sup>TM</sup> filtru uz jaunu 2 ml stobriņu. *SPIN*<sup>TM</sup> filtru 5 minūtes istabas temperatūrā žāvē.
16. Pievieno 100 µl DES (*DNase/Pyrogen-Free Water*), uzmanīgi samaisa pipetējot. Karsē 5 minūtes 55°C temperatūrā, lai palielinātu iegūtās DNS daudzumu;
17. Centrifugē pie 14 000 x g 1 minūti, lai eluētu mikrobiālo DNS tūrajā stobriņā. Izmet *SPIN*<sup>TM</sup> filtru;
18. Iegūtais filtrāts satur mikrobiālo DNS un to glabā pie -20°C.

#### **2.2.4. DNS agarozes gēla elektroforēze**

1. Sagatavo 1,2 % agarozes gēlu. 1,2 g agarozes pulvera pievieno 100 ml 1 x TAE buferšķīduma; maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī līdz agaroze ir pilnībā izšķīdusi. Pievieno 7 µl etīdija bromīda, šķīdumu burciņā apmaisā ar aplveida kustībām.
2. Agarozes šķīdumu atdzesē, līdz burciņu var noturēt rokās. Elektroforēzes aparāta kariatē ievieto vajadzīgā izmēra ķemmīti un ielej agarozes šķīdumu tā, lai ķemmītes zari būtu vismaz 2 mm šķīdumā.
3. Kad agarozes šķīdums ir atdzisis un sacietējis, kariatē ar gēlu ievieto elektroforēzes aparātā, pārlicinoties, ka to pārklāj 1 x TAE buferšķīdums. No gēla uzmanīgi izņem ķemmīti, pieturot kariatē.
4. Analizējamam paraugam (2µl) pievieno nepieciešamo daudzumu *6xLoading Dye* – bromfenolzilā un ksilēncianola krāsvielu maisījumu – samaisa pipetējot un ienes gēla bedrītē. Blakus bedrītē iepilda 2 µl 1kb garuma DNS marķieri.
5. Elektroforēzes aparātam uzliek vāku un pievieno strāvas avotam; veic elektroforēzi ~30 min pie 150 mA strāvas.

6. Gēlu novieto uz UV starojuma avota, uzliek plastmasas aizsargvāku; izmantojot digitālo fotoaparātu un ekrānu, nofotogrāfē, izprintē un izvērtē iegūtos rezultātus.

### 2.2.5. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana

#### *Ar Qubit fluorometru un Qubit® dsDNA HS Assay Kit reaģentu komplektu*

Sagatavo paraugus un standartus:

1. Sagatavo nepieciešamo skaitu (n) 0,5 ml stobriņu. Jāņem vērā, ka nepieciešami divi papildus stobriņi standartiem (n+2);
2. Atsevišķā, atbilstošā tilpuma stobriņā, sagatavo sekojošu maisījumu (*Qubit* darba šķīdumu) – atšķaida *Qubit dsDNA HS* reaģentu komplektā ietilpstošo krāsu attiecībā 1:200 *Qubit dsDNA HS* buferšķīdumā.
  - *Qubit dsDNA HS* buferšķīdums – (n+2) x 199 µl
  - *Qubit dsDNA HS* reaģents – (n+2) x 1 µl
3. Atbilstoši marķētajiem standartu stobriņiem – S1 un S2 – katram pievieno 10 µl nepieciešamo standartšķīdumu;
4. Standartiem pievieno 190 µl *Qubit* darba šķīduma, vorteksē un nocentrifugē;
5. Katram marķētajam paraugu stobriņam pievieno 2 µl atbilstošā parauga. Pievieno 198 µl *Qubit* darba šķīduma. Samaisa pipetējot;
6. Sagatavotajiem stobriņiem ļauj inkubēties 2 minūtes istabas temperatūrā.

Paraugu un standartu nolasīšana uz *Qubit* fluorometra:

1. Ieslēdz *Qubit 2.0* fluorometru. Uz galvenā ekrāna uzspiež *DNA* ikonu, tad izvēlas *dsDNA High Sensivity*. Parādās standartu nolasīšanas izvēlnes ekrāns. Piespiež *Yes*, lai nolasītu standartus;
2. Veic ierīces kalibrēšanu: pirmo standartu, S1, ievieto fluorometra paraugu kambarī, aiztaisa vāku un uz ekrāna piespiež *Read*. Pēc nolasījuma pirmo standartu izņem un atkārti soli ar otro standartu S2;
3. Pēc kalibrēšanas pabeigšanas, paraugu kambarī ievieto pirmo paraugu, piespiež *Read* ikonu, pēc nolasījuma (~3 sekundes) izņem paraugu. Instruments parāda mērījuma vērtību uz ekrāna;
4. Atkārti iepriekšējo soli visiem paraugiem.

### 2.2.6. DNS sonifikācija ar *Covaris*

1. Pirms sonifikācijas veikšanas, paraugi jāatšķaida līdz 200 ng koncentrācijai 50 µl tilpumā;
2. Veic sonifikāciju pēc 300 bp protokola:
  - a. Ieslēdz dzesēšanas sistēmu, pārlicinoties, ka tās temperatūra ir uzstādīta uz +4°C;
  - b. Piepilda sonifikatora ūdens tilpni ar dejonizētu ūdeni līdz 12.5 atzīmei (sadaļa “*Fill*”);
  - c. Ieslēdz *Covaris S220* instrumentu un datoru, kas ar to savienots;
  - d. Atver *SonoLab* programmu un izvēlas atbilstošo sonifikācijas programmu – *300 base pair fragmentation*;
  - e. Kamēr tiek dzesēts sonifikatorā iepildītais ūdens, sapilda korekti atšķaidītos paraugus speciāli sonifikatoram domātajos stikla stobriņos;
  - f. Katru paraugu secīgi ievieto sonifikatora kapsulā un programmā piespiež *Run*, parauga sonifikācijas ilgums ir 55 sekundes;
3. Pēc sonifikācijas veikšanas, atfasē 2 µl sonificētā parauga, lai nepieciešamības gadījumā varētu veikt sonifikācijas un iegūtās DNS kvalitātes pārbaudi uz bioanalizatora.

### 2.2.7. “*End repair*” un inkubācija

1. Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

DNS paraugs	39 µl
<i>End Repair</i> buferšķīdums	10 µl
<i>End Repair</i> enzīms	1 µl
<hr/>	
Kopējais tilpums:	50 µl

2. Paraugu inkubē istabas temperatūrā 20 minūtes;
3. Pēc inkubācijas, veic attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm attiecībā 1:1 (50 µl paraugs + 50 µl lodītes);
4. Eluē 25 µl TE buferšķīdumā.

### 2.2.8. Attīrīšana ar *NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select* magnētiskajām lodītēm DNS fragmentu garuma selekcijai

Lodītes 30 min pirms lietošanas izņem no +4°C un uzsilda līdz istabas temperatūrai, sagatavo 80% etilspirtu (EtOH):

95% EtOH	8 420 µl
dH <sub>2</sub> O	1 580 µl
Kopējais tilpums:	10 000 µl

- 1.5 ml stobriņos, X µl paraugam pievieno Y µl sasilušas un savorteksētas lodītes. Samaisa pipetējot, inkubē 5 minūtes istabas temperatūrā;
- Stobriņus liek uz magnēta, inkubē 3 – 5 min, uzmanīgi aizvāc supernatantu, neaizskarot magnētiskās lodītes;
- Stobriņiem atrodies uz magnēta, lodītes divas reizes skalo ar 200 µl svaigi sagatavoto 80% EtOH, apgriežot stobriņu pāris reizes ap savu asi;
- Pēc pēdējās skalošanas ar EtOH, pārliecinās, ka ir aizvākts viss šķidrums un atvērtus stobriņus žāvē uz magnēta 4 minūtes istabas temperatūrā;
- Stobriņus noņem no magnēta un pievieno vēlamu tilpumu dH<sub>2</sub>O vai TE buferšķīduma. Samaisa pipetējot un inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes;
- Tos atkārtoti liek uz magnēta, inkubē 3 – 5 minūtes;
- Supernatantu, kas satur attīrīto DNS paraugu, uzmanīgi neaizskarot lodītes, pārnes uz jaunu 1.5 ml stobriņu.

### 2.2.9. Ligēšana

- Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

DNS paraugs	25 µl
Ligēšanas buferis (10x)	5 µl
Bārkods	2 µl
P1 adapteris	2 µl
dNTP	2 µl
DNS ligāze	1 µl
<i>Nick Repair</i> polimerāze	4 µl
dH <sub>2</sub> O	9 µl
Kopējais tilpums	50 µl

- Ievieto maisījumu programmējamajā termostatā pie sekojošās programmas: 25°C – 15 min, 72° C – 5 min, 4°C – ∞;

3. Pēc ligēšanas, veic attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm attiecībā 1:1.15 (50 µl paraugs + 57.5 µl lodītes);
4. Eluē 13 µl TE buferšķīdumā.

### **2.2.10. Fragmentu selekcija pēc to garuma, izmantojot *BluePippin* instrumentu**

Paraugu sagatavošana:

1. 30 min pirms lietošanas no ledusskapja izņem *BluePippin* buferšķīdumu, atstāj uzsilt līdz istabas temperatūrai;
2. DNS paraugiem pievieno nepieciešamo daudzumu TE buferšķīduma, lai sasniegtu 30 µl tilpumu.;
3. Katram paraugam pievieno 10 µl *BluePippin* buferšķīduma/markiera maisījumu – V1;
4. Paraugus vorteksē un centrifugē.

*BluePippin* optiskā sistēma jākalibrē pirms katras elektroforēzes veikšanas:

1. *BluePippin* datorprogrammā piespiež *Main Tab*;
2. Uzspiež *Calibrate*;
3. Atvērsies atsevišķs *LED Calibration* logs, kurā pie kalibrācijas statusa jāparādās ziņai “*Ready for Calibration*”. Speciāli kalibrēšanai paredzētā armatūra jāievieto aparātā tā, lai tiktu aizsegti LED detektori. Tumšajai armatūras daļai jābūt ar skatu uz leju;
4. Aiztaisa *BluePippin* aparāta vāku;
5. Uzspiež *Calibrate*;
6. Kalibrācijas statusa logā parādīsies ziņa, ka notiek kalibrācija. Tiklīdz tā būs beigusies, logā parādīsies “*Calibration OK*”;
7. Piespiež *Exit*, lai nokļūtu programmas galvenajā logā, attaisa aparātu un izņem armatūru.

*BluePippin* protokola ieprogrammēšana:

1. *BluePippin* datorprogrammā piespiež *Protocol Editor Tab*;
2. Uzspiež *Cassette* mapi un izvēlas *2% DF Marker V1*;
3. Katram celiņam uzstāda savākšanas diapazona parametru *tight* un ievada 400 bp pie nepieciešamā garuma parametra;

4. Atzīmē *Internal Standards* sadaļu – izmantos iekšējos DNS fragmentu garuma standartus, kas tiks pievienoti katrā parauga celiņā, lai noteiktu laiku, kas nepieciešams fragmentu selekcijai;
5. Norāda parauga nosaukumu katram celiņam tam atzīmētajā ailītē;
6. Piespiežot *Save As*, saglabā protokola iestatījumus.

Sagatavo gēla kaseti paraugu pildīšanai:

1. Pārbauda, vai gēls kasetēs nav ieplaisājis – šajā gadījumā celiņu nedrīkst izmantot.
2. Pārbauda, vai pie eluēšanas bedrītēm nav noformējies burbulis. Ja nepieciešams, eluēšanas bedrītēm no mugurpuses izsit burbuļus;
3. Pirms paraugu pildīšanas kasetē, pārbauda buferšķīduma līmeņus visās kasetes buferšķīduma tvertnēs – tiem jābūt gandrīz pilniem, vajadzības gadījumā piepilda ar buferšķīdumu;
4. Ievieto kaseti optiskajā ligzdā;
5. Noņem baltās sloksnes no kasetes;
6. Izsūc visu buferšķīdumu no eluācijas bedrītēm un aizvieto ar 40 µl svaiga elektroforēzes buferšķīdumu;
7. Aizlīmē eluācijas bedrītes ar pašlīmējošām baltām sloksnēm;
8. Veic gēla kasetes darbības testu;
9. Izsūc 40 µl buferšķīduma no pirmās eluācijas bedrītes un iepilda 40 µl iepriekš sagatavotā parauga. Atkārto soli ar pārējiem paraugiem un bedrītēm;
10. Kad paraugi sapildīti bedrītēs, aiztaisa *BluePippin* instrumenta vāku. Pārbauda, vai datorā ir izvēlēts pareizais programmas protokols un spiež *Start*;
11. Pēc elektroforēzes beigām, eluētos paraugus savāc no eluēšanas bedrītēm, skalo bedrītes ar 10 µl TE buferšķīduma, kuru pēc tam pievieno eluātam;
12. Eluētajiem paraugiem pievieno nepieciešamo daudzumu dH<sub>2</sub>O, lai iegūtu 60 µl parauga;
13. Pēc fragmentēšanas veic attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm attiecībā 1: 1 (60 µl paraugs + 60 µl lodītes);
14. Eluē 13 µl TE buferšķīdumā.

### 2.2.11. Amplifikācija

1. Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

DNS paraugs	12.5 µl
Reakcijas maisījums ( <i>MasterMix</i> )	50 µl
Fragmentu bibliotēkas amplifikācijas oligonukleotīdu maisījums ( <i>Library Amplification Primer Mix</i> )	2.5 µl
Kopējais tilpums	65 µl

2. Liek reakcijas maisījumu programmējamā termostatā pie programmas: 95°C –5 minūtes, 8 cikli x (95°C – 15 sek, 58°C – 15 sek, 70°C – 1 min), 4°C – ∞;
3. Pēc amplifikācijas veic attīrīšanu ar lodītēm attiecībā 1: 1.15 (65 µl paraugs + 74 µl bīdu);
4. Eluē 20 µl TE buferšķīduma.

### 2.2.12. DNS kvalitātes noteikšana, izmantojot *Agilent 2100* bioanalizatora instrumentu

1. Izvēlas un ievieto atbilstošo šļirci čipa darba stacijā, to ievietojot tai paredzētajā aptverē;
2. Ieslidina šļirci tai paredzētajā atslēgas adapterī, tad to cieši ieskrūvē čipa darba stacijā;
3. Atver čipa darba staciju, pavelkot slēdzeni, pārlicinās, vai bāzes plate atrodas C pozīcijā;
4. Uzstāda šļirces slēdzeni bioanalizatora čipa darba stacijā – atlaiž slēdzenes sviru un nospiež to līdz zemākajai pozīcijai;
5. Pirms sāk pildīt čipu, pārlicinās, ka instrumentam ir uzstādīta pareizā programmatūra, kā arī uzstāda vorteksa maisītāju/kratītāju un tā ātrumu uzregulē uz 2 400 rpm;
6. Veic bioanalizatora elektrodu tīrīšanu – lēni piepilda jebkuru no tīrīšanas čipa (baltā krāsā) bedrītēm ar 360 µl destilētu H<sub>2</sub>O, tad paceļ bioanalizatora vāku un ievieto elektrodu tīrīšanas čipu, aizver vāku;
7. Sagatavo gēla-krāsas maisījumu:
  - a. Atļauj *High Sensitivity DNA* krāsas koncentrātam un gēla matriksam uzsilt līdz istabas temperatūrai;
  - b. Krāsas koncentrātu vorteksē 10 sekundes un centrifugē, pārlicinās, ka *DMSO* ir pilnībā atkusis;
  - c. Pievieno 15 µl krāsas koncentrāta gēla matriksam. Stobriņu aiztaisa ciet un vorteksē 10 sekundes. Pārlicinās, ka krāsas koncentrāts un gēla matrikss ir samaisījušies;

- d. Pārnes visu stobriņā esošo krāsas koncentrāta un gēla matricas maisījumu uz centrifugēšanas stobriņa filtra tvertni;
  - e. Ievieto centrifugēšanas stobriņu mikrocentrifūgā un centrifugē 10 minūtes istabas temperatūrā pie  $2\ 240\ g \pm 20\%$ ;
  - f. Pēc centrifugēšanas filtru izmet. Stobriņu marķē un atzīmē pagatavošanas datumu, maisījums jāizmanto mēneša laikā;
8. Pilda gēla-krāsas maisījumu bioanalizatora čipā:
- a. Pirms lietošanas atļauj gēla-krāsas maisījumam uzsilt līdz istabas temperatūrai, kā arī to nedrīkst turēt tiešos gaismas staros;
  - b. Sagatavo jaunu *High Sensitivity DNA* čipu un ievieto to čipa darba stacijā;
  - c. Iepilda 9.2  $\mu$ l gēla-krāsas maisījuma **G** iezīmētajā bedrītē un iespiež to kapilāros, izmantojot šļirci:
    - i. Ar taimeri uzņem 60 sekundes, pārlicinoties, ka šļirces virzulis ir novietots pie 1 ml atzīmes, aizver darba staciju līdz sadzird klikšķi, kas norāda, ka tā ir kārtīgi aizvērta;
    - ii. Nospiež šļirces virzuli līdz galam, līdz tas atbalstās pret čipa slēdzenes klipsi;
    - iii. Gaida precīzi 60 sekundes, tad atlaiž klipsi;
    - iv. Pārbauda, vai šļirces virzulis atvirzās atpakaļ līdz vismaz 0.3 ml atzīmei, pēc 5 sekundēm lēni atvelk virzuli līdz 1 ml atzīmei;
    - v. Atver čipa darba staciju, iepilda katrā **G** iezīmētajā bedrītē 9.2  $\mu$ l gēla-krāsas maisījumu;
9. Bioanalizatora čipam visās 11 paraugu bedrītēs un bedrītē, kas apzīmēta ar kāpņu simbolu, iepilda 5  $\mu$ l *High Sensitivity DNA* sākuma un beigu garuma standartmarķieri (zaļais stobriņš);
10. Bedrītē, kas apzīmēta ar kāpņu simbolu, iepilda 1  $\mu$ l *High Sensitivity DNA* garuma marķieri;
11. Katrā paraugu bedrītē iepilda 1  $\mu$ l atbilstošā parauga, vai arī papildus 1  $\mu$ l standartmarķiera, ja bedrīte netiek izmantota;
12. No bioanalizatora aparāta izņem čipu ar destilēto ūdeni, atstāj instrumenta vāku vaļā, atļaujot elektrodiem pēc tīrīšanas nožūt (aptuveni 10 sekundes);
13. Bioanalizatora čipu ar paraugiem ievieto horizontāli vorteksa maisītājā un vorteksē 60 sekundes;
14. Čipu atbilstoši ievieto bioanalizatora instrumentā un uzmanīgi aizver vāku;

15. Atver *2100 Expert* programmu un izvēlas augstas jutības dubultpavedienu DNS (*HS dsDNA assay*) pārbaudes protokolu;
16. Aizpilda nepieciešamo informāciju – paraugu nosaukumus un komentārus;
17. Piespiež *Start* ikonu; pēc bioanalizatora čipa analizēšanas beigām, novērtē paraugu koncentrāciju, tīrību un fragmentu garumus.

### **2.2.13. Sekvenēšana ar *IonTorrent Proton* sekvenatoru**

Gatavās metagenoma fragmentu bibliotēkas tika nodotas apmācītam laboratorijas speciālistam, kurš veica lielapjoma paralēlo sekvenēšanu.

Balstoties uz bioanalizatora noteikto koncentrāciju, paraugi tika atšķaidīti līdz 8 pM koncentrācijai. Apvieno ~25 paraugus uz viena čipa, lai izmantotu pilnu sekvenēšanas kapacitāti jeb 60 līdz 80 miljonus nolasījumu. Sākumā tiek veikta emulsijas PCR ar *Ion OneTouch* iekārtu un *Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200* reaģentu komplektu, vadoties pēc ražotāja instrukcijām. Sekvenēšanai tika izmantots *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200* reaģentu komplekts un tam atbilstošs *Ion PI™ Chip Kit v3*.

Katra parauga paredzētais pārklājums ~3 miljonu nolasījumu. Paraugu izvietojums uz čipa tika plānots tā, lai visi paraugi no viena indivīda būtu uz viena čipa.

### **2.2.14. Datu analīze un statistika**

No sekvenatora iegūtie dati tika analizēti divos veidos: (1) ar *HUMAN2* (Abubucker *et al.* 2012), lai noteiktu izmaiņas gēnu saimju un signālceļu pārstāvniecībā paraugos, (2) ar *MetPhlAn* (Segata *et al.* 2012), lai analizētu paraugu taksonomisko sastāvu. Šo datu pirmapstrādes daļu veica bioinformātikas speciālists.

No pirmapstrādes programmām iegūto rezultātu faili tālāk tika apstrādāti MS Excel – tika veikta datu filtrēšana un noformēšana tālākai izmantošanai R programmā. Failā, kurš saturēja informāciju par signālceļu pārstāvniecību, statistiskajai analīzei tika atlasīti tikai tie signālceļi, kuri bija sastopami vismaz 70% paraugu. Tas pats tika veikts failā, kurš saturēja informāciju par gēnu saimju pārstāvniecību. Taksonomiskā īpatsvara noteikšanai dati tika filtrēti un grupēti pēc taksonomiskajiem līmeņiem, kā arī sadalīti daļās atkarībā no augstākā taksonomiskā līmeņa (valstis – arheji, baktērijas, vīrusi). Statistiskajai analīzei arī tika izmantotas tikai tās taksonomiskās grupas, kuras tika novērotas vismaz 50% paraugu. Balstoties uz taksonomisko sastāvu ģints līmenī, tika aprēķināta katra parauga iekšējā jeb  $\alpha$ -daudzveidība pēc Šanona indeksa (Shannon 1948). Šanona indeksa izmaiņu būtiskuma novērtēšana tika veikta ar neparametrisko Vilksoksona testu. Starpparaugu jeb  $\beta$ -daudzveidība tika novērtēta

izmantojot neparametriskās multidimensionālās mērogošanas (NMDS) analīzi. Atšķirību būtiskums starp dažādām paraugu grupām tika novērtēts ar permutāciju multivariācijas analīzi – PERMANOVA (permutācijas = 9999).

Statistiski būtisko izmaiņu novērtēšana gan taksonomiskajā, gan funkcionālajā profilā tika veikta R programmā ar statistiskajiem rīkiem, kas ietverti pakā *edgeR*. Rezultāti tika koriģēti ar šajā pakā ietverto *false discovery rate (FDR)* korekciju. Tāpat analīzē tika izmantotas arī funkcijas no tādām pakām kā *limma*, *phyloseq*, *XML* un *DESeq*. Rezultātu vizualizācijai tika izmantoti rīki, kas integrēti programmās R, *HUMAnN2*, *MetPhlAn*.

### 3. REZULTĀTI

Bakalaura darba ietvaros tika analizētas zarnu mikrobioma kompozīcijas un funkcionālā profila izmaiņas nedēļu ilgas antidiabētiskā medikamenta metformīna lietošanas ietekmē 17 veseliem indivīdiem – 4 vīriešiem (26%) un 13 sievietēm (76%). Katrs indivīds ievāca trīs fēču paraugus pētījuma dizaina noteiktajos trīs laika punktos (kopā 51 paraugs). Visi pētījuma dalībnieki pētījuma beigās aizpildīja blakņu anketas (skatīt 7.pielikumu). Analizējot reģistrētos datus, novērotās blaknes tika sadalītas trīs grupās – (1) blakņu nav, (2) vieglas blaknes vai (3) smagas blaknes – šķidra vēdera izeja, caureja, vemšana. Starp 12% pētījuma dalībnieku blakņu nebija vispār, 47% - vieglas, bet 41% - smagas blaknes. Analizēto 17 indivīdu raksturojums apkopots 7. tabulā. Vidējā koncentrācija no fēču paraugiem izdalītajai mikrobiālajai DNS bija  $103.3 \pm 48.2$  ng/ $\mu$ l. Pēc sekvenēšanas iegūtais nolasījumu daudzums uz paraugu bija vidēji  $3\,368\,056 \pm 1\,574\,814$  sekvences.

7.tabula.

Pētījuma dalībnieku raksturojums

Table 7.

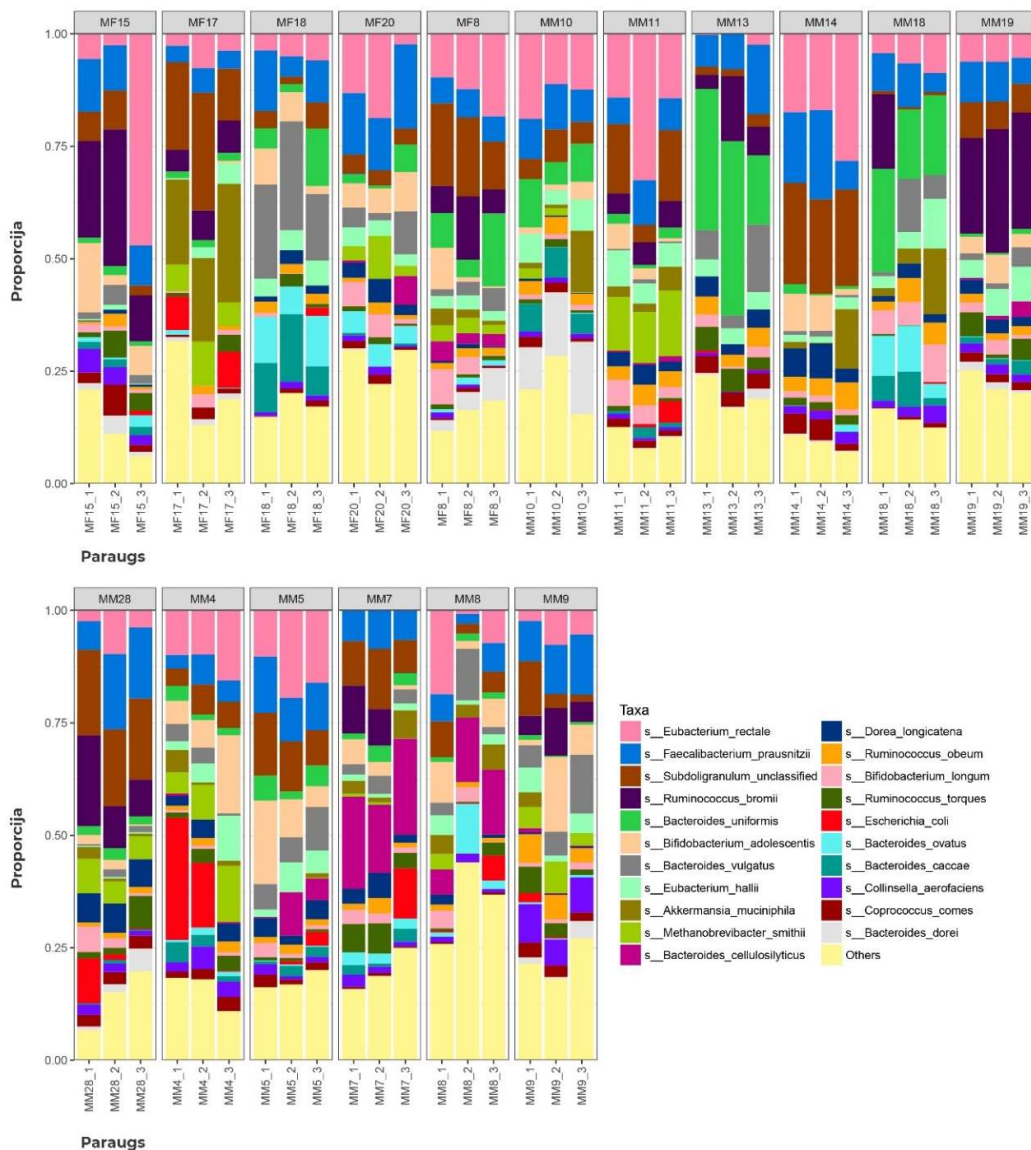
Characterization of the study participants

Parametrs	Vērtība	References intervāls
Vecums ( <i>gadi</i> ), mediāna [IQR]	28 [10]	18-64
ĶMI, mediāna [IQR]	24.1 [3.5]	<30
ALAT ( <i>U/l</i> ), mediāna [IQR]	19 [12]	Siev. - <31
		Vīr. - <41
Kreatinīns ( $\mu$ mol/l), mediāna [IQR]	71 [17]	Siev. – 30-80
		Vīr. – 30-106
Glikoze plazmā ( <i>mmol/l</i> ), mediāna [IQR]	4.92 [0.48]	3.30-5.89

ALAT – alanīna aminotransferāze, ĶMI – ķermeņa masas indekss, IQR – starpkvartīļu diapazons (*interquartile range*).

Sākotnēji tikai novērtēts un salīdzināts iegūtais zarnu mikrobioma taksonomiskais sastāvs un ar to asociētie parametri. 4. attēlā parādīta 21 visvairāk pārstāvētā taksonomiskā grupa sugas līmenī, atspoguļojot augstu daudzveidību starp indivīdiem. Šo novērojumu

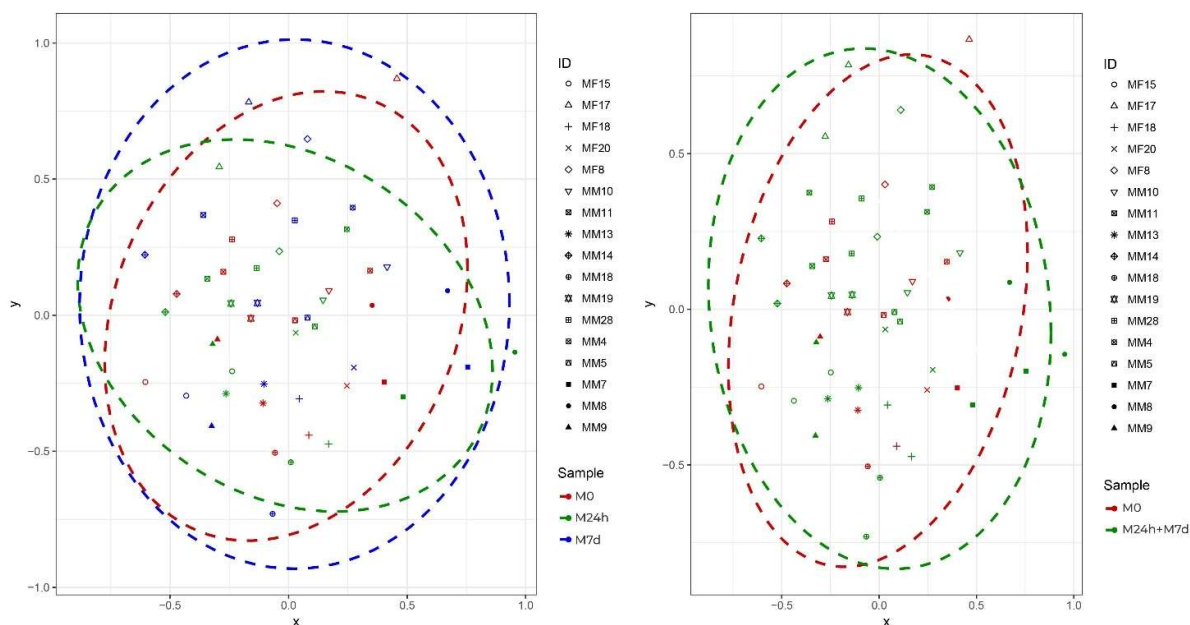
apstiprina arī veiktās permutācijas analīzes (PERMANOVA) rezultāts, kas iegūts salīdzinot paraugu grupas atkarībā no piederības individuam:  $R^2=0.77$ ,  $p=0.0001$ .



4.attēls. Taksonomiskais sastāvs sugas līmenī, izteikts procentuāli, visos analizētajos paraugos. Katrs indivīds apzīmēts ar projekta specifisku identifikācijas kodu. Paraugi apzīmēti ar numuriem: 1 – pirms metformīna lietošanas uzsākšanas (M0), 2 – 24h pēc metformīna terapijas uzsākšanas (M24h), 3 – 7 dienas pēc metformīna pirmās lietošanas (M7d).

Figure 4. Taxonomical composition on species level, presented in percentage, across all analysed samples. Each individual is depicted with a specific identification code. Samples are numbered – 1 – before the first metformin dose (M0), 2 – 24 hours after taking metformin for the first time (M24h), 3 – after 7 days long metformin administration (M7d).

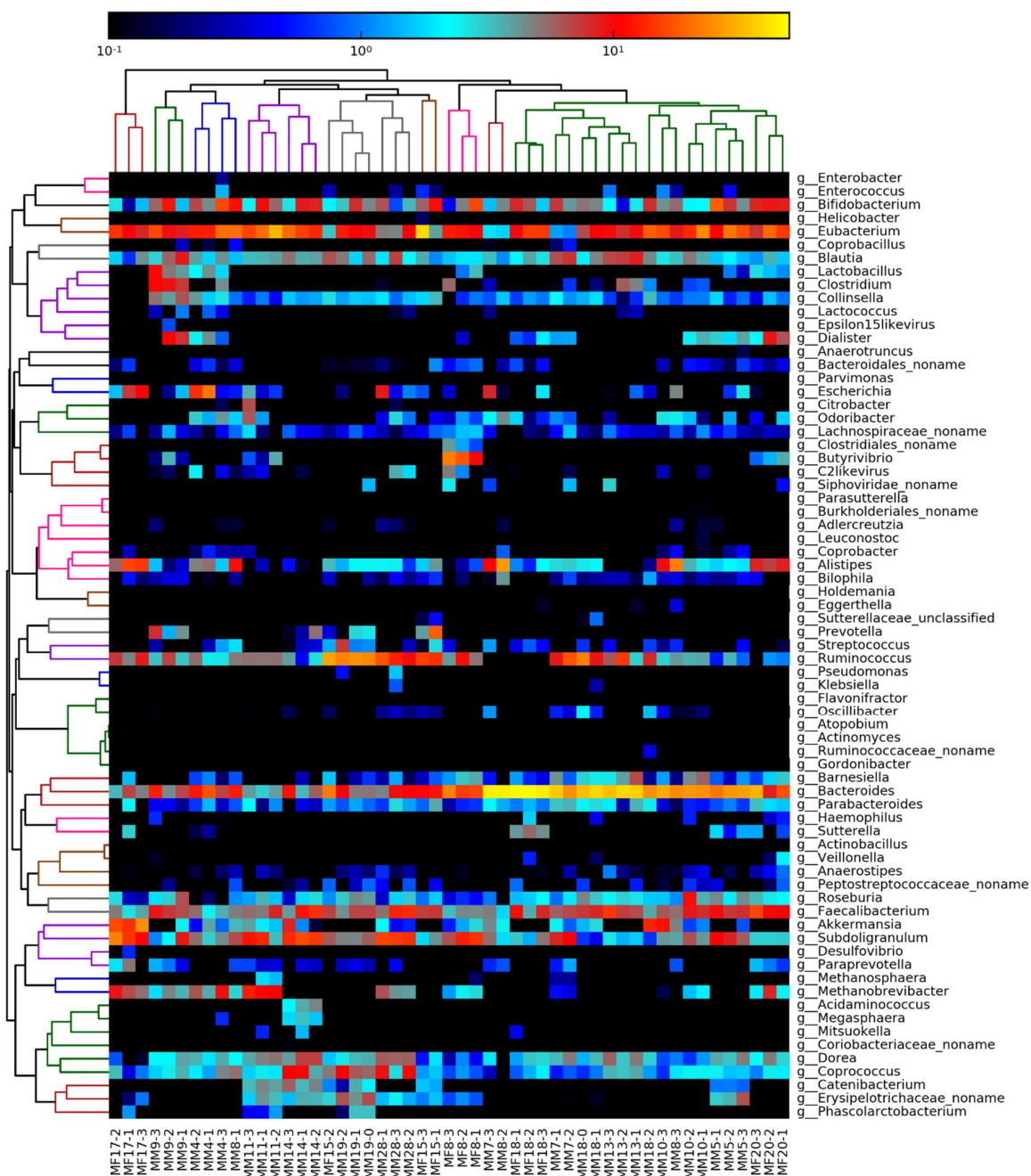
Tam sekoja starpparaugu jeb  $\beta$ -daudzveidības analīze, izmantojot neparametrisko multidimensiālo mērogošanas (NMDS) grafiku (5.attēls). Salīdzinot paraugu pirms metformīna lietošanas (M0) ar abiem paraugiem, kas iegūti metformīna lietošanas laikā vai uzreiz pēc tās (M24h un M7d) (5. attēls pa labi), tika iegūts būtisks permutācijas analīzes (PERMANOVA) rezultāts:  $R^2=0.76$ ,  $p=0.0001$ .



5.attēls. Starpparaugu daudzveidības novērtēšana, izmantojot NMDS grafiku. Kreisajā pusē redzamas salīdzinātas visas trīs paraugkopas – M0 (sarkans), M24h (zaļš), M7d (zils), bet labajā – M0 (sarkans) un M24h+M7d (zaļš). Katrs indivīds apzīmēts ar citu simbolu. Elipses apzīmē 90% ticamības intervālu katrai paraugu grupai.

Figure 5. Evaluation of inter-sample diversity by NMDS. On the left side visible all three sample groups – M0 (red), M24h (green), M7d (blue), on the right side – M0 (red) and M24h+M7d (green). Each individual is depicted with a different symbol. Ellipses represent 95% confidence interval for each group.

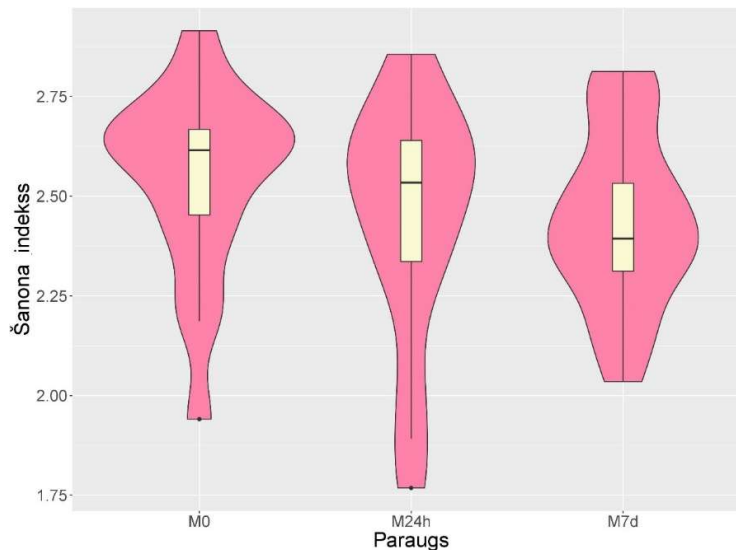
Lai novērtētu vispārīgas reprezentatīvas mikrobioma kompozīcijas svārstības metformīna terapijas laikā un atšķirības starp pētījuma dalībniekiem, tika veikta analīze pēc *Bray Curtis* distancēm 72 sastopamajām mikroorganismu ģintīm (skatīt 6.attēlu), apkopojot rezultātus īpatsvara izmaiņas daudzkrāsu režģī (*heatmap*).



6.attēls. Daudzkrāsu režģis, kas reprezentē paraugkopā sastopamo 72 mikroorganismu ģinšu īpatsvaru (logaritmiskajā skalā) visos analizētajos paraugos un analizēto paraugu hierarhisko grupēšanos.

Figure 6. A heatmap representing 72 of all the microorganism genera (abundance in logarithmic scale) across all samples and the hierarchical clustering of samples.

Metformīna terapijas laikā izraisīto izmaiņu novērtēšanai tika izmantota arī paraugu iekšējās jeb  $\alpha$ -daudzveidības noteikšana, pēc Šanona indeksa (7.attēls). Veicot neparametrisko Vilkoksona testu, tika savstarpēji salīdzinātas paraugu grupas, un netika iegūta neviena statistiski būtiska vērtība, tomēr kopumā redzama tendence, ka vērtības metformīna lietošanas laikā samazinās.



7.attēls. Iekšējā jeb  $\alpha$ -daudzveidība, aprēķināta pēc Šanona indeksa. Tā vērtības tiek attēlotas violīn-grafikā, kurš apvieno kastveida un nogriežņa procentiļu diagrammu (*boxplot*) (tajā redzama mediāna, IQR) un Kernela blīvuma grafiku.

Figure 7. Inner ( $\alpha$ ) diversity, calculated by Shannon index. Values of Shannon index are represented in a violin plot, each combines boxplot (median, IQR are shown) and Kernel density plot.

Tālākajā statistiskajā analīzē tika iekļautas tikai tās taksoniskās grupas, kuras bija sastopamas vismaz 50% analizēto paraugu, bet signālceļi un gēnu saimes –  $\geq 70\%$  paraugu. Izmaiņas taksoniskajā sastāvā tika novērtētas taksoniskajos līmeņos ar vislielāko daudzveidību – ģints un sugas. Ar *edgeR* veiktās statistiskās analīzes rezultāti apkopoti 8.tabulā.

Trīs būtiskāko izmaiņu pārstāvji starp paraugu ievākšanas laikiem ģints un sugas līmeņos.

Table 8

Top three representatives of most significant changes between samples at genera and species levels.

Taksonomiskā vienība	Paraugi	Nosaukums	LogFC	P-vērtība	FDR
Ģints	M0 un M24h	<i>Barnesiella</i>	-0.90	0.09	0.98
		<i>Peptrostreptococcaceae noname</i>	-0.85	0.19	0.98
		<i>Bifidobacterium</i>	-0.49	0.20	0.98
	M0 un M7d	<b><i>Peptrostreptococcaceae noname</i></b>	-1.98	<0.01	0.12
		<b><i>Barnesiella</i></b>	-1.54	<0.01	0.12
		<b><i>Bifidobacterium</i></b>	-0.80	0.05	0.41
	M24h un M7d	<i>Escherichia</i>	2.23	0.02	0.78
		<i>Akkermansia</i>	1.70	0.08	0.79
		<i>Streptococcus</i>	1.16	0.11	0.79
Suga	M0 un M24h	<b><i>Barnesiella intestinihominis</i></b>	-0.96	0.05	1.00
		<i>Bacteroidales bacterium</i>	-0.86	0.20	1.00
		<i>Streptococcus salivarius</i>	-0.97	0.20	1.00
	M0 un M7d	<b><i>Barnesiella intestinihominis</i></b>	-1.71	<0.01	0.05
		<b><i>Bifidobacterium longum</i></b>	-1.27	<0.01	0.21
		<b><i>Parabacteroides merdae</i></b>	-1.27	0.03	0.50
	M24h un M7d	<i>Escherichia coli</i>	1.97	0.07	0.97
		<i>Akkermansia municipihila</i>	1.46	0.12	0.97
		<i>Roseburia inulinivorans</i>	0.75	0.14	0.97

Lai tālāk izskaidrotu taksonomisko grupu īpatsvara izmaiņu iespējamo saistību ar funkcionālo profilu, tika veikta signālceļu pārstāvēniecības analīze. Tās ietvaros netika novērotas statistiski būtiskas izmaiņas. Iegūtās izmaiņu tendences apkopotas 7. pielikumā. Visbeidzot, tika noteiktas atsevišķu gēnu saimju pārstāvēniecības izmaiņas, lai novērtētu iespējamo metformīna lietošanas ietekmi uz atsevišķiem signālceļu posmiem (9.tabula).

Desmit ģēnu saimju pārstāvji ar būtiskākajām izmaiņām starp paraugu ievākšanas laikiem

Top ten representatives of most significant changes across all samples in gene families.

Paraugi	Ģēnu saimes nosaukums	LogFC	P-vērtība	FDR
M0 un M24h	<i>F6C877</i>	-1.95	<0.01	1.00
	<i>W0ETE9 - Aminotransferase</i>	-1.54	<0.01	1.00
	<i>R5ETH3 - Undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase</i>	-1.35	<0.01	1.00
	<i>R6BL03 - 30S ribosomal protein S17</i>	2.58	<0.01	1.00
	<i>R5F4L3 - Zinc metalloprotease</i>	-1.41	<0.01	1.00
	<i>R5F736 - Uncharacterized protein</i>	-1.22	<0.01	1.00
	<i>F6C883</i>	-1.16	<0.01	1.00
	<i>R5EP70 - Competence protein ComEA helix-hairpin-helix repeat region</i>	-1.36	<0.01	1.00
	<i>R7CHT1 - Acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex subunit gamma</i>	1.12	<0.01	1.00
	<i>R5F3E4 - Uncharacterized protein</i>	-1.30	<0.01	1.00
M0 un M7d	<i>R5F1J0- Peptidase M23 family</i>	-2.50	<0.01	0.06
	<i>R5F736 - Uncharacterized protein</i>	-2.39	<0.01	0.06
	<i>W0ETE9 - Aminotransferase</i>	-2.42	<0.01	0.13
	<i>R5F1Y4 - Glycosyl transferase</i>	-2.25	<0.01	0.27
	<i>R5F875 - Uncharacterized protein</i>	-2.19	<0.01	0.36
	<i>R5EYK3 - Adenylosuccinate lyase</i>	-2.05	<0.01	0.36
	<i>R5F479 - Outer membrane protein/protective antigen OMA87</i>	-2.06	<0.01	0.36
	<i>W0ETN5 - Gliding motility-associated protein GldM</i>	-2.14	<0.01	0.36
	<i>R5F400 - Uncharacterized protein</i>	-2.13	<0.01	0.36
	<i>R5F604 - Uncharacterized protein</i>	-2.06	<0.01	0.36
M24h un M7d	<i>R6GCA0 - DNA-binding helix-turn-helix protein</i>	1.59	<0.01	1.00
	<i>R6GU92 - YheO-like protein</i>	1.87	<0.01	1.00
	<i>R6GCQ6 - Uncharacterized protein</i>	1.49	<0.01	1.00
	<i>R6L6M9 - ABC transporter ATP-binding protein</i>	-1.29	<0.01	1.00
	<i>R6LV30 - Aspartokinase</i>	-1.22	<0.01	1.00
	<i>C0B4K6 - Histidine kinase A domain protein</i>	1.62	<0.01	1.00
	<i>R6G768 - Phosphoribosylglycinamide formyltransferase</i>	1.35	<0.01	1.00
	<i>R6G8J2 - Ppx/GppA phosphatase family protein</i>	1.56	<0.01	1.00
	<i>B0PDD4 - Uncharacterized protein</i>	-2.23	<0.01	1.00
	<i>R6FZ17 - Uncharacterized protein</i>	1.20	<0.01	1.00

## 4. DISKUSIJA

Metformīns ir orāli lietojams antidiabētiskais medikaments, kura galvenās funkcijas ir glikozes līmeņa samazināšana asinīs, neradot hipoglikēmiju. Tas ir viens no galvenajiem T2D ārstniecības un prevencijas līdzekļiem, uzlabojot glikēmijas kontroli ar augstu drošuma profilu, svara nemainīguma vai samazināšanas efektu. Metformīns potenciāli samazina mirstību no kardiovaskulārajām saslimšanām, kā arī ir plaši pieejams, zemo izmaksu dēļ (Gunton *et al.* 2003; McCreight *et al.* 2016) Metformīna ietekme uz zarnām nav skaidra, taču, piemēram, palielinot glikozes uzņemšanu zarnās, tas palielina laktāta koncentrāciju enterocītos, kas var izraisīt metformīna nepanesamību (Bailey *et al.* 2008). Tas rada pastiprinātu GLP-1 saturošu GI hormonu vai peptīdu sekrēciju, ietekmē žultsskābju enterohepatisko cirkulāciju, kā arī maina zarnu mikrobioma kompozīciju, tādejādi sekmējot iepriekšminētās antidiabētiskās īpašības (McCreight *et al.* 2016; Song 2016).

Bakalaura darba ietvaros tika iegūti rezultāti par taksonomiskā un funkcionālā profila izmaiņām metformīna terapijas ietekmē veselos indivīdos. Novērotās tendences daļēji sakrīt ar literatūrā aprakstītajām sakarībām, tomēr iegūtie rezultāti papildina esošās zināšanas par metformīna ietekmi uz zarnu mikrobiomu, sniedzot jaunu ieskatu metformīna ierosinātajās izmaiņās funkcionālajā profilā.

Pētījums veikts longitudinālā dizainā, kur katra indivīda pirmais ievāktais paraugs, pirms terapijas uzsākšanas, kalpo kā kontrole tālākajiem paraugiem, kas ievākti pētījuma laikā. Šai pētījumā longitudinālā dizaina plusi ietver iespēju iegūt plašāku skatījumu uz katra indivīda mikrobioma daudzveidību, mikroorganismu sastopamību vai neesamību mikrobiomā, relatīvo mikroorganismu daudzuma noteikšanu tajā. Longitudinālā dizaina izmantošana palīdz noteikt mikrobioma īpašības, kuras nebūtu redzamas no vienreizējas paraugu ievākšanas, piemēram, mikrobioma svārstīgums starp atsevišķiem laika posmiem, vai tā noturība, atkopjoties pēc traucējumiem (Goodrich *et al.* 2014), kas šajā gadījumā tiek ierosināti ar metformīna lietošanu.

Sākotnēji tika statistiski novērtēta starpindividuālā daudzveidība sugas līmenī, izmantojot PERMANOVA testu. Iegūtais rezultāts bija statistiski būtisks, kas apstiprina literatūrā aprakstīto par zarnu mikrobiomam raksturīgo indivīdspecifisko struktūru (Lozupone *et al.* 2012). To apstiprina arī daudzkrāsu režģis (6. attēls), kurā novērojams, ka hierarhiskais koks, galvenokārt, grupējas pēc indivīdiem.

Veicot salīdzinājumu Šanona indeksam dažādos pētījuma laika posmos, netika iegūti statistiski būtiski rezultāti, tomēr vizuāli novērtējot 7. attēlu, redzama tendence, ka Šanona indeksa vērtība paliek mazāka (mediānu vērtības samazinās). Tas sakrīt jau ar iepriekš pierādīto, ka lietojot metformīnu daļai indivīdu novērojama būtiska  $\alpha$ -daudzveidības samazināšanās, gan pētījumos pelēs, gan diabētiķu populācijā (Forslund *et al.* 2015; Wu *et al.*

2017). Vēl npublicētos datos par metformīna ietekmi uz zarnu mikrobioma kompozīciju veselos indivīdos, kur veiktā analīze balstīta uz *16S rRNS* marķierģēnu, ir atklāts, ka jau pēc 24 stundām novērojama strauja un būtiska mikrobioma daudzveidības samazināšanās. Turpretī, pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas paraugos novērojama neliela šīs daudzveidības atjaunošanās, kas varētu liecināt par mikrobioma pārstāvju pielāgošanos metformīna lietošanai (Elbere *et al.* 2018 (nepubl.dati)). Iespējams, palielinot pētījuma paraugkopu, arī ar šo metodi novērotās izmaiņas  $\alpha$ -daudzveidībā būtu statistiski būtiskas.

Analizējot taksonomiskās grupas (skatīt 8. tabula), kas sastopamas paraugos, tika novērotas īpatsvara izmaiņas vairākām baktērijām. Piemēram, *Barnesiella* ģints un *Barnesiella intestinhominis* sugas īpatsvars pakāpeniski samazinās gan pēc 24h ( $p=0.05$ ), gan pēc septiņu dienu ( $p=0.001$ ) ilgas metformīna lietošanas. Visbūtiskākās izmaiņas tika novērotas tieši *Barnesiella intestinhominis* sugai, kuras saglabājās arī pēc FDR korekcijas. *Bacteroidetes* tipa *Barnesiella* ģints baktēriju metabolisma galaprodukti ietver butirāt- un izo-butirātskābes, kamēr sukcināt-, propionāt- un acetāt-skābes arī var tikt producētas (Sakamoto *et al.*, 2009). Pētījumi parādījuši, ka *Barnesiella* ir visbiežāk sastopamā no nesēn klasificētajām baktērijām vesela cilvēka zarnu mikrobiomā (Wylie *et al.* 2012), iespējams, ka *Barnesiella* baktērijām piemīt arī pretiekaisuma darbība pelēs (Weiss *et al.* 2014). *Barnesiella* un *Akkermansia* izmaiņas īpatsvarā ir aprakstītas pretējā virzienā diētas ietekmē – *Barnesiella* daudzumam samazinoties, *Akkermansia* daudzums pieaug, un šādas izmaiņas ir asociētas ar antidiabētisku ietekmi (Marietta *et al.* 2013). Ņemot vērā, ka literatūrā atrodami pretrunīgi dati par šīs baktēriju sugas ietekmi uz saimniekorganismu, ir grūti spriest par tās izmaiņu nozīmi metformīna terapijas laikā. Iespējams, šīs pretrunas var izskaidrot, jo daļa no pētījumiem veikti pelēs, bet daļa – cilvēkos, kā arī pastāv varbūtība, ka dažādās *Barnesiella* funkcijas nodrošina atšķirīgi tās celmi. Tomēr, ņemot vērā iepriekš novēroto Marietta *et al.* pētījumā, ir iespējams izvīzīt pieņēmumu, ka šī bakalaura darbā novērojamais *Barnesiella* īpatsvara samazinājums un *Akkermansia* īpatsvara pieauguma tendence ir raksturojami kā viens no mehānismiem, kā metformīns nodrošina savas antidiabētiskās īpašības.

Turpinot analizēt taksonomiskās grupas, kas sastopamas paraugos, tika novērotas būtiskas (pirms FDR korekcijas) īpatsvara izmaiņu tendences gan *Bifidobacterium* ģints ( $p=0.05$ ), gan *Bifidobacterium longum* sugas ( $p=<0.01$ ) līmenī pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas. Iepriekšminētās baktēriju daudzums gan ģints, gan sugas līmenī samazinās. Vienlaicīgi ar aprakstītajām izmaiņām *Bifidobacterium* ģints īpatsvarā ir novērojama *Escherichia* ģints īpatsvara pieauguma tendence. Literatūrā aprakstīts, ka *B. longum* ir probiotiski celmi, kuriem piemīt preventīva iedarbība pret patogēnajām *E.coli* (Sugahara *et al.* 2015). Iepriekš pētījumos par metformīna un zarnu mikrobioma kompozīcijas

mijiedarbību, metformīna blaknes saistītas ar *E.coli* daudzuma pieaugumu (Forslund *et al.* 2015; Wu *et al.* 2017). To varētu attiecināt arī uz bakalaura darba datiem, jo, iespējams, novērotās vieglās vai smagās blaknes pētījuma dalībniekiem būtu iespējams izskaidrot ar labvēlīgās *B. longum* īpatsvara samazinājumu un tai sekojošo patogēnās *E.coli* daudzuma pieaugumu.

Ģints līmenī redzama arī būtiska (pirms FDR) tendence samazināties *Peptrostreptococcaeae*\_noname ģints ( $p < 0.01$ ) īpatsvaram starp M0 un M7d paraugiem. *Peptrostreptococcaeae* dzimtas pārstāvji literatūrā visbiežāk asociēti kā normālas zarnu mikrobiomā esošas baktērijas, taču to proporcija ir augstāka veselos indivīdos nekā tiem, kuriem ir zarnu mikrobioma disbioze, norādot, ka *Peptrostreptococcaeae* palīdz nodrošināt zarnu homestāzi (Fan *et al.* 2017). Arī bakalaurā iegūtie rezultāti apstiprina literatūrā minēto, parādot, ka *Peptrostreptococcaeae* īpatsvara samazinājums liecina par zarnu mikrobioma disbalansu, nosacīti izskaidrojot metformīna lietošanas blaknes. Iepriekšminētās dzimtas pārstāvju īpatsvara pieaugums saistīts arī ar cilvēka kolorektālo vēzi un adenomām, salīdzinot ar ne-vēža audiem (Tsoi *et al.* 2017). Tas varētu norādīt uz iespējami terapeitisko metformīna ietekmi uz zarnu mikrobiomu – samazinot šīs dzimtas pārstāvju īpatsvaru.

Lai tālāk izskaidrotu taksonomisko grupu īpatsvara izmaiņu iespējamo saistību ar funkcionālo profilu, tika veikta signālceļu pārstāvniecības analīze, kuras ietvaros netika novērotas statistiski būtiskas tendences. Kopumā visos salīdzinājumu pāros tika novērotas arī izmaiņu tendences vairākiem signālceļiem, kas raksturīgi eikariotiem. To varētu izskaidrot ar tādu eikariotisko organismu klātbūtni kā sēnes un viensūņi vai ar cilvēka genomiskās DNS potenciālu piejaukumu mikrobioma paraugos, kas saglabājies, neskatoties uz datu pirmapstrādē veikto cilvēka DNS sekvenču aizvākšanas filtrācijas soli (Méthé *et al.* 2012).

Iespējams, ka īsajā pētījuma laika posmā netika novērota ietekme uz visu signālceļu, bet tomēr ir iespējams identificēt efektus uz atsevišķiem tā posmiem, tādējādi redzot tendenču izmaiņas atsevišķās gēnu saimēs. Veicot gēnu saimju analīzi, daļa no statistiski būtiskajiem rezultātiem pirms rezultātu korekcijas ar FDR attiecas uz maz aprakstītiem gēniem. Līdz ar to nav iespējams interpretēt to izmaiņu iespējamo lomu metformīna lietošanas kontekstā. Viens no relatīvi plašāk pētītajiem gēniem, kura samazinājums novērojams starp M0 un M7d paraugiem, kodē peptidāzi M23, kura UniProtKB (Bateman *et al.* 2017) datubāzē tiek parādīta, kā daļa no *Barnesiella intestinhominis* genoma. Peptidāze M23 ir  $\beta$ -lītiska metalopeptidāze (Rawlings *et al.* 2014). Pētījumos aprakstīts, ka daži metāli sekmē T2D patofizioloģiju, kā arī zināms, ka metformīns piesaistās pie metāliem joniem. Iepriekš ir pierādīts, ka metformīna regulētie gēni zarnu mikrobiomā kodē metaloproteīnus vai metāla transporterus (Wu *et al.*

2017), tā kā bakalaura darba ietvaros novērots, ka metformīna ietekmē samazinoties *Barnesiella* daudzumam, samazinās arī peptidāzes M23 daudzums, tas iespējams, liecina par samazinātu metaloproteīnu noārdīšanu.

Par vienu no trūkumiem šim pētījumam un metagenoma pētījumiem kopumā var minēt datubāzes – neskaidrību par to precizitāti, lai arī tās regulāri tiek papildinātas. Tas var novest pie kļūdainiem rezultātiem, analizējot datus.

Statistiski būtisko rezultātu neesamība pēc FDR korekcijas varētu tikt skaidrota ar attiecību starp mazo paraugu skaitu un lielu analizējamo parametru skaitu. Šāds faktoru salikums samazina statistisko jaudu un liedz identificēt paraugkopā esošās patiesās izmaiņas. Turpinot pētījumu ir uzsākta papildus metagenoma bibliotēku sagatavošana (šobrīd sagatavotas 21 bibliotēka) no jauna iesaistītajiem pētījuma dalībniekiem; kopējais pētījuma dalībnieku skaits ir 35. Tas nākotnē nodrošinās lielāku analizējamo paraugkopu esošo rezultātu apstiprināšanai un plašākas analīzes iespējas funkcionāla profila un taksonomiskā sastāva novērtēšanai, piemēram, korelēt novērotās izmaiņas taksonomiskajā profilā ar diētas dienasgrāmatā reģistrēto informāciju. Precīzākai funkcionālo izmaiņu izvērtēšanai būtu nepieciešams veikt metatranskriptoma analīzi zarnu mikrobioma paraugos. Tālāk varētu veikt arī metformīna ietekmes detalizētāku novērtēšanu uz būtiskākajiem signālceļiem *in vitro*.

Bakalaura darba ietvaros tika izanalizēti 17 indivīdu fēču paraugi, kopumā sastādot 51 paraugu. Darba ietvaros iegūti rezultāti par metformīna terapijas izraisītajām tendencēm gan taksonomiskā, gan signālceļu un gēnu saimju līmenī. Iegūtā informācija varētu tikt izmantota, atlasot T2D pacientus to klasificēšanai grupās, balstoties uz zarnu mikrobioma kompozīciju. Tas veicinātu personalizētas medicīnas attīstību, prognozējot terapijas efektivitāti specifiskās pacientu grupās.

## Secinājumi

1. Metformīns ierosina līdzīgas taksonomisko un funkcionālo izmaiņu tendences, neskatoties uz variāciju zarnu mikrobioma kompozīcijā starp indivīdiem.
2. Metformīns palielina *Barnesiella* ģints un *Barnesiella intestinhominis* sugas īpatsvaru, kas varētu būt viens no mehānismiem, kā metformīns nodrošina antidiabēta terapeitiskos efektus.
3. Metformīna lietošana palielina *Barnesiella* ģints genomā esošās peptidāzes M23 gēnu saimes īpatsvaru, kas norāda uz mazāku metaloproteīnu šķelšanu zarnu mikrobiomā.

## **Pateicības**

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājai MSc. biol. Ilzei Elberei par konsultēšanu un ieteikumiem pētījuma veikšanā un darba tapšanā, un Dr.biol. Renātei Rankai par recenzēšanu. Vēlos pateikties brīvprātīgajiem, kuri iesaistījās pētījumā.

Pateicība arī Dr.biol. Jānim Kloviņam un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par iespēju izstrādāt bakalaura darbu.

Pētījuma finansējums:

- 1) Valsts pētījumu programmas „Biomedicīna sabiedrības veselībai” projekts Nr.2 „Diabēta un kardiovaskulāro komplikāciju molekulārie mehānismi, farmakoģenētika un jauni ārstniecības līdzekļi” Nr. 2.8. apakšprojektā iekļautais pētījums “Antidiabētiskā medikamenta metformīna farmakodinamika”;
- 2) ERAF 1.1.1.1/16/A/091 „Metformīna terapijas ietekmējošo faktoru savstarpējās mijiedarbības izpēte 2.tipa cukura diabēta ārstēšanas efektivitātes prognozēšanai”.

## Izmantotās literatūras avotu saraksts

1. Abubucker S.,Segata N.,Goll J.,Schubert A.M.,Izard J.,Cantarel B.L.,Rodriguez-Mueller B.,Zucker J.,Thiagarajan M.,Henrissat B.,White O.,Kelley S.T.,Méthé B.,Schloss P.D.,Gevers D.,Mitreva M. and Huttenhower C. 2012. Metabolic Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome. – (Eisen, J. A., Ed.) PLoS Computational Biology, 8: e1002358.
2. Amato K.R.,Yeoman C.J.,Cerdeira G.,Schmitt C.A.,Cramer J.D.,Miller M.E.B.,Gomez A.,Turner T.R.,Wilson B.A.,Stumpf R.M.,Nelson K.E.,White B.A.,Knight R. and Leigh S.R. 2015. Variable responses of human and non-human primate gut microbiomes to a Western diet. – Microbiome, 3: 53.
3. American Diabetes Association A.D. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. – Diabetes care, 33 Suppl 1: S62-9.
4. Anonymous 2015. IDF Diabetes Atlas - 7th Edition.
5. Anonymous 2017. Overall view of the human microbiome - Scientific American.
6. Arumugam M.,Raes J.,Pelletier E.,Paslier D. Le,Batto J. michel,Bertalan M.,Borrueel N. and Casellas F. 2013. Enterotypes of the human gut microbiome. – Nature, 473: 174–180.
7. Bäckhed F.,Fraser C.M.,Ringel Y.,Sanders M.E.,Sartor R.B.,Sherman P.M.,Versalovic J.,Young V. and Finlay B.B. 2012. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. – Cell Host & Microbe, 12: 611–622.
8. Bailey C.J.,Wilcock C. and Scarpello J.H.B. 2008a. Metformin and the intestine. – Diabetologia, 51: 1552–1553.
9. Bailey C.J.,Wilcock C. and Scarpello J.H.B. 2008b. Metformin and the intestine. – Diabetologia.
10. Bateman A.,Martin M.J.,O'Donovan C.,Magrane M.,Alpi E.,Antunes R.,Bely B.,Bingley M.,Bonilla C.,Britto R.,Bursteinas B.,Bye-A-Jee H.,Cowley A.,Silva A. Da,Giorgi M. De,Dogan T.,Fazzini F.,Castro L.G.,Figueira L. et al. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. – Nucleic Acids Research, 45: D158–D169.
11. Cox M.,Cookson W. and Moffatt M. 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. – Human Molecular Genetics, 22: 88–94.
12. De La Cuesta-Zuluaga J.,Mueller N.T.,Corrales-Agudelo V.,Velázquez-Mejía E.P.,Carmona J.A.,Abad J.M. and 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: 54–62.
13. Derrien M. and van Hylckama Vlieg J.E.T. 2015. Fate, activity, and impact of ingested

- bacteria within the human gut microbiota. – *Trends in Microbiology*, 23: 354–366.
14. Donaldson G.P., Lee S.M. and Mazmanian S.K. 2015. Gut biogeography of the bacterial microbiota. – *Nature Reviews Microbiology*, 14: 20–32.
  15. Dujic T., Zhou K., Donnelly L.A., Tavendale R., Palmer C.N. and Pearson E.R. 2014. Association of Organic Cation Transporter 1 with Intolerance to Metformin in Type 2 Diabetes: A GoDARTS Study. – *Diabetes*, 64: 1786–1793.
  16. Fan P., Liu P., Song P., Chen X. and Ma X. 2017. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. – *Scientific Reports*, 7: 43412.
  17. Forslund K., Hildebrand F., Nielsen T., Falony G., Le Chatelier E., Sunagawa S., Prifti E., Vieira-Silva S., Gudmundsdottir V., Pedersen H., Arumugam M., Kristiansen K., Voigt A.Y., Vestergaard H., Hercog R., Costea P.I., Kultima J.R., Li J., Jorgensen T. et al. 2015. Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. – *Nature*, 528: 262–266.
  18. Fujisaka S., Avila-Pacheco J., Soto M., Kostic A., Dreyfuss J.M., Pan H., Ussar S., Altindis E., Li N., Bry L., Clish C.B. and Kahn C.R. 2018. Diet, Genetics, and the Gut Microbiome Drive Dynamic Changes in Plasma Metabolites. – *Cell Reports*.
  19. Gong Z. and Muzumdar R.H. 2012. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. – *International Journal of Endocrinology*, 2012.
  20. Goodpaster B., Kelley D., Wing R., Meier A. and Thaete F. 1999. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. – *Diabetes*, 48: 839–847.
  21. Goodrich J.K., Di Rienzi S.C., Poole A.C., Koren O., Walters W.A., Caporaso J.G., Knight R. and Ley R.E. 2014. Conducting a microbiome study. – *Cell*, 158: 250–262.
  22. Goodyear L.J., Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M.F., Goodyear L.J. and Moller D.E. 2001. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. – *Journal of Clinical Investigation*, 108: 1167–1174.
  23. Gorvitovskaia A., Holmes S.P. and Huse S.M. 2016. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. – *Microbiome*, 4: 15.
  24. Gunton J.E., Delhanty P.J.D., Takahashi S.I. and Baxter R.C. 2003. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. – *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88: 1323–1332.
  25. Hamer H., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F. and Brummer R. 2008. Review

- Article: The Role of Butyrate On Colonic Function. – *Aliment Pharmacology Ther.*, 27: 104–119.
26. Hermann-Bank M., Skovgaard K., Stockmarr A., Larsen N. and Mølbak L. 2013. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. – *BMC Genomics*, 14: 788.
  27. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., Creasy H.H., Earl A.M., FitzGerald M.G., Fulton R.S., Giglio M.G., Hallsworth-Pepin K., Lobos E.A., Madupu R., Magrini V., Martin J.C., Mitreva M., Muzny D.M., Sodergren E.J. et al. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. – *Nature*, 486: 207–214.
  28. Jovel J., Patterson J., Wang W., Hotte N., O’Keefe S., Mitchel T., Perry T., Kao D., Mason A.L., Madsen K.L. and Wong G.K.S. 2016. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. – *Frontiers in Microbiology*, 7: 1–17.
  29. Kang D.W., Park J.G., Ilhan Z.E., Wallstrom G., LaBaer J., Adams J.B. and Krajmalnik-Brown R. 2013. Reduced Incidence of *Prevotella* and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. – (Gilbert, J. A., Ed.) *PLoS ONE*, 8: e68322.
  30. Koenig J.E., Spor A., Scalfone N., Fricker A.D., Stombaugh J., Knight R., Angenent L.T. and Ley R.E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1: 4578–4585.
  31. Lalau J. 2010. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. – *Drug Safety*, 33: 727–740.
  32. Lau J.T., Whelan F.J., Herath I., Lee C.H., Collins S.M., Bercik P. and Surette M.G. 2016. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. – *Genome Medicine*, 8: 72.
  33. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K. and Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. – *Nature*, 489: 220–230.
  34. Marietta E. V., Gomez A.M., Yeoman C., Tilahun A.Y., Clark C.R., Luckey D.H., Murray J.A., White B.A., Kudva Y.C. and Rajagopalan G. 2013. Low Incidence of Spontaneous Type 1 Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice Raised on Gluten-Free Diets Is Associated with Changes in the Intestinal Microbiome. – (von Herrath, M. G., Ed.) *PLoS ONE*, 8: e78687.
  35. McCreight L.J., Bailey C.J. and Pearson E.R. 2016a. Metformin and the gastrointestinal tract. – *Diabetologia*.
  36. McCreight L.J., Bailey C.J. and Pearson E.R. 2016b. Metformin and the gastrointestinal

- tract. – *Diabetologia*, 59: 426–435.
37. Methé B. a, Nelson K.E., Pop M., Creasy H.H., Giglio M.G., Huttenhower C., Gevers D., Petrosino J.F., Abubucker S., Jonathan H., Chinwalla A.T., Earl A.M., Fitzgerald M.G., Fulton R.S., Hallsworth-pepin K., Lobos E. a, Madupu R., Magrini V., Martin J.C. et al. 2012. NIH Public Access. – *Nature*, 486: 215–221.
  38. Obregon-Tito A.J., Tito R.Y., Metcalf J., Sankaranarayanan K., Clemente J.C., Ursell L.K., Zech Xu Z., Van Treuren W., Knight R., Gaffney P.M., Spicer P., Lawson P., Marin-Reyes L., Trujillo-Villaruel O., Foster M., Gujja-Poma E., Troncoso-Corzo L., Warinner C., Ozga A.T. et al. 2015. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. – *Nature Communications*, 6: 6505.
  39. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A. and Brown P.O. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. – (Ruan, Y., Ed.) *PLoS Biology*, 5: e177.
  40. Pentikäinen P., Neuvonen P. and Penttilä A. 1979. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. – *European Journal of Clinical Pharmacology*, 16: 195–202.
  41. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y. et al. 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. – *Nature*, 464: 59–65.
  42. Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J. and Bateman A. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. – *Nucleic acids research*, 42: D503-9.
  43. Rojas L.B.A. and Gomes M.B. 2013. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. – *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 5: 6.
  44. Segata N., Waldron L., Ballarini A., Narasimhan V., Jousson O. and Huttenhower C. 2012. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. – *Nature Methods*, 9: 811–814.
  45. Sender R., Fuchs S. and Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. – *PLOS Biology*, 14: e1002533.
  46. Shannon C.E. (n.d.) *A Mathematical Theory of Communication*, 27: 379–423.
  47. Song R. 2016a. Mechanism of metformin: A tale of two sites. – *Diabetes Care*, 39: 187–189.
  48. Song R. 2016b. Mechanism of metformin: A tale of two sites. – *Diabetes Care*.
  49. Sugahara H., Odamaki T., Fukuda S., Kato T., Xiao J. zhong, Abe F., Kikuchi J. and Ohno H. 2015. Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. – *Scientific Reports*, 5: 13548.

50. Tappenden K.A. and Deutsch A.S. 2007. The Physiological Relevance of the Intestinal Microbiota - Contributions to Human Health. – *Journal of the American College of Nutrition*, 26: 679S–683S.
51. Tsoi H.,Chu E.S.H.,Zhang X.,Sheng J.,Nakatsu G.,Ng S.C.,Chan A.W.H.,Chan F.K.L.,Sung J.J.Y. and Yu J. 2017. *Peptostreptococcus anaerobius* Induces Intracellular Cholesterol Biosynthesis in Colon Cells to Induce Proliferation and Causes Dysplasia in Mice. – *Gastroenterology*, 152: 1419–1433.e5.
52. Tun H.M.,Konya T.,Takaro T.K.,Brook J.R.,Chari R.,Field C.J.,Guttman D.S.,Becker A.B.,Mandhane P.J.,Turvey S.E.,Subbarao P.,Sears M.R.,Scott J.A.,Kozyrskyj A.L.,Anand S.S.,Cyr M.,Denburg J.A.,Macri J.,Eiwegger T. et al. 2017. Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infants at 3-4 months following various birth scenarios. – *Microbiome*.
53. Tyler A.D.,Smith M.I. and Silvenberg M.S. 2014. Analyzing the Human Microbiome: A ‘How To’ Guide for Physicians. – *The American Journal of Gastroenterology*, 109: 983–993.
54. Vaughan E.E.,Heilig H.G.H.J.,Ben-Amor K. and De Vos W.M. 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. – *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 477–490.
55. Veiga P.,Pons N.,Agrawal A.,Oozeer R.,Guyonnet D.,Brazeilles R.,Faurie J.M.,van Hylckama Vlieg J.E.T.,Houghton L.A.,Whorwell P.J.,Ehrlich S.D. and Kennedy S.P. 2015. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. – *Scientific Reports*, 4: 6328.
56. Viollet B.,Guigas B.,Garcia N.S.,Leclerc J.,Foretz M. and Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. – *Clinical Science*, 122: 253–270.
57. Weiss G.A.,Chassard C. and Hennet T. 2014. Selective proliferation of intestinal *Barnesiella* under fucosyllactose supplementation in mice. – *British Journal of Nutrition*, 111: 1602–1610.
58. Wheaton W.W.,Weinberg S.E.,Hamanaka R.B.,Soberanes S.,Sullivan L.B.,Anso E.,Glasauer A.,Dufour E.,Mutlu G.M.,Scott Budigner G.R. and Chandel N.S. 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. – *eLife*, 2014: 1–18.
59. Wong J.M.W.,de Souza R.,Kendall C.W.C.,Emam A. and Jenkins D.J.A. 2006. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. – *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40: 235–243.
60. Wu G.D.,Chen J.,Hoffmann C.,Bittinger K.,Chen Y. yu,Sue a,Bewtra M.,Knights

- D., Walters W. a, Knight R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L. and Li H. 2012. NIH Public Access. – *Science*, 334: 105–108.
61. 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. and Bäckhed F. 2017a. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. – *Nature Medicine*.
62. 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. and Bäckhed F. 2017b. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. – *Nature Medicine*.
63. Wylie K.M., Truty R.M., Sharpston T.J., Mihindukulasuriya K.A., Zhou Y., Gao H., Sodergren E., Weinstock G.M. and Pollard K.S. 2012. Novel bacterial taxa in the human microbiome. – *PloS one*, 7: e35294.
64. Zhang Y.J., Li S., Gan R.Y., Zhou T., Xu D.P. and Li H.B. 2015. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. – *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 7493–7519.

# Pielikumi

## Dalībnieku iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji pētījumam.

**Dalībnieka iekļaušanas kritēriji**

- a) Vesela persona, kurai (1) nav zināmu saslimšanu (skatīt 4.2. d-j apakšpunktus) pieteikšanās brīdī, kas varētu ietekmēt pētījuma rezultātus, (2) ķermeņa raksturojoši parametri (piem., svars) atrodas vispārpieņemtā diapazonā, (3) garīgais stāvoklis ļauj personai saprast pētījumu un dot likumīgu piekrišanu dalībai tajā (Royal College of P, 1986);(4) fiziskais stāvoklis ļauj izpildīti pētījuma protokola prasības.
- b) Vecums: 18 – 64\*\* gadi;
- c) Eiropiešu izcelsme\*\*\*;
- d) Gan sievietes, gan vīrieši ar reprodukcijas potenciālu atbilst protokolā izvirzītajām kontracepcijas prasībām (skatīt apakšpunktu 4.3 Kontracepcijas prasības pētījuma dalībniekiem);
- e) Pirms ar pētījumu saistītu procedūru uzsākšanas, ir saņemta dalībnieka piekrišana dalībai pētījumā, iesniedzot parakstītu un datētu informētās piekrišanas dokumentu.

**Dalībnieka izslēgšanas kritēriji**

- a) Personai ir alerģija pret *Metforal* 850mg sastāvā esošajām vielām;
- b) Tiek lietoti citi medikamenti, kas nav savietojami ar *Metforal* 850mg lietošanu (skatīt apakšpunktu 4.4 Mijiedarbība ar citām zālēm un citi mijiedarbības veidi);
- c) Sieviete iestājusies grūtniecība\*\*\*\* vai ir ar krūti barojams bērns;
- d) Ir 1. vai 2. tipa cukura diabēts, pankreatogēns cukura diabēts vai glikozes tolerances traucējumi (novērtē pēc bioķīmiskajiem rādītājiem asins paraugos: HbA1c);
- e) Ir diagnosticēts policistisko olnīcu sindroms;
- f) Ir hroniskas zarnu trakta, onkoloģiskas vai autoimūnas slimības;
- g) Nieru mazspēja vai nieru darbības traucējumi (glomerulārās filtrācijas ātrums neatbilst normai pēc Kokrofta-Golta metodes);
- h) Ir aknu darbības traucējumi (ALAT mērījumi neatbilst normai) vai alkoholisms;
- i) Akūti stāvokļi ar potenciālu ietekmi uz nieru darbību, piemēram,
  - a. dehidratācija,
  - b. smaga infekcija,
  - c. šoks.
- j) Akūta vai hroniska slimība, kas var izraisīt audu hipoksiju, piemēram,
  - a. sirds vai elpošanas mazspēja,
  - b. neseno pārciests miokarda infarkts,
  - c. šoks.
- k) Pēdējās nedēļas laikā bijusi caureja;
- l) Iepriekš ilgstoši lietots metformīns;
- m) Pēdējo divu mēnešu laikā lietoti sekojoši medikamenti:
  - a. antibiotikas,
  - b. probiotiķi tablešu/kapsulu veidā,
  - c. protonu sūkņu inhibitori (piemēram, omeprazols (Gasec Gastrocaps, Lomac), lansoprazols, pantoprazols, u.c.),
  - d. Imūnsupresīvi medikamenti (piemēram, metotreksāts u.c.),
  - e. Kortikosteroīdi (piemēram, kortizons, hidrokortizons, prednizolons, u.c.);
- n) Paralēli pētījumam ir paredzēti izmeklējumi, intravaskulāri ievadot jodu saturošas kontrastvielas.

\*\* Vecums 18 - 64 - zarnu mikrobioma pētījumos 64 gadi tiek pieņemti par robežas vecumu, no kura sākot tiek definēta senjoru grupa. Senjoriem, salīdzinot ar gados jaunāku populāciju, ir novērotas atšķirības zarnu mikrobioma kompozīcijā [2, 3]. Šajā pētījumā tiks iesaistīti tie cilvēki vecumā līdz 64 gadiem, kuriem nav noteikta kāda no izslēgšanas kritērijos minētajām pazīmēm, citas pazīmes tiks iekļautas aprēķinos kofaktoru formā.

\*\*\* Ņemot vērā Latvijas populācijas sastāva īpatnības, lai nodrošinātu pietiekami apjomīgu homogēnu paraugkopu, pētījumā tiks iesaistīti Eiropiešu izcelsmes dalībnieki.

\*\*\*\* Pētījuma dalībnieces ar reprodukcijas potenciālu parakstot informētas piekrišanas formu papildus tiks lūgtas ar parakstu apliecināt grūtniecības neesamību (skatīt pielikumu 2.7 Apliecinājums par grūtniecības neesamību).

**Piekrišanas veidlapa**

Apliecinu, ka esmu izlasījis (-usi) un izpratis (-usi) informācijas lapas sniegto informāciju par projekta „Diabēta un kardiovaskulāro komplikāciju molekulārie mehānismi, farmakoģenētika un jauni ārstniecības līdzekļi” ietvaros īstenotajiem metformīna darbības mehānismu pētījumiem.

Pētniece/ks \_\_\_\_\_

Man ir izskaidrojies informāciju par cilvēka zarnu mikrobioma izpētes projekta mērķiem un norises gaitu.

Man tika dots laiks un iespēja rūpīgi izlasīt šo informāciju un patstāvīgi izlemt, vai piedalīties šajā pētījumā.

Piekrītu piedalīties minētajā projektā brīvprātīgi un bez maksas.

**PIEKRĪTU, KA MANI AUDU UN ZARNU MIKROBIOMA (FĒČU) PARAUGI TIKS IZMANTOTI PROJEKTA IETVAROS VEIKTAJOS PĒTĪJUMOS.**

Manu audu paraugu un veselības stāvokļa aprakstu nosūtīšanu ģenētiskajai izpētei ārpus Latvijas (vajadzīgo atzīmēt):

atļauju;

aizliedzu.

Apliecinu, ka piekrītu, turpmākai komunikācijai, ja pētījuma laikā rodas šāda nepieciešamība. Es piekrītu piedalīties pētījumā.

Dalībnieka vārds,  
uzvārds  
(drukātiem burtiem)

Kontaktinformācija

Adrese:

Tālrunis:

e-pasts:

Dalībnieka paraksts \_\_\_\_\_ datums \_\_\_\_\_

(dd.mm.gg., datē pacients)

Pētnieka vārds, uzvārds (drukātiem burtiem) \_\_\_\_\_

Pētnieka paraksts: \_\_\_\_\_ datums \_\_\_\_\_

## Aptaujas anketa mikrobioma projektam.

## APTAUJAS ANKETA MIKROBIOMA PROJEKTAM

## 1. Vai Jūs pēdējo 2 mēnešu laikā esat lietojis antibiotikas?

 Jā

Kādas? \_\_\_\_\_

 Nē Nezinu

## 2. Kurus no šiem zāļu preparātiem Jūs esat lietojis pēdējo 2 mēnešu laikā?

 Imūnsupresīvus medikamentus (piem. Metotreksāts u.c.) Kortikosteroīdus (piem. kortizons, hidrokortizons, prednizolons, u.c.) Probiotiskus (tablešu/kapsulu veidā) Citus medikamentus \_\_\_\_\_ Neesmu lietojis nekādus medikamentus Nezinu, vai ir lietoti minētie medikamenti

## 3. Vai Jums pēdējās nedēļas laikā ir bijusi caureja (šķidra vēdera izeja trīs un vairāk reizes dienā)?

 Jā Nē

## 4. Kāda ir Jūsu ikdienas diēta?

 Visēdājs Veģetārietis Vegāns Svaigēdājs Cita specifiska (atzīmējiet, kāda!): Bezlaktozes diēta Bezglutēna diēta Notievēšanas/svara samazināšanas diēta Cita \_\_\_\_\_

## 5. Vai ikdienā uzturā lietojat bezkaloriju saldinātājus cukura aizvietošanai?

 Jā Nē

## 6. Jūs piedzimāt:

 Dabiskās dzemdībās Ar ķeizargriezienu Nezinu

## 7. Vai Jūs tikāt barots ar krūti?

 Nē Jā (ja zināt, tad cik ilgi?) \_\_\_\_\_ Nezinu

## 8. Vai Jums ir konstatēta saslīmšana ar autoimūnām slimībām?

 Nē Jā (ar kādām?) 1.tipa cukura diabēts Celiakija Hašimoto tireoidīts Greivsa slimība Krona slimība Psoriāze Reimatoīdais artrīts

Cita \_\_\_\_\_

## Aptaujas anketa mikrobioma projektam.

## 9. Vai Jums ir konstatēta saslimšana ar kādu gremošanas trakta slimību?

- Nē
  Jā (kādam?) \_\_\_\_\_  
 Gastrīts  
 Duodenīts  
 Kuņģa vai 12-pirkstu zarnas čūlas  
 Kairinātas zarnas sindroms  
 Laktozes nepanesamība  
 Hepatīti  
 Pankreatīti  
 Cita \_\_\_\_\_

## 10. Cik reizes vidēji dienā Jūs parasti ēdat?

- 1 – 2 reizes  
 3 – 4 reizes  
 5 – 6 reizes  
 7 un vairāk reizes

## 11. Cik reizes nedēļā Jūs parasti ēdat gaļas produktus?

- Gaļu uzturā nelietoju  
 1 – 2 reizes  
 3 – 4 reizes  
 5 – 6 reizes  
 7 un vairāk reizes

## 12. Cik reizes nedēļā Jūs parasti ēdat pienu un tā produktus?

- Pienu un/vai tā produktus uzturā nelietoju  
 1 – 2 reizes  
 3 – 4 reizes  
 5 – 6 reizes  
 7 un vairāk reizes

## 13. Cik reizes nedēļā Jūs parasti ēdat dārzeņus un augļus?

- Dārzeņus un augļus uzturā nelietoju  
 1 – 2 reizes  
 3 – 4 reizes  
 5 – 6 reizes  
 7 un vairāk reizes

## 14. Cik reizes nedēļā Jūs parasti ēdat graudaugu produktus? (griķi, rīsi, manna, maize, makaroni u.c.)

- Graudaugu produktus uzturā nelietoju  
 1 – 2 reizes  
 3 – 4 reizes  
 5 – 6 reizes  
 7 un vairāk reizes

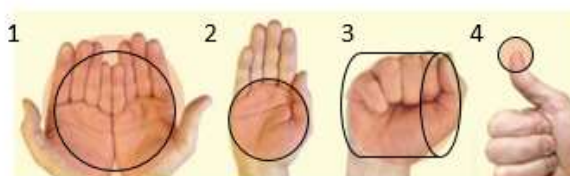
Vecums: \_\_\_\_\_; Dzimums: siev.  vīr. ; Augums: \_\_\_\_\_; Svars \_\_\_\_\_

Paldies par atbildēm!

Datums \_\_\_\_\_

Ēdienreize	≈Cikos?	Ēdieni (porcijas lielums)	Dzērieni (tilpums)
Brokastis			
Pusdienas			
Vakariņas			
Uzkodas/dzērieni starp ēdienreizēm			

## Ēdiena/dzēriena porcijas lieluma/tilpuma noteikšana



1 - divas pilnas saujas; 2 – plauksta; 3 – dūre; 4 – tīkšķa gals



Glāze ≈ 200ml

**MIKIMEK pētījuma anketa par metformīna  
nepanesamību/novērotajām blaknēm**

KODS:

1. **Vai pētījuma laikā izmainījāt savu ierasto diētu?**  
 JĀ                       NĒ
2. **Vai vienmēr lietojāt metformīnu ēšanas laikā/neilgi pēc tās?**  
 JĀ                       NĒ
3. **Kura ir Jūsu vadošā roka?**  
 Labā                       Kreisā
4. **Kāda ir Jūsu asinsgrupa?**  
 0                       A                       B                       AB
5. **Vai novērojāt blaknes metformīna lietošanas laikā?**  
 JĀ                       NĒ

Ja atbildējāt JĀ, tad, lūdzu, atbildiet uz tālākajiem jautājumiem!

6. **Kādas blaknes Jūs novērojāt metformīna lietošanas laikā?** (aizpildiet sekojošo tabulu, atzīmējot novērotās blaknes un norādiet tām atbilstošo laiku)

Blakne	Pētījuma diena (1-7)	Blaknes novērošanas laiks: ēšanas laikā (Ē)/ starp ēdienreizēm (S) (papildus atzīmējiet ar „+”, ja blakne tika novērota <u>2-3 stundu laikā</u> pēc metformīna lietošanas)
<input type="checkbox"/> nelabums		
<input type="checkbox"/> vājums		
<input type="checkbox"/> atraugas		
<input type="checkbox"/> meteorisms (vedera pūšanās)		
<input type="checkbox"/> vemšana		
<input type="checkbox"/> šķidra vēdera izeja (2x dienā)		
<input type="checkbox"/> caureja (≥4x dienā)		
<input type="checkbox"/> svara zudums		Cik liels?
<input type="checkbox"/> citi novērojumi _____ _____ _____ _____		

7. **Vai novēroto blakņu dēļ pārtraucāt lietot metformīnu ātrāk par noteikto laiku?**

JĀ                       NĒ

Ja atbildējāt JĀ, tad kurā pētījuma dienā? \_\_\_\_\_

Cik ilgi pēc metformīna lietošanas pārtraukšanas vēl bija novērojamas blaknes?

\_\_\_\_\_

Paldies par atbildēm!

# Mikrobioma paraugu ievākšanas protokols

Fēču paraugu ievākšanai Jums ir izsniegti divi speciāli tam paredzēti (kodēti) stobriņi ar etiķetēm un šī pamācība.

Fēču paraugs nedrīkst nonākt saskarē ar tualetes poda virsmu, urīnu, ūdeni un tīrīšanas līdzekļiem!

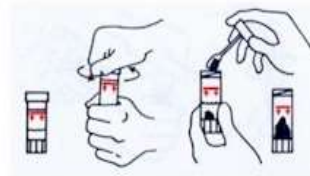
1. Nomazgājiet rokas pirms parauga ievākšanas.
2. Svaigu fēču paraugu sākumā novietojiet **sausā, tīrā tvertnē** (plastmasas maisiņš, plastmasas trauks, stikla burciņa ar platu atveri).
3. Uzmanīgi atveriet speciālo stobriņu un ar tajā ievietoto karotīti paņemiet nelielu daudzumu fēču no vismaz trīs dažādām vietām un dziļuma (*kopā aptuveni no stobriņa tilpuma –1/4*). Ja fēces ir cietas konsistences, kā paraugu paņemiet nelielus gabaliņus gan no vidusdaļas, gan galiem. Stobriņu cieši aizskrūvējiet. Atkārtojiet parauga ievākšanu ar otru stobriņu.
4. Abiem stobriņiem uz etiķetēm tam paredzētajās vietās uzrakstiet paraugu **ievākšanas datumu un laiku!**
5. Pēc procedūras nomazgājiet rokas.
6. Stobriņus uzglabājiet **istabas temperatūrā** un pēc iespējas ātrākā laikā (**maksimāli – 3 dienas**) nogādājiet tos attiecīgajā medicīnas iestādē.



Fēču paraugs nedrīkst nonākt saskarē ar tualetes podu vai jebkādiem šķidrumiem



Fēču paraugu novietojiet **sausā, tīrā** tvertnē



Ar speciālajā stobriņā esošo karotīti paņemiet prasīto daudzumu fēču un ievietojiet stobriņā.



Nomazgājiet rokas rūpīgi pirms un pēc parauga ievākšanas!

Uz stobriņa uzrakstiet datumu un laiku!

Desmit signālceļu pārstāvji ar būtiskākajām izmaiņām starp paraugu ievākšanas laikiem.

Paraugi	Signālceļa nosaukums	LogFC	P-vērtība	FDR
M0 un M24h	<i>L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle)</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>phosphatidylglycerol biosynthesis I (plastidic)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>phosphatidylglycerol biosynthesis II (non-plastidic)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>anaerobic energy metabolism (invertebrates, cytosol)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>formaldehyde assimilation II (RuMP Cycle)</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>ppGpp biosynthesis</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>NAD salvage pathway I</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of phospholipid biosynthesis I (bacteria)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>L-ornithine biosynthesis</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>heme biosynthesis II (anaerobic)</i>	<-0.01	0.99	1.00
M0 un M7d	<i>sulfate reduction I (assimilatory)</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of glucose and xylose degradation</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis I</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>glycolysis IV (plant cytosol)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of L-serine and glycine biosynthesis</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>thiamin formation from pyrithiamine and oxythiamine (yeast)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis II</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>petroselinic acid biosynthesis</i>	<0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of pyrimidine deoxyribonucleosides degradation</i>	<-0.01	0.99	1.00
M24h un M7d	<i>superpathway of glucose and xylose degradation</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>glycolysis VI (metazoan)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of purine nucleotide salvage</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>NAD salvage pathway I</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>gluconeogenesis III</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>TCA cycle I (prokaryotic)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>phytate degradation I</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)</i>	<-0.01	0.99	1.00
	<i>superpathway of purine deoxyribonucleosides degradation</i>	<-0.01	0.99	1.00
<i>superpathway of glycolysis and Entner-Doudoroff</i>	<-0.01	0.99	1.00	

Bakalaura darbs “Antidiabētiskā medikamenta metformīna izraisītās funkcionālās izmaiņas cilvēka zarnu mikrobiomā” izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Ilze Izabella Dindune 30.05.2018

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: MSc.biol. Ilze Elbere 30.05.2018

Recenzents: Dr.biol. Renāte Ranka 05.06.2018

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 30.05.2018.

Metodiķe: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts bakalaura darbu gala pārbaudījuma komisijas sēdē

05.06.2018. prot. Nr. \_\_\_\_, vērtējums \_\_\_\_

Komisijas sekretārs: