

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

SAIMNIEKORGANISMA MIRNS UN ZARNU  
MIKROBIOMA MIJIEDARBĪBA DAŽĀDOS  
KOLONOSKOPIJAS IZMEKLĒJUMU PARAUGOS

Bakalaura darbs

Autors: Paula Rūta Celmiņa  
Stud.apl.Nr. pc 19011  
Darba vadītājs: Mag. biol. Laila Silamiķele

RĪGA 2022

# Saturs

|   |    |
|---|----|
| Saturs.....   | 2  |
| Kopsavilkums.....   | 4  |
| Summary .....   | 5  |
| Darbā lietotie saīsinājumi.....   | 6  |
| Ievads .....  | 7  |
| 1. LITERATŪRAS APSKATS.....   | 8  |
| 1.1. Gastrointestinālais trakts .....   | 8  |
| 1.2. Gastrointestinālā trakta slimības .....  | 9  |
| 1.3. Kolonoskopija .....  | 11 |
| 1.4. Mikrobioms .....   | 12 |
| 1.5. MiRNS .....  | 14 |
| 1.6. MiRNS un zarnu mikrobioma mijiedarbība.....  | 15 |
| 2. MATERIĀLI UN METODEDES .....   | 17 |
| 2.1. Izmantotās iekārtas un materiāli.....  | 17 |
| 2.2. Metodes .....  | 20 |
| 2.2.1. Pētījuma dizains .....   | 20 |
| 2.2.2. Totālās RNS izdalīšana no zarnu biopsiju paraugiem.....  | 21 |
| 2.2.3. RNS koncentrācijas noteikšana.....   | 22 |
| 2.2.4. RNS kvalitātes pārbaude .....  | 23 |
| 2.2.5. RNS koncentrēšana .....  | 24 |
| 2.2.6. RNS atšķaidīšana .....   | 25 |
| 2.2.7. MiRNS bibliotēku sagatavošana ar QIAseq miRNA Library Kit reaģentu komplektu .....                 | 25 |
| 2.2.8. Bakteriālās DNS izdalīšana no fēču paraugiem ar <i>FastDNA SPIN Kit for Soil</i> . 31              |    |
| 2.2.9. Metagenoma bibliotēku sagatavošana ar <i>MGIEasy DNA Library Prep Set</i> reaģentu komplektu ..... | 32 |
| 2.2.10. Sekvencēšana .....  | 40 |
| 2.2.11. Darba drošība .....   | 40 |
| 2.2.12. Datu apstrāde.....  | 41 |
| 3. REZULTĀTI.....   | 42 |
| 3.1. MiRNS kompozīcija zarnu biopsiju paraugos .....  | 42 |
| 3.2. Atšķirīgi sastopamās miRNS zarnu biopsiju paraugos .....   | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3. Korelācija starp fēču miRNS un zarnu mikrobiomu.....     | 45 |
| 4. DISKUSIJA .....  | 47 |
| 4.1. Atšķirīgi sastopamās miRNS zarnu biopsiju paraugos ..... | 47 |
| 4.2. Korelācija starp fēču miRNS un zarnu mikrobiomu.....     | 48 |
| Secinājumi.....   | 50 |
| Pateicības.....   | 51 |
| Literatūras saraksts.....                                     | 52 |

## Kopsavilkums

Cilvēka gastrointestinālajā traktā ir daudzveidīgs mikrobioms, kam ir būtiska loma veselības uzturēšanā un fizioloģisko funkciju veikšanā organismā. Mikrobioma traucējumi ietekmē imūnsistēmas funkcijas, vielmaiņu, kā arī saistīti ar dažādām slimībām. MikroRNS (miRNS) ir nozīmīga loma gēnu ekspresijas regulēšanā. Pētījumos noskaidrots, ka saimniekorganisma miRNS tieši ietekmē zarnu mikrobiomu, tādējādi potenciāli nodrošinot daudzsološu stratēģiju, lai mērķtiecīgi modificētu mikrobiomu.

Lai noskaidrotu, vai pacientu, kuriem dažādu iemeslu dēļ ir veikta kolonoskopija, zarnu biopsiju miRNS korelē ar fēču mikrobiomu veikta mazo RNS un metagenoma sekvencēšana. MiR-200, miR-151, miR-30 saimes pozitīvi korelē ar *Tannerellaceae* un *Lachnospiraceae* dzimtas pārstāvjiem. Hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-146b-5p miRNS pozitīvi korelē ar *Actinomycetaceae* un *Oscillospiraceae* dzimtas pārstāvjiem.

**Atslēgas vārdi:** gastrointestinālā trakta slimības, miRNS, zarnu mikrobioms, metagenoms

## Summary

The human gastrointestinal tract contains a diverse microbiome that has a fundamental role in maintaining health and performing important physiological functions in the human body. Microbiome disruption affects the immune function, metabolism, and is involved in several diseases. MicroRNAs (miRNA) have an important role in the regulation of gene expression. Studies have shown that miRNAs of the host have a direct impact on gut microbiome, thus potentially providing a promising strategy to modify the microbiome in a targeted fashion.

To determine whether there is a correlation between intestinal biopsy miRNAs and the gut microbiome composition, small RNA and metagenome sequencing were performed. MiR-200, miR-151, miR-30 family members positively correlated with *Tannerellaceae* and *Lachnospiraceae* family members. Hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-146b-5p miRNS positively correlated with *Actinomycetaceae* un *Oscillospiraceae* dzimtas pārstāvjiem.

**Key words:** gastrointestinal tract diseases, miRNA, gut microbiome, metagenome

## Darbā lietotie saīsinājumi

GI – gastrointestinālais

miRNS – īsa, proteīnu nekodējoša RNS

molekula

RNS – ribonukleīnskābe

DNS – dezoribonukleīnskābe

H&E – hematoksilīns un eozīns

GERS – gastroezofageāla refluksa slimība

PPI tests – GERS diagnostikā izmantots tests slimnieka sūdzību analīze pirms un pēc sālskābes sekrēciju mazinošu medikamentu lietošanas (no angļu val. *The proton pump inhibitor*)

KRV – korrektālais vēzis

GIST – gastrointestinālais stromas audzējs

gFOBT tests – slēpta asins piejaukuma gvajaka tests fēcēs (no angļu val. *Guaiac fecal occult blood test*)

FIT tests – imūnķīmiska slēpta asins piejaukuma tests (no angļu val. *Fecal immunochemical test*)

ČK – čūlainais kolīts  
CCD – lādiņpārneses ierīce (no angļu val. *Charge-coupled device*)

pH – skaitlis, kas raksturo ūdeņraža jonu koncentrāciju šķīdumā

NIH – Nacionālais veselības institūts (no angļu val. *National Institutes of Health*)

pri-miRNS – primārais prekursors

pre-miRNS – daļēji divpavedienu cilpkāta RNS struktūra

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss

HBV – hepatīta B vīruss

HCV – hepatīta C vīruss

NGS – nākamās paaudzes sekvencēšana

DNB – dezoksiribonukleīnskābes nanobumba

NAD<sup>+</sup> – nikotīnamīda adenīna nukleotīds

NADH – nikotīnamīda adenīna nukleotīds

(NAD)<sup>+</sup> ūdeņradis (H)

ND5 – NADH dehidrogenāzes subvienība 5

COX1 – citohroma C oksidāze 1

## Ievads

Vairāk nekā 40% cilvēku visā pasaulē slimo ar gastrointestinālā trakta slimībām, kas ietekmē dzīves kvalitāti un veselības aprūpes izmantošanu. Tās ir plaši sastopamas visā pasaulē (Sperber et al., 2021).

Mikrobioms ir kādā noteiktā vidē esošo mikroorganismu (baktēriju, sēņu, viēšņu un/vai vīrusu) un to gēnu kopums, piemēram, cilvēka vai dzīvnieka ķermenī un uz tā (Fukuda & Ohno, 2014) Zarnu mikrobioms attēlo mikroorganismu populāciju, kas dzīvo mūsu zarnās. Cilvēkiem zarnās ir vairāk nekā  $10^{14}$  mikroorganismu, un mikrobioma daudzveidība un blīvums palielinās virzienā no kuņģa līdz resnajai zarnai (Patel et al., 2016).

Kolonoskopija plaši izmantota metode resnās zarnas slimību diagnosticēšanai un ārstēšanai, un tiek izmantota kā viena no precīzākajām metodēm diagnostikā (Rex et al., 2006). Visplašāk kolonoskopija tiek izmantota tieši kolorektālā vēža skrīningā un diagnostikā, taču ar to precīzi iespējams diagnosticēt arī tādas slimības kā gastrītu, zarnu polipus, gastroezofageāla refluksa slimību u.c.

MikroRNS (miRNS) ir nelielas, aptuveni 22 nukleotīdus garas vienpavediena nekodējošas molekulas, kurām ir nozīmīga loma gēnu ekspresijas regulēšanā (O'Brien et al., 2018). Ir nepieciešams papildināt esošo informāciju par saimniekorganisma miRNS un mikrobioma savstarpējo mijiedarbību arī dažādu slimību kontekstā, lai nākotnē miRNS varētu potenciāli pielietot ārstēšanas terapijā, modulējot zarnu mikrobioma kompozīciju.

**Darba mērķis:** novērtēt, vai pastāv korelācija starp zarnu biopsiju miRNS un zarnu mikrobioma sastāvu pacientu paraugos, kuriem tika veikta kolonoskopijas procedūra un kuri slimo ar dažādām gastrointestinālā trakta slimībām.

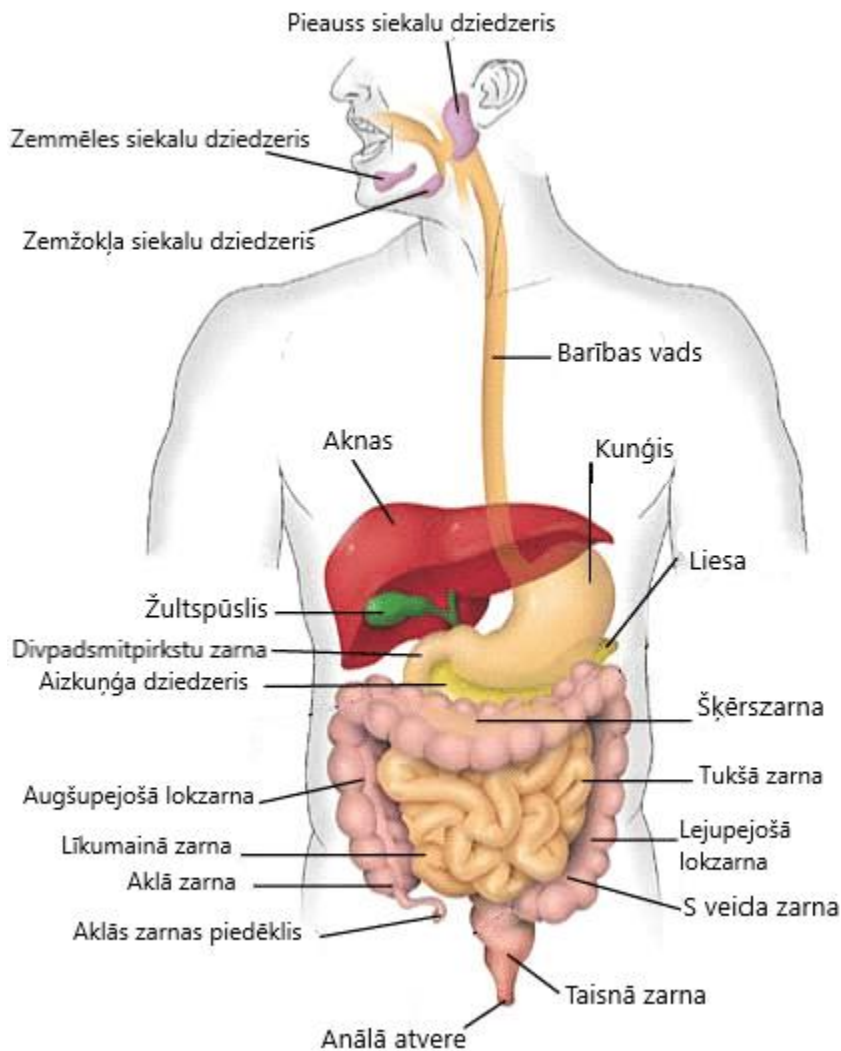
Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi:**

1. Noteikt miRNS kompozīciju zarnu biopsiju paraugos, veicot totālās RNS izdalīšanu, miRNS bibliotēku sagatavošanu un datu analīzi.
2. Noteikt, vai starp zarnu biopsiju miRNS un zarnu mikrobiomu pastāv korelācija, veicot DNS izdalīšanu, metagenoma bibliotēku sagatavošanu un datu analīzi.
3. Analizēt atšķirīgi sastopamās miRNS zarnu biopsiju paraugos.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Gastrointestinālais trakts

Gastrointestinālais trakts (GI), saukts arī par gremošanas traktu vai gremošanas kanālu, ir daudzšūnu dzīvnieku orgānu sistēma, kas uzņem barību, sagremo to, lai iegūtu enerģiju un barības vielas, un izvada nevajadzīgos produktus. Galvenās GI trakta funkcijas ir gremošana, ko veicina kustība, sekrēcija un uzsūkšanās (Liao et al., 2009). Medicīniskās attēlveidošanas metodes, piemēram, ultrasonogrāfija (Berstad et al., 1996), magnētiskā rezonanse (Frøkjær et al., 2005), endoskopiskā ultrasonogrāfija (Gilja et al., 2006) un kolonoskopija (Lieberman et al., 2009) ir labi zināmas atsevišķas klīniskas metodes, kas var atklāt strukturālas un funkcionālas novirzes GI traktā. Veicot autopsiju, ir noskaidrots, ka kopumā cilvēka GI trakts ir aptuveni deviņus metrus garš (Hounnou et al., 2002). GI trakts sākas no mutes un sniedzas līdz anālai atverei un ir saistīts ar citiem orgāniem, tostarp aknām, aizkuņģa dziedzeri un žultspūsli. GI trakts sastāv no vairākiem nodalījumiem: mutes dobuma, rīkles, barības vada, kuņģa, tievās zarnas, resnās zarnas, taisnās zarnas, anālā kanāla un anālās atveres. Zarnu sienieņu veido četri slāņi: gļotāda, zemgļotādas slānis, ārējais muskuļslānis un serozais apvalks (Reed & Wickham, 2009). Šajos nodalījumos ir funkcionāli specializēti reģioni, piemēram, tievā zarna iedalās divpadsmitpirkstu zarnā, tukšajā zarnā un likumainā zarnā. Zarnu satura pārejas regulēšanā starp galvenajām funkcionāli atšķirīgajām GI trakta zonām būtiska loma ir sfinkteriem – gredzenveida slēdzējmuskuļiem, kas saraujoties noslēdz vai sašaurina atveri (Saffrey, 2014).



1. attēls. Cilvēka gastrointestinālā trakta uzbūve. Pielāgots no (Periyasamy & Pandey, 2013).

Figure 1. Structure of the human gastrointestinal tract. Adapted from (Periyasamy & Pandey, 2013).

## 1.2. Gastrointestinālā trakta slimības

Zarnas divertikuloze ir visizplatītākā resnās zarnas anatomiskā izmaiņa, kam raksturīga zarnu divertikulu veidošanās. Divertikuli ir nelieli maisveida padziļinājumi zarnas sienā, kad zarnas gļotādas un zemgļotādas slānis izspiežas caur zarnas muskuļslāņa pavājinātiem punktiem (Tursi, 2016). Lai gan lielākai daļai cilvēku slimība ir asimptomātiska, aptuveni 20% pacientu attīstās simptomi, šajā gadījumā pacientam veidojas divertikulīts, veidojas zarnu iekaisums (Strate et al., 2013). Divertikulozes sastopamība pasaulē ir 33-66% . No šiem pacientiem 10-25% laika gaitā attīstās akūta divertikulīta epizode (Jacobs, 2007). Slimības saasinājuma gadījumā divertikulos,

kad attīstās akūts iekaisums, rodas asas sāpes vēdera kreisajā pusē, drudzis, caureja vai aizcietējums, dažkārt arī nelaba dūša un vemšana. Asins ainā atrodams leikocītu skaita pieaugums virs normas (Tursi, 2016). Zarnas divertikulozi visprecīzāk diagnosticē ar kolonoskopijas metodi, kuru veic intravenozā anestēzijā. Var veikt arī rentgenoloģisku zarnas izmeklēšanu ar kontrastvielu jeb irigoskopiju (Daniels et al., 2014).

Hronisks gastrīts ir daudzpakāpju, progresējošs kuņģa gļotādas iekaisums mūža garumā (Valle et al., 1996). Vairumā gadījumu ir gastrīta cēlonis ir *Helicobacter pylori*, kas ilgstoši radot iekaisumu kuņģa gļotādā var pakāpeniski izraisīt kuņģa gļotādas atrofiju, kā arī radīt kuņģa gļotādas šūnu izmaiņas, kas ilgstošā laika periodā atsevišķiem pacientiem var novest pie kuņģa vēža attīstīšanās. Iespējams izņēmums ir autoimūnas izcelsmes gastrīts, kas rada izteiktu kuņģa gļotādas atrofiju, kad kuņģis vairs nevar izdalīt vielas, kas palīdz uzsūkties B12 vitamīnam. (Sipponen & Maaros, 2015). Hroniska gastrīta diagnosticēšanai ir četras dažādas metodes: hematoksilīna un eozīna (H&E) iztriepe, Giemsa iztriepe – specifiska DNS fosfātu grupām, piesaistās DNS reģioniem, kur ir liels adenīna-timīna saites daudzums, ureāzes eksprestests un nospiedumu citoloģija pacientiem, kuriem veikta kolonoskopija (Pylori et al., 2005).

Peptiskas čūlas ir kuņģa skābes un enzīma pepsīna radīti bojājumi barības vada, kuņģa vai divpadsmitpirkstu zarnas sienīnā (Oh et al., 2020). Visbiežāk peptiskās čūlas gadījumi ir saistīti ar *Helicobacter pylori* infekciju vai nesteroido pretiekaisuma līdzekļu lietošanu. Divām trešdaļām pacientu slimība noris asimptomātiski, taču savlaicīga diagnostika un ārstēšana peptisko čūlu gadījumā, ir ļoti būtiska (Kavitt et al., 2019). Slimības diagnostikas metodes ir: urīnvielu tests, izelpas pārbaude, fēču antigēna pārbaude, ureāzes eksprestests, seroloģiskā pārbaude vai kuņģa biopsiju histoloģija, kas ņemta kolonoskopijas laikā (Chey et al., 2017).

Gastroezofageālā refluksa slimība (GERS) ir gremošanas traucējumi, kas ietekmē barības vada sfinkteri starp barības vadu un kuņģi. Kuņģa skābe bieži ieplūst atpakaļ barības vadā, kas rada kairinājumu barības vada gļotādā. Raksturīgākais GERS simptoms ir grēmas jeb dedzināšanas sajūta aiz krūšu kaula (Clarrett & Hachem, 2018). Diagnostikā plaši tiek pārbaudīta slimnieka sūdzību analīze pirms un pēc sālsskābes sekrēciju mazinošu medikamentu lietošanas (PPI tests), kā arī kolonoskopija, kā izšķiroša izmeklēšanas metode endoskopiski pozitīvas GERS apstiprināšanai un barības vada bojājumu smaguma noteikšanai (Kandulski et al., 2018).

Kolorektālais vēzis (KRV) ir vēža veids, kas sākas resnajā vai taisnajā zarnā – resnās zarnas beigu daļā (Mattiuzzi et al., 2019). Tas ir trešais izplatītākais vēža izraisītais mirstības cēlonis visā pasaulē ar vairāk nekā 1,85 miljoniem gadījumu un 850 000 nāves gadījumu gadā (Biller & Schrag,

2021). Adenokarcinoma ir visizplatītākais kolorektālais ļaundabīgais audzējs līdz 95% gadījumos, kam seko karcinoīdie audzēji, gastrointestinālie stromas audzēji (GIST), limfomas un sarkomas (Fleming et al., 2012). Slimība var izraisīt zarnu motilitātes izmaiņas (piemēram, caureju vai aizcietējumu), pastāvīgu sajūtu, ka nepieciešama zarnu iztukšošana, slēptu vai acīmredzamu kolorektālu asiņošanu, kā arī diskomfortu vēderā, krampjus, neizskaidrojamu ķermeņa masas zudumu, vājumu un nogurumu, jo īpaši pacientiem ar vēzi progresējošā stadijā (Glover et al., 2019). Ieteicamās skrīninga un diagnostikas metodes ietver kolonoskopiju (ik pēc 10 gadiem), elastīgo sigmoidoskopiju (ik pēc 5 gadiem), slēpta asins piejaukuma gvajaka testu fēcēs (gFOBT) vai imūnķīmiska slēpta asins piejaukuma testu (FIT), abus atkārtoti reizi gadā vai reizi divos gados (Bnard et al., 2018).

Čūlainais kolīts (ČK) ir hronisks idiopātisks resnās zarnas iekaisīgs zarnu traucējums, kas izraisa nepārtrauktu gļotādas iekaisumu, un sākas taisnajā zarnā (Gajendran et al., 2019). ČK viens no galvenajiem simptomiem ir bieža vēdera izeja. Var būt caureja, bieži vien ar asinīm vai strutām, un tā var sākties gan pakāpeniski, gan pēkšņi. Raksturīgas arī sāpes vēderā un krampji, taisnās zarnas sāpes un asiņošana – neliela asiņu daudzuma izdalīšanās ar fēcēm (Halling et al., 2017). Diagnozes apstiprināšanai visos iespējamajos gadījumos jāveic kolonoskopija ar gļotādas biopātū morfoloģisku izmeklēšanu. Tiek veikta fēcū paraugu analīze, asins analīzes – paaugstināts leikocītu daudzums asinīs norāda uz smagu slimības gaitu. Dzelzs deficīta skrīnings (pilna asins aina, feritīns, transferīna piesātinājums) jāveic aptuveni reizi gadā, pat pacientiem ar klīnisku remisiju (Kucharzik et al., 2020).

Zarnu polipi ir kolorektālā vēža pirmsvēža bojājumi, kas izpaužas kā nelīdzenumi gļotādā (L. Liu et al., 2021). Visbiežāk sastopamā klīniskā izpausme zarnu polipiem ir nesāpīga taisnās zarnas asiņošana vai piejaukumi fēcēs (Parra & Navarro, 2008). Visplašāk izmantotā metode polipu diagnostikā ir histoloģiska tipēšana, paraugus iegūstot kolonoskopijas laikā. Pirms tam jāiegūst detalizēta ģimenes slimību vēsture par vēzi, polipiem un iedzimtām patoloģijām (Schulmann et al., 2007).

### **1.3. Kolonoskopija**

Kolonoskopija ir plaši izmantota metode resnās zarnas slimību diagnosticēšanai un ārstēšanai. Izmeklēšanas laikā tiek izmantota elastīga caurule ar lādiņpārneses ierīces (CCD) kameru, kurai ir fotoelektrisku pusvadītāju matrica ar ļoti augstu jutību, vai optisko šķiedru kameru,

kas ievadīta caur anālo atveri (Rex et al., 2006). Zondes garums ir aptuveni 160-180 cm ar diametru no aptuveni 1,0 cm līdz 1,2 cm atkarībā no ražotāja un zondes izmēra (Monson & Macklin, 2022).

Vizuālie dati, ko kamera ievada ekrānā, palīdz atklāt novirzes, ļauj novērtēt biopsiju, procedūras laikā iespējams arī noņemt gļotādas bojājumus, izmantojot dažāda veida biopsijas instrumentus, izmantojot papildu kanālus, kā arī iegūt audu paraugus morfoloģiskai izmeklēšanai (Sheffield et al., 2013).

Kolonoskopija ir ieteicamā metode resnās zarnas novērtēšanai lielākajai daļai pieaugušo pacientu ar zarnu slimībām, dzelzs deficīta anēmiju, patoloģiskiem resnās zarnas radiogrāfiskiem novērojumiem, pozitīviem kolorektālā vēža skrīninga testiem, pēcpolipektomijas un pēcvēža rezekcijas uzraudzību, iekaisīgu zarnu slimību uzraudzību un pacientiem ar aizdomām par audzējiem (Rex et al., 2006).

#### 1.4. Mikrobioms

Mikrobioms ir kādā noteiktā vidē esošo mikroorganismu (baktēriju, sēņu, viensūņu un/vai vīrusu) un to gēnu kopums, piemēram, cilvēka vai dzīvnieka ķermenī un uz tā (Fukuda & Ohno, 2014).

Mikroorganismi apdzīvo daudzas cilvēka ķermeņa daļas, tostarp gastrointestinālo traktu, ādu, mutes gļotādu un konjunktīvu, tomēr lielākā daļa mikroorganismu apdzīvo resno zarnu (Kuntz & Gilbert, 2017). Augšējā GI traktā (kuņģī, tievajā zarnā) parasti nav liela mikroorganismu daudzveidība; mikroorganismu koncentrācija zarnu sekrētos ir  $10^4$  baktērijas/ml (Gorbach, 1996). Arī *Sender et al.* pētījumā noskaidrots, ka baktēriju koncentrācija kuņģī un tievās zarnas augšējā daļā (divpadsmitpirkstu zarnā un tukšajā zarnā) ir tikai  $10^3$ - $10^4$  baktērijas/ml, pateicoties salīdzinoši zemajam kuņģa pH līmenim un ātrai satura plūsmai caur kuņģi un tievo zarnu, bet resnajā zarnā ir  $10^{11}$  baktērijas/g (Sender et al., 2016).

Resnajā zarnā salīdzinoši ir lielāka mikroorganismu daudzveidība. Fēcēs parasti mikroorganismu koncentrācija ir  $10^{11}$  baktērijas/g. (Gorbach, 1996). Lai gan cilvēka organismā esošie zarnu mikroorganismu gēni lielā mērā ir kopīgi starp indivīdiem, cilvēka zarnu mikrobioms parasti sastāv no dažiem simtiem mikroorganismu sugu un var būt ļoti neviendabīgs (Thursby & Juge, 2017).

Daudzveidīgais GI trakta mikrobioms pārsvarā sastāv no trim galvenajiem baktēriju tipiem, proti, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* un *Actinobacteria* (Tap et al., 2009). Tādas anaerobo baktēriju ģintis kā *Bacteroides*, *Streptococcus* un *Clostridium* zarnu mikrobiomā ir sastopamas 1000 reižu

vairāk nekā fakultatīvi anaerobās baktērijas, piemēram, *Escherichia Coli* (Gorbach, 1996). Pamatojoties uz metagenoma datiem, cilvēka zarnu mikrobiomā var būt vairāk nekā 1000 baktēriju sugu, kas pārstāv vairāk nekā 9 miljonus gēnu (Yang et al., 2009). Šīs baktērijas var palīdzēt sagremot pārtiku un uzņemt nepieciešamo uzturu un enerģiju, ko cilvēka ķermenis citādi nevarētu uzņemt tieši, t.i., cilvēks ir ieguvis daudzus sev nepieciešamos gēnus, lai gan šie gēni nav attīstījušies cilvēka genomā (Turnbaugh et al., 2006).

Parasti tiek uzskatīts, ka mikrobioma attīstība sākas no dzimšanas, lai gan šis apgalvojums tiek apstrīdēts vairākos pētījumos, kuros mikroorganismi tika atklāti dzemdes audos, piemēram, placentā (Aagaard et al., 2014). Pēc piedzimšanas GI trakts tiek ātri kolonizēts, un dzīves gaitā dažādi notikumi, piemēram, slimības, ārstēšana ar antibiotikām un izmaiņas uzturā, izraisa izmaiņas mikrobiomā (Rodríguez et al., 2015). Agrīnās attīstības stadijās parasti ir zema mikrobioma daudzveidība, un tajā dominē divi galvenie baktēriju tipi – *Actinobacteria* un *Proteobacteria* (Bäckhed, 2011). Pirmajā dzīves gadā palielinās mikroorganismu daudzveidība un mikrobioma sastāvs, līdzvērtīgs pieauguša cilvēka mikrobiomam, kas katram indivīdam ir atšķirīgs (Palmer et al., 2007). Indivīdiem, kas vecāki par 65 gadiem, mikrobioms mainās, palielinoties *Bacteroidetes* un *Clostridium* IV klastera pārstāvjiem, atšķirībā no jaunākiem indivīdiem, kur XIVa klastera pārstāvju kopa ir izplatītāka (Claesson et al., 2011).

2007. gadā Nacionālais veselības institūts (*National Institutes of Health – NIH*) sāka īstenot Cilvēka mikrobioma projektu (Turnbaugh et al., 2007). Šī projekta darbības mērķis ir attīstīt cilvēka mikrobioloģijas nozari, lai pilnvērtīgi raksturotu cilvēka mikrobiomu, uzlabotu cilvēku veselības stāvokli un noskaidrotu, kā slimības var ietekmēt mikrobiomu, izmantojot jaunākās tehnoloģijas un resursus (Peterson et al., 2009).

Zarnu mikrobioms un metagenoms ir jomas, kuru pētījumiem šobrīd tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība. Tiek uzskatīts, ka mikrobioma izmaiņas veicina daudzu slimību attīstību (McCreight et al., 2016). Cilvēka zarnu mikrobioms ievērojami veicina ne tikai GI trakta veselības uzturēšanu, bet novirzes no tā normālās kompozīcijas, arī slimību attīstību. Jaunākie zinātniskie atklājumi apstiprina, ka zarnu mikrobioms varētu kalpot kā nākotnes diagnostikas un terapeitiskais mērķis ar iekaisumu saistītām, kā arī neoplastiskām GI trakta slimībām (Gorkiewicz & Moschen, 2017).

## 1.5. MiRNS

MikroRNS (miRNS) ir nelielas, aptuveni 22 nukleotīdus garas vienpavediena nekodējošas molekulas. MiRNS ir viena no dzīvniekiem bagātīgāko gēnu regulējošo molekulu klasēm, identificējot simtiem atšķirīgu miRNS cilvēkos un dzīvniekos (Bartel, 2018).

MiRNS ir nozīmīga loma gēnu ekspresijas regulēšanā. MiRNS gēni ir sastopami proteīnu kodējošo gēnu intronos, proteīnu nekodējošo gēnu intronos un eksonos, kā arī 3' netranslētajā reģionā (3' UTR). MiRNS biogēnēzi veido secīgu procesu virkne, lai izveidotu nobriedušas miRNS. MiRNS gēni tiek transkribēti par primārajiem prekursoriem (pri-miRNS, kas bieži ir tūkstošiem nukleotīdu garas, un veido matadatas prekursorus) ar RNS polimerāzes II vai polimerāzes III palīdzību. Pri-miRNS tiek apstrādātas kodolā, izmantojot *Drosha-DGCR8* kompleksu (cilvēkā) vai *Drosha-Pasha* (*Drosophila* un *C. elegans*), lai iegūtu aptuveni 70 nukleotīdu garas prekursoru miRNS (pre-miRNS). Pēc tam pre-miRNS no kodola tiek transportētas uz citoplazmu, izmantojot eksportīnu 5 – proteīnu, kur RNāzes III endonukleāze DICER papildus sašķeļ pre-miRNS uz aptuveni 22 nukleotīdu garām, nobriedušām, divpavedienu miRNS ar vadošo un atpaliekošo ķēdi. Tam seko viena no pavedieniem iekļaušana RISC (RNS ierosināts gēna izslēgšanas komplekss), izveidojot miRISC kompleksu. Otrs no miRNS pavedieniem, kas netiek iekļauts šajā kompleksā, tiek degradēts (He et al., 2011). 5' galā esošajai heptametriskajai sekvencei, kura visbiežāk ir atrodama 2.-7. pozīcijā, ir nozīmīga loma miRNS un mRNS mijiedarbībā, lai nodrošinātu miRNS funkcijas, tai ir jābūt pilnībā komplementārai mērķa mRNS sekvencei (Sun et al., 2009).

Līdz šim ir atklātas vairāk nekā 17 000 miRNS 142 dažādās sugās. MiRNS ir iesaistītas dažādos šūnu procesos, kā šūnu dalīšanās, šūnu attīstība, proliferācija, intracelulāro signālu nodošana un novecošanās. ir zināms, ka miRNS ir saistītas ar vairāk kā 70 dažādu slimību, piemēram, vīrusu infekciju, GI trakta ļaundabīgu audzēju, diabēta, ar imūnsistēmu saistītu slimību un neurodeģeneratīvo traucējumu attīstību (Sarshar et al., 2020).

Nesen tika parādīts, ka saimniekorganisma miRNS piedalās zarnu patogēnu invāzijā un infekciju izraisīšanā GI traktā (Aguilar et al., 2019). Turklāt arvien vairāk pētījumos tiek parādīta miRNS funkcionālā lomas mijiedarbībā starp zarnu mikroorganismiem un saimniekorganisma zarnu epitēlija šūnām (Takeda et al., 2011).

## 1.6. MiRNS un zarnu mikrobioma mijiedarbība

Zarnu mikrobiomam ir būtiska loma dažādos bioloģiskos dzīvības procesos un slimību gaitā (Nakata et al., 2017). Regulējot miRNS, zarnu mikroorganismi var vairāk iesaistīties gēnu un saimniekorganisma zarnu homeostāzes regulēšanā (Singh et al., 2011).

Fekālās miRNS galvenokārt sekretē zarnu epitēlijšūnas, bet arī Paneta un kausveida šūnas (S. Liu et al., 2016). Zarnu epitēlijšūnu sekretētās miRNS tiek izdalītas lūmenā, modulējot zarnu mikroorganismu augšanu un zarnu mikrobioma sastāvu. Zarnu mikrobiomu saimniekorganismā var ietekmēt arī ar uzturu uzņemtās miRNS, savukārt zarnu mikrobioms var regulēt zarnu miRNS ekspresiju saimniekorganismā (Bi et al., 2020).

MiRNS ir identificētas kā biomarķieri sporādiska cilvēka resnās zarnas vēža un aktīva čūlainā kolīta gadījumā – pacienta fēcēs un audos (Ahmed, 2014), un tās var izmantot arī kā mikrobioma kompozīcijas svārstību marķierus (Moloney et al., 2018). Turklāt ir konstatēts, ka zarnu mikrobioms regulē saimniekorganisma gēnu ekspresiju, tostarp miRNS, galvenokārt caur zarnu mikrobioma metabolītiem, piemēram, lipopolisaharīdiem (LPS), butirātiem un amiloīdiem (Hu et al., 2015).

*Solomon et al.* pētīja dekstrāna sulfāta nātrija (DSS) izraisītu kolītu. Pētījums tika veikts, lai paplašinātu zināšanas par zarnu epitēliju kā fēcū miRNS avotu. Zarnu epitēlija šūnu apoptoze pēc DSS ārstēšanas izraisīja izteiktu fekālo miRNS samazināšanos, tā pierādot, ka zarnu epitēlija šūnas ir galvenais fekālo miRNS avots (Solomon et al., 2010).

*Liu et al.* pētījumā kultivēja *Fusobacterium nucleatum* un *E. coli* kopā ar mākslīgi sintezētām miRNS. Tika konstatēts, ka hsa-miR-515-5p veicina *F. nucleatum* augšanu, savukārt hsa-miR-1226-5p veicina *E. coli* augšanu. Šie rezultāti pierāda miRNS tiešo ietekmi uz baktēriju sastopamību mikrobiomā. Tika arī atklāts, ka hsa-miR-515-5p, miR-876-5p, hsa-miR-325 un hsa-miR-1253 varētu potenciāli saistīties ar *F. nucleatum* nukleīnskābju sekvencēm; hsa-miR-4747-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1226-5p un hsa-miR-623 potenciāli varētu saistīties ar *E. coli* nukleīnskābju sekvencēm (S. Liu et al., 2016).

*Liu & Weiner* pētījumā tika kultivētas baktērijas kopā ar fluorescenti iezīmētām miRNS, kā rezultātā miRNS iekļuva baktērijās un lokalizējās pie baktēriju nukleīnskābēm. Tika noskaidrots, ka visas baktēriju gēnu sekvences ir komplementāras ar dažādām miRNS (S. Liu & Weiner, 2016).

Bakalaura darbā ir plānots apskatīt un noskaidrot, vai dažādās eksperimentālajās grupās ir sastopamas būtiskas miRNS atšķirības starp grupām, kā arī izpētīt saimniekorganisma miRNS un zarnu mikrobioma mijiedarbību. Būtu svarīgi izprast un aplūkot, vai pastāv sakarības starp miRNS

un mikrobiomu, lai nākotnē to varētu potenciāli pielietot kā vienu no stratēģijām mērķtiecīgā mikrobioma modificēšanā.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmantotās iekārtas un materiāli

1. tabula

Izmantotās iekārtas.

Table 1.

Equipment used in the study.

| <b>Iekārta</b>            | <b>Modelis</b>                        | <b>Ražotājs</b>          | <b>Valsts</b> |
|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Laminārbokss              | <i>Biowizard</i>                      | Kojair Tech Oy           | Somija        |
| Laminārbokss              | <i>ESCO SC2-4E1</i>                   | Esco Lifesciences        | Bangladeša    |
| Centrifūga                | <i>Centrifuge 5415R</i>               | Eppendorf                | Vācija        |
| Centrifūga                | <i>Centrifuge 5415D</i>               | Eppendorf                | Vācija        |
| Centrifūga                | <i>Centrifuge 5417R</i>               | Eppendorf                | Vācija        |
| Centrifūga                | <i>Centrifuge 5804</i>                | Eppendorf                | Vācija        |
| Centrifūga                | <i>MiniSpin Plus</i>                  | Eppendorf                | Vācija        |
| Termostats                | <i>Thermo Block TDB-120</i>           | Biosan                   | Latvija       |
| Homogenizators            | <i>FastPrep-24</i>                    | MP Biomedicals           | ASV           |
| Fluorometrs               | <i>Qubit 2.0 Invitrogen</i>           | Life Technologies        | ASV           |
| Koncentrators             | <i>Concentrator plus</i>              | Eppendorf                | Vācija        |
| PCR iekārta               | <i>Veriti 96-Well Thermal Cyclers</i> | Applied Biosystems       | ASV           |
| PCR iekārta               | <i>T100 Thermal Cyclers</i>           | BioRad                   | ASV           |
| Bioanalizators            | <i>Bioanalyzer 2100</i>               | Agilent Technologies     | ASV           |
| Vortekss                  | <i>Microspin FV-2400</i>              | Biosan                   | Latvija       |
| Magnētiskais statīvs      | <i>DynaMag™-2 Magnet</i>              | Thermo Scientific Fisher | Lielbritānija |
| Sekvenators               | <i>MiSeq</i>                          | Illumina                 | ASV           |
| Sekvenators               | <i>DNBSEQ-G400RS</i>                  | MGI, Tech Co., Ltd.      | Ķīna          |
| Saldētava                 | <i>Active Soft</i>                    | Snaige                   | Lietuva       |
| Kelvinators               | <i>ULTF 420</i>                       | Arctik                   | Dānija        |
| Ūdens attīrīšanas iekārta | <i>Mili-Q Synthesis A10</i>           | Merck Millipore          | ASV           |

2. tabula

Izmantotie laboratorijas piederumi.

Table 2.

Laboratory equipment used in the study.

| <b>Laboratorijas piederumi</b>                                | <b>Ražotājs</b> | <b>Valsts</b> |
|---|-----------------|---------------|
| <i>Eppendorf Research plus</i> automātiskā pipete, 0,5-10 µl  | Eppendorf       | Vācija        |
| <i>Eppendorf Research plus</i> automātiskā pipete, 2-20 µl    | Eppendorf       | Vācija        |
| <i>Eppendorf Research plus</i> automātiskā pipete, 20-200 µl  | Eppendorf       | Vācija        |
| <i>Eppendorf Research plus</i> automātiskā pipete 100-1000 µl | Eppendorf       | Vācija        |

3. tabula

Izmantotie vienreizlietojamie materiāli.

Table 3.

Disapposable materials used in the study.

| <b>Materiāls</b>                  | <b>Kataloga numurs</b> | <b>Ražotājs</b>             | <b>Valsts</b> |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------|
| 96 bedrīšu PCR plate              | 72.1978.202            | Sarstedt                    | Lielbritānija |
| 96 bedrīšu PCR plates<br>līmplēve | 95.1995                | Sarstedt                    | Vācija        |
| PCR stobriņi ar vāciņiem          | 72.991.002             | Sarstedt                    | Vācija        |
| Stobriņi, 5 ml                    | 60.558.001             | Sarstedt                    | Vācija        |
| Stobriņi, 1,5 ml "Safe seal"      | 72.706.200             | Sarstedt                    | Vācija        |
| Stobriņi, 1,5 ml "LoBind"         | 022431021              | Eppendorf                   | Vācija        |
| Stobriņi, 15 ml                   | 62.554.502             | Sarstedt                    | Vācija        |
| Stobriņi, 50 ml                   | 62.547.254             | Sarstedt                    | Vācija        |
| <i>Qubit</i> stobriņi             | Q32856                 | Thermo Scientific<br>Fisher | Ķīna          |
| 1000 µl uzgalis ar filtru         | 70.3050.255            | Sarstedt                    | Vācija        |
| 2-200 µl uzgalis ar filtru        | 70.760.211             | Sarstedt                    | Vācija        |
| 2-20 µl uzgalis ar filtru         | 70.760.213             | Sarstedt                    | Vācija        |
| 0,5-10 µl uzgalis ar filtru       | 70.1130.210            | Sarstedt                    | Vācija        |
| 0,5-20 µl uzgalis ar filtru       | 70.1116.210            | Sarstedt                    | Vācija        |
| 0,1-10 µl uzgalis ar filtru       | 732-1487               | ZAP Premier                 | ASV           |
| <i>RNaseZap</i> salvetes          | AM9786                 | Thermo Fisher<br>Scientific | Lietuva       |

4. tabula

Izmantotie reaģenti un izejvielas.

Table 4.

Reagents and substances used in the study.

| <b>Reaģenti/izejviela</b> | <b>Ražotājs</b>      | <b>Valsts</b> |
|---------------------------|----------------------|---------------|
| Etanols 100%              | SIA Jaunpagasts Plus | Latvija       |
| MGIEasy DNA Clean Beads   | MGI Tech Co., Ltd.   | Ķīna          |

5. tabula

Izmantotie reaģentu komplekti.

Table 5.

Reagent kits used in the study.

| <b>Nosaukums</b>   | <b>Ražotājs</b>          | <b>Kataloga numurs</b> | <b>Valsts</b> |
|--|--------------------------|------------------------|---------------|
| <i>AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit</i> reaģentu komplekts  | Qiagen                   | 80224                  | Vācija        |
| <i>FastDNA SPIN Kit for Soil</i>                               | MP Biomedical            | 116560200-116560000    | ASV           |
| <i>MGIEasy Small RNA Library Prep Kit</i> reaģentu komplekts   | MGI Tech Co., Ltd.       | 1000005269             | Ķīna          |
| <i>High Sensitivity DNA Reagents</i> reaģentu komplekts        | Agilent Technologies     | 5067-4626              | ASV           |
| <i>Small RNA</i> reaģentu komplekts                            | Agilent Technologies     | 5067-1548              | ASV           |
| <i>Qubit dsDNA HS Assay Kit, 500 Assays</i> reaģentu komplekts | Thermo Scientific Fisher | Q32854                 | ASV           |
| <i>Qubit RNA HS Assay Kit, 500 Assays</i> reaģentu komplekts   | Thermo Scientific Fisher | Q32855                 | ASV           |
| <i>Qubit ssDNA Assay Kit, 500 Assays</i> reaģentu komplekts    | Thermo Scientific Fisher | Q10212                 | ASV           |

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Pētījuma dizains

Pētījumā piedalījās 45 dalībnieki (17 vīrieši un 28 sievietes), kuriem tika veikta kolonoskopija. No tiem 17 dalībniekiem nebija ar GI trakta slimībām saistīta diagnoze, 3 dalībniekiem ir zarnu divertikuloze, 13 – hronisks gastrīts, 3 – kuņģa vai divpadsmitpirkstu zarnas čūlas (peptiskās čūlas), 7 – GERS, 5 – KRV, 1 – zarnas polipi, 2 – ČK. Dalībnieku iekļaušanai paraugkopā tika ņemti vērā sekojoši kritēriji: (1) dalībnieks ir pilngadīgs; (2) sievietēm nav iestājusies grūtniecība vai nav ar krūti barojams bērns; (3) nav sekojošu veselības problēmu: a) akūta saslimšana iesaistes brīdī; b) nieru mazspēja vai nieru darbības traucējumi; c) autoimūnas slimības; d) HIV, HBV vai HCV; e) regulāri tiek lietots alkohols; (4) pēdējo divu mēnešu laikā nav lietoti sekojoši medikamenti: antibiotikas; probiotiķi tablešu/kapsulu veidā; imūnsupresīvi medikamenti; anticitokīni; kortikosteroīdi; protonu sūkņu inhibitori; (5) nav bijušas būtiskas zarnu trakta operācijas (zarnu resekcija, bariatriskās operācijas u.c.), izņemot apendektomiju; (6) pēdējās nedēļas laikā nav bijusi caureja.

Zarnu biopsiju paraugus ievāca apmācīts medicīnas personāls plānveida kolonoskopijas laikā. No katra pacienta sterilā stobriņā, kam pievienots *RNA later*, tika ievāktas divas līdz trīs resnās zarnas biopsiju alikvotas (katra 2 mm izmērā). Fēču ievākšanai dalībniekam tika iedots sterils fēču parauga ievākšanas trauks un izskaidrota parauga ievākšanas kārtība, tika ievāktas divas fēču paraugu alikvotas no katra pacienta. Fēču ievākšanas protokola shēma ir attēlota 2. attēlā. Pēc ievākšanas paraugi tika nogādāti laboratorijā ar šim nolūkam piemērotu transportu, kas nodrošina bioloģisko drošību, audu paraugu kvalitāti. Visi paraugi ilgtermiņā tika uzglabāti  $-80^{\circ}\text{C}$ .



2. attēls. Vadlīnijas fēču paraugu ievākšanai. Pielāgots no (*Harrison County: Environmental Health: Food Poisoning*, 2015).

Figure 2. Guidelines for stool sample collection. Adapted from (*Harrison County: Environmental Health: Food Poisoning*, 2015).

### 2.2.2. Totālās RNS izdalīšana no zarnu biopsiju paraugiem

Totālās RNS izdalīšanai no pacientu zarnu biopsiju paraugiem tika izmantots *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit* reaģentu komplekts. Tas paredzēts, lai vienlaicīgi veiktu genomiskās DNS un totālās RNS (arī miRNS) izdalīšanu no visu tipu audu paraugiem, ieskaitot ar lipīdiem un šķiedrvielām bagātus audus (QIAGEN, 2020).

Protokols:

1. Pirms darba sagatavo buferus un DNāzes šķīdumu.
  - Lai sagatavotu FRN buferi, 42 ml izopropanola pievieno FRN bufera koncentrātam.
  - DNāzes I pudelītei ar šļirci pievieno 550 µl no RNāzēm brīva ūdens. Samaisa šķīdumu invertējot, alikvotē un uzglabā -30°C līdz -15°C (līdz 9 mēnešiem).
  - Atkausētas alikvotas var tikt glabātas 2-8°C līdz 6 nedēļām.
  - Lai sagatavotu RPE buferi, pievieno 44 ml 96-100% etanola RPE bufera koncentrātam.
  - AW1 bufera sagatavošanai 19 ml bufera AW1 koncentrātam pievieno 25 ml 96-100% etanola.
  - AW2 bufera sagatavošanai 13 ml bufera AW2 koncentrātam pievieno 30 ml 96-100% etanola.
2. Paraugus ievieto *Lysing Matrix D* stobriņā. Visas tālākas darbības veic uz ledus.
3. Sagatavo maisījumu homogenizēšanai: katram 1 ml RLT Plus bufera pievienojot 10 µl β-merkaptotetanolu.
4. Pievieno 600 µl RLT Plus bufera un β-merkaptotetanolu maisījumu zarnu biopsijām.
5. Homogenizē stobriņus 30 sekundes pie ātruma 5 m/s, izmantojot Fast Prep iekārtu. Šo procesu atkārto 2 reizes.
6. Paraugus īsi centrifugē līdz pazūd putas.
7. Pārnes homogenizēto lizātu uz *AllPrep DNA Mini spin* kolonnu, kura ievietota 2 ml stobriņā.
8. Paraugus centrifugē 30 sekundes pie maksimālajiem apgriezieniem (20'000 x g). Pārlicinās, ka uz kolonnas membrānas nav šķidrums. Ja nepieciešams, atkārto centrifugēšanu.
9. Ievieto *AllPrep DNA Mini spin column* jaunā 2 ml stobriņā. Atstāj uz vēlāku laiku.

10. Pievieno 80 µl proteīnkināzi K filtrātam, kas izveidojies pēc 7. soļa un samaisa pipetējot.
11. Pievieno 350 µl 96-100% etanola, samaisa pipetējot.
12. 10 minūtes inkubē istabas temperatūrā.
13. Pievieno 750 µl 96-100% etanola, samaisa pipetējot.
14. Pārnes līdz 700 µl parauga uz *RNeasy Mini spin column*, kas ievietota 2 ml stobriņā. Centrifugē 15 sekundes maksimālajos apgriezienos. Atbrīvojas no filtrāta. Turpina līdz viss paraugs izlaists caur kolonnu.
15. Pievieno 500 µl RPE bufera *RNeasy Mini spin kolonnai*. Centrifugē 15 sekundes maksimālajos apgriezienos. Atbrīvojas no filtrāta.
16. Izveido maisījumu, kur pievieno 10 µl *DNase I* pie 70 µl RDD bufera katram paraugam.
17. Pievieno 80 µl maisījuma tieši uz *RNeasy mini spin* kolonnas membrānas un 20-30°C inkubē 15 minūtes.
18. Pievieno 500 µl FRN bufera. Centrifugē 15 sekundes maksimālajos apgriezienos. Filtrāts jā saglabā, jo tas satur miRNS.
19. Kolonnu ievieto jaunā 2 ml stobriņā. Filtrātu laiž cauri kolonnai un centrifugē 15 sekundes maksimālajos apgriezienos. Atbrīvojas no filtrāta.
20. Pievieno 500 µl RPE bufera *RNeasy Mini spin* kolonnai. Centrifugē 15 sekundes maksimālajos apgriezienos. Atbrīvojas no filtrāta.
21. Kolonnai pievieno 500 µl 96-100% etanola. Centrifugē 2 minūtes maksimālajos apgriezienos, lai izskalotu kolonnas membrānu. Izņem no centrifūgas tā, lai kolonna nesaskaras ar filtrātu.
22. Ievieto kolonnu jaunā 1.5 ml stobriņā. Pievieno 30-50 µl no RNāzēm brīva ūdens uz kolonnas membrānas. Centrifugē pie >8000 g 1 minūti.
23. Atkārtoti izskalo kolonnu ar 30-50 µl no RNāzēm brīva ūdens.
24. Izdalīto RNS glabā -20°C ilgstošai uzglabāšanai vai 4°C, ja lietošana paredzēta tuvākajā laikā.

### 2.2.3. RNS koncentrācijas noteikšana

Lai noteiktu RNS koncentrāciju, tika izmantota *Invitrogen Qubit* iekārta un *Invitrogen Qubit RNA HS Assay* reaģentu komplekts. *Invitrogen Qubit* fluorometrs tiek izmantots DNS, RNS, miRNS un proteīnu kvantitatīvajai noteikšanai. Metodes pamatā ir selektīvo krāsvielu izmantošana, kas emitē fluorescenci, piesaistoties pie kādas no iepriekš minētajām molekulām. Ar

*Invitrogen Qubit* fluorometru var veikt mērījumus paraugiem, kuru sākotnējā koncentrācija ir no 50 ng/mL līdz 100 µg/mL, kā arī izmantojot tikai nelielu tilpumu parauga. *Invitrogen Qubit* neidentificē sāļus, brīvos nukleotīdus, šķīdinātājus un citus iespējamus kontaminantus, tāpēc fluorescences mērījumi tiek uzskatīti par ļoti precīziem (Thermo Fisher Scientific, 2019).

Protokols:

1. Pagatavo reakcijas maisījumu, kuram pievieno buferi 199 x n µl un fluorescento krāsu 1x n µl, kur n ir stobriņu skaits, paraugu skaitam tiek pieskaitīti divi standartu stobriņi. Nepieciešama 10% reaģentu rezerve. Maisījumu apmaisa, to dažas reizes invertējot.
2. *Qubit* stobriņu (*Qubit Assay tube*) marķē uz vāciņa, stobriņa sānus nedrīkst marķēt, jo caur stobriņa sāniem tiks raidīts gaismas stars. Katrā no marķētajiem *Qubit* stobriņiem, kuros tiks pievienots paraugs, iepilina 198 µl reakcijas maisījuma, bet stobriņos, kuros tiks pievienots pirmais un otrais standarts, iepilina 190 µl reakcijas maisījuma.
3. Katrā paraugu stobriņā iepilina 2 µl RNS parauga. Katrā standartu stobriņā pievieno 10 µl standarta.
4. Katru stobriņu vorteksē 2-3 sekundes un īsi centrifugē.
5. *Qubit* fluorometrā izvēlas režīmu *RNA High Sensitivity*.
6. Ievieto 1. standartu un nolasa vērtību, uzspiežot “*Read*”.
7. Ievieto 2. standartu un nolasa vērtību, uzspiežot “*Read*”.
8. Pa vienam ievieto katru paraugu un nolasa koncentrāciju, izvēloties mērvienību ng/µl, uzspiežot “*Read*”.

#### 2.2.4. RNS kvalitātes pārbaude

RNS kvalitātes pārbaudei tika izmantots *Agilent 2100* bioanalizators un *Agilent Small RNA* reaģentu komplekts, ar kuru iespējams analizēt RNS fragmentus. *Agilent Small RNA* čips sastāv no savstarpēji savienotiem mikrokanāliem, kuros tiek atdalīti nukleīnskābju fragmenti pēc to izmēriem (Technologies, 2019).

1. Pirms darba uzsākšanas ar *Agilent Small RNA* reaģentu komplektu, to novieto istabas temperatūrā vismaz 30 minūtes tā, lai tam nepieklūtu gaisma.

2. Sagatavo gela un krāsvielās maisījumu, pievienojot 2  $\mu$ l *Agilent Small RNA* krāsu 40  $\mu$ l matriksa gelam no RNāzēm brīvā stobriņā (*RNase-free microtube*).
3. Reakcijas maisījumu vairākas reizes pipetē, lai izveidotos homogēns maisījums.
4. Centrifugē 10 minūtes pie 13000 g istabas temperatūrā.
5. Sagatavo čipa uzpildes staciju. Čipa pamatni nostāda C pozīcijā. Čipa uzpildes stacijā ievieto *Agilent Small RNA* čipu.
6. Bedrītē, kas apzīmēta ar G, iepilina 9  $\mu$ l pagatavotā gela.
7. Pārlicinās, ka šļirce ir noregulēta uz 1 mL, aiztaisa darba staciju.
8. Piespiež šļirces galu līdz šļirce ir nofiksēta darba stacijā.
9. Gaida tieši 60 sekundes, tad atlaiž slēdzi, kas šļirci tur darba stacijā.
10. Gaida 5 sekundes, tad lēnām atvelk šļirces galu līdz 1 mL atzīmei.
11. Atver darba staciju un pārējās G bedrītēs iepilina 9  $\mu$ l gela.
12. Iepilina 5  $\mu$ l marķiera visās tukšajās bedrītēs.
13. Iepilina 1  $\mu$ l ladder bedrītē, kas apzīmēta ar kāpņu simbolu.
14. Katrā no 11 paraugu bedrītēm iepilina 1  $\mu$ l parauga vai, ja paraugu skaits ir mazāks nekā 11, tad iepilina 1  $\mu$ l ladder.
15. Novieto čipu horizontāli un vorteksē 1 minūti pie 2400 rpm.
16. Čipu ievieto *Agilent 2100 Bioanalyzer* iekārtā un 5 minūšu laikā sāk analīzi.
17. Pēc analīzes, čipu izņem no *Agilent* aparāta, ievieto čipu ar ūdeni uz pāris minūtēm, izņem čipu un pagaida, kamēr elektrodi ir nožuvuši.

### 2.2.5. RNS koncentrēšana

Pēc paraugu RNS koncentrācijas noteikšanas ar *Qubit* fluorometru, dažiem paraugiem tika konstatēta pārāk maza RNS koncentrācija turpmākajām darbībām. Lai to palielinātu, tika izmantota RNS koncentrēšana vakuumā, kas paātrina šķidrums iztvaikošanu.

Protokols:

1. Paraugus īsi centrifugē.
2. Atvērtus stobriņus ar paraugiem ievieto *Eppendorf Concentrator Plus* iekārtā tā, lai tie būtu līdzsvarā.
3. Uzstāda V-AQ režīmu, kas ir +30°C temperatūras režīms šķidrā agregātstāvoklī esošiem paraugiem.

4. Veic centrifugēšanu 15-30 minūtes līdz parauga tilpums ir samazinājies līdz vēlamajam tilpumam. Ja RNS koncentrācija vēl joprojām ir pārāk maza, palielina centrifugēšanas laiku.

### 2.2.6. RNS atšķaidīšana

Pēc RNS koncentrācijas noteikšanas ar *Qubit* fluorometru, paraugi tika atšķaidīti atsevišķos stobriņos ar no Rnāzēm brīvu ūdeni līdz koncentrācijai 5 ng/μl tā, lai tos varētu izmantot bibliotēku sagatavošanai.

### 2.2.7. MiRNS bibliotēku sagatavošana ar QIAseq miRNA Library Kit reaģentu komplektu

#### a) 3' adapteru ligēšana

1. Uz ledus atkausē RNS paraugus, kuri pirms tam sagatavoti tā, lai 5 μl būtu 100 ng totālās RNS.
2. Istabas temperatūrā atkausē *QIAseq miRNA NGS* 3' adapteri, *QIAseq miRNA NGS* 3' buferi, 2x *miRNA* ligēšanas aktivatoru un no nukleāzēm brīvu ūdeni. Samaisa šķīdumus invertējot. Īsi centrifugē visus reaģentus. *QIAseq miRNA NGS RI* un *QIAseq miRNA NGS* 3' RNS ligāzi izņem no saldētavas un novieto uz ledus tieši pirms to izmantošanas.
3. Uz ledus sagatavo 3' ligēšanas reakcijas maisījumu, kas vienam paraugam sastāv no:
  - 1 μl *QIAseq miRNA NGS* 3' adaptera
  - 1 μl *QIAseq miRNA NGS RI*
  - 1 μl *QIAseq miRNA NGS* 3' ligāzes
  - 2 μl *QIAseq miRNA NGS* 3' bufera
  - 10 μl 2x *miRNA* ligēšanas aktivatoraReakcijas maisījumam pielieto 10% rezervi.
4. RNS paraugiem pievieno 15 μl izveidotā reakcijas maisījuma un pipetē 15-20 reizes, īsi centrifugē.
5. Inkubē 1 stundu +28°C. Inkubē 20 minūtes +65°C. Notur reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.

## b) 5' adapteru ligēšana

1. Istabas temperatūrā atkausē *QIAseq miRNA NGS 5'* adapterus, *QIAseq miRNA NGS 5'* buferi. Samaisa šķīdumus invertējot. Īsi centrifugē visus reaģentus. *QIAseq miRNA NGS RI* un *QIAseq miRNA NGS 5'* RNS ligāzi izņem no saldētavas un novieto uz ledus tieši pirms to izmantošanas.
2. Uz ledus sagatavo 5' ligēšanas reakcijas maisījumu, kas vienam paraugam sastāv no:
  - 1 µl *QIAseq miRNA NGS 5'* adaptera
  - 1 µl *QIAseq miRNA NGS RI*
  - 1 µl *QIAseq miRNA NGS 5'* ligāzes
  - 2 µl *QIAseq miRNA NGS 5'* bufera
  - 15 µl no nukleāzēm brīva ūdens

Reakcijas maisījumam pielieto 10% rezervi.

3. 3' ligēšanas galaproduktiem pievieno 20 µl izveidotā reakcijas maisījuma un pipetē 10-15 reizes, īsi centrifugē.
4. Inkubē 30 minūtes +28°C. Inkubē 20 minūtes +65°C. Notur reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.

## c) Reversā transkripcija

1. Istabas temperatūrā atkausē *QIAseq miRNA NGS RT* iniciatoru, *QIAseq miRNA NGS RT* buferi un *QIAseq miRNA NGS RT* praimeru. Samaisa šķīdumus invertējot. Īsi centrifugē visus reaģentus. *QIAseq miRNA NGS RI* un *QIAseq miRNA NGS RT* enzīmu izņem no saldētavas un novieto uz ledus tieši pirms to izmantošanas.
2. 5' ligēšanas galaproduktiem pievieno 2 µl *QIAseq miRNA NGS RT* iniciatora. Pipetē 15 reizes un īsi centrifugē. Inkubē paraugus sekojoši:
  - 2 minūtes +75°C
  - 2 minūtes +70°C
  - 2 minūtes +65°C
  - 2 minūtes +60°C
  - 2 minūtes +55°C
  - 5 minūtes +37°C
  - 5 minūtes +25°C
  - ∞ +4°C

3. Uz ledus sagatavo reversās transkripcijas reakcijas maisījumu, kas vienam paraugam sastāv no:
  - 2 µl QIAseq miRNA NGS RT praimera
  - 1 µl QIAseq miRNA NGS RI
  - 1 µl QIAseq miRNA NGS RT enzīma
  - 12 µl QIAseq miRNA NGS RT bufera
  - 2 µl no nukleāzēm brīva ūdens Reakcijas maisījumam pielieto 10% rezervi.
4. 5' ligēšanas un *QIAseq miRNA NGS RT* iniciatora pievienošanas galaproduktiem pievieno 18 µl izveidotā reakcijas maisījuma un pipetē 12 reizes, īsi centrifugē.
5. Inkubē 1 stundu +50°C. Inkubē 15 minūtes +70°C. Notur reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.

#### d) Magnētisko lodīšu sagatavošana

1. Kārtīgi savorteksē *QIAseq* magnētiskās lodītes un *QIAseq miRNA NGS* magnētisko lodīšu piesaistīšanās buferi, lai šķīdums būtu homogēns.
2. Pievieno 400 µl *QIAseq* magnētiskās lodītes 2 ml stobriņā (*microcentrifuge tube*). Šis tilpums nepieciešams vienam paraugam. Īsi centrifugē un uzreiz stobriņus novieto uz magnētiskā statīva.
3. Kad lodītes ir nostājušās pie magnēta sienīgas, uzmanīgi noņem un izlej supernatantu.
4. Stobriņus noņem no magnētiskā statīva un pievieno 150 µl *QIAseq miRNA NGS* magnētisko lodīšu piesaistīšanās buferi. Vorteksē līdz izveidojas homogēns šķīdums. Īsi centrifugē un novieto stobriņus uz magnētiskā statīva.
5. Kad lodītes ir nostājušās pie magnēta sienīgas, uzmanīgi noņem un izlej supernatantu.
6. Stobriņus noņem no magnētiskā statīva un pievieno 400 µl *QIAseq miRNA NGS* magnētisko lodīšu piesaistīšanās bufera. Vorteksē līdz izveidojas homogēns šķīdums.
7. *QMN* lodītes ir gatavas un, ja tās netiek izmantotas uzreiz, tad glabā no +2 līdz +8°C līdz vienai nedēļai.

#### e) cDNA attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm

1. Pārlicinās, ka *QMN* lodītes ir kārtīgi savorteksētas. Īsi centrifugē stobriņus, kuros bija galaprodukts no reversās transkripcijas reakcijas.
2. Pievieno 143 µl *QMN* lodītes. Vorteksē 3 sekundes un īsi centrifugē.
3. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.

4. Stobriņus novieto uz magnētiskā statīva aptuveni 4 minūtes līdz lodītes ir pilnībā nostājušās pie stobriņa sieniņas.
5. Supernatantu izlej, neaizskarot lodītes.
6. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, pievieno 200 µl 80% etanola. Uzreiz noņem un izlej pievienoto etanolu.
7. Atkārti skalošanu, pievienojot 200 µl 80% etanola. Uzreiz noņem un izlej pievienoto etanolu.
8. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, atver stobriņa vāciņus un žāvē lodītes 10 minūtes vai līdz tiek novērots, ka lodītēm ir matēta virsma.
9. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, eluē DNS, stobriņiem pievienojot 17 µl no nukleāzēm brīvā ūdens. Stobriņus noņem no magnētiskā statīva.
10. Kārtīgi samaisa šķīdumu pipetējot līdz tas ir pilnībā resuspendēts. Īsi centrifugē un inkubē istabas temperatūrā 2 minūtes. Novieto stobriņus uz magnētiskā statīva apmēram 2 minūtes līdz lodītes ir nostājušās pie stobriņa sieniņas.
11. Pārnes 15 µl eluētās DNS jaunus stobriņus.
12. Tālāk veic nākamo reakciju vai arī cDNA attīrītie galaprodukti var glabāties saldētavā no -30 līdz -15°C.

#### f) PCR amplifikācija

1. Istabas temperatūrā atkausē *QIAseq miRNA NGS* bibliotēku sagatavošanas buferi, *QIAseq miRNA NGS ILM* bibliotēku tiešais praimeris un nepieciešamos *QIAseq miRNA NGS ILM* indeksu praimerus, kas katram paraugam ir atšķirīgi. Samaisa šķīdumus invertējot. Īsi centrifugē visus reaģentus. *HotStarTaq* DNS polimerāzi izņem no saldētavas un novieto uz ledus tieši pirms to izmantošanas.
2. Uz ledus sagatavo bibliotēku amplificēšanas reakcijas maisījumu, kas vienam paraugam sastāv no:
  - 16 µl *QIAseq miRNA NGS Library* bufera
  - 3 µl *HotStarTaq* DNS polimerāzes
  - 2 µl *QIAseq miRNA NGS ILM* bibliotēku tiešā praimera
  - 42 µl no nukleāzēm brīva ūdensReakcijas maisījumam pielieto 10% rezervi.

3. Attīrīšanas galaproduktiem pievieno 63  $\mu\text{l}$  izveidotā reakcijas maisījuma un pipetē 12 reizes. Katram paraugam pievieno 2  $\mu\text{l}$  atšķirīgus indeksu praimerus. Īsi centrifugē.
4. Uzstāda PCR programmu (+95°C 15 min, 16x (+95°C 15 sek, +60°C 30 sek, +72°C 15 sek), +72°C 2 min, +4°C  $\infty$ ). Reakcijas tilpums 80  $\mu\text{l}$ . Notur reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.

**g) Amplificēto bibliotēku attīrīšana**

1. Savorteksē un īsi centrifugē *QMN* magnētiskās lodītes. Pievieno 75  $\mu\text{l}$  lodītes tīros stobriņos.
2. Īsi centrifugē stobriņus, kuros ir amplificētās bibliotēkas, un pārnes 75  $\mu\text{l}$  uz stobriņiem, kuri satur magnētiskās lodītes. Vorteksē 3 sekundes un īsi centrifugē.
3. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
4. Stobriņus novieto uz magnētiskā statīva uz 4 minūtēm līdz lodītes ir nostājušās pie stobriņa sienīgas.
5. 145  $\mu\text{l}$  supernatanta pārnes uz jauniem stobriņiem. Stobriņus ar lodītēm izmet.
6. Supernatantam pievieno 130  $\mu\text{l}$  *QMN* magnētiskās lodītes. Vorteksē 3 sekundes un īsi centrifugē.
7. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
8. Stobriņus novieto uz magnētiskā statīva līdz lodītes ir nostājušās pie stobriņa sienīgas.
9. Noņem un izlej supernatantu, neaizskarot lodītes. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, pievieno 200  $\mu\text{l}$  80% etanola. Uzreiz noņem un izlej pievienoto etanolu.
10. Atkārti skalošanu, pievienojot 200  $\mu\text{l}$  80% etanola. Uzreiz noņem un izlej pievienoto etanolu.
11. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, atver stobriņa vāciņus un žāvē lodītes 10 minūtes vai līdz tiek novērots, ka lodītēm ir matēta virsma.
12. Stobriņiem esot uz magnētiskā statīva, eluē DNS, stobriņiem pievienojot 17  $\mu\text{l}$  no nukleāzēm brīvā ūdens. Stobriņus noņem no magnētiskā statīva.
13. Kārtīgi samaisa šķīdumu pipetējot līdz tas ir pilnībā resuspendēts. Īsi centrifugē un inkubē istabas temperatūrā 2 minūtes. Novieto stobriņus uz magnētiskā statīva apmēram 2 minūtes līdz lodītes ir nostājušās pie stobriņa sienīgas.
14. Pārnes 15  $\mu\text{l}$  eluētās DNS jaunajos stobriņos.
15. Bibliotēkas ir gatavas un tālāk var veikt to kvalitātes kontroli vai arī tās var glabāties saldētavā no -30 līdz -15°C.

#### **h) Bibliotēku vidējā garuma noteikšana**

1. Pirms uzsāk darbu ar *Agilent High-Sensitivity DNA* reaģentu komplektu, to novieto istabas temperatūrā vismaz 30 minūtes tā, lai reaģentu komplektam nepieklūtu gaisma.
2. Vispirms sagatavo gela un krāsvielas maisījumu, pievienojot 15 µl *Agilent High – Sensitivity DNA* krāsu matricas gelam.
3. Vorteksē un īsi centrifugē stobriņu. Stobriņa saturu pārnes uz filtrēšanas kolonnu (“*Spin filter*”).
4. Centrifugē 15 minūtes pie 2240 g ± 20 %. Pēc centrifugēšanas pasargā gelu no gaismas.
5. Sagatavo čipa uzpildes staciju. Čipa pamatni nostāda C pozīcijā. Čipa uzpildes stacijā ievieto *Agilent High-Sensitivity DNA* čipu.
6. Bedrītē, kas apzīmēta ar G, iepilina 9 µl pagatavotā gela.
7. Pārliedzinās, ka šļirce ir noregulēta uz 1 mL un tad aiztaisa darba staciju.
8. Piespiež šļirces galu līdz šļirce ir nofiksēta darba stacijā.
9. Gaida tieši 60 s un tad atlaiž slēdzi, kas šļirci tur darba stacijā.
10. Pagaida 5 s, tad lēnām atvelk šļirces galu līdz 1 mL atzīmei.
11. Atver darba staciju un pārējās G bedrītēs iepilina 9 µl gela.
12. Iepilina 5 µl marķiera visās tukšajās bedrītēs.
13. Iepilina 1 µl *High Sensitivity DNA ladder* bedrītē, kas atzīmēta ar kāpņu simbolu.
14. Katrā no 11 parauga bedrītēm iepilina 1 µl parauga vai, ja paraugu skaits ir mazāks par 11, tad 1 µl *ladder*.
15. Novieto čipu horizontāli un vorteksē vienu minūti pie 2400 rpm.
16. Čipu ievieto *Agilent 2100 Bioanalyzer* iekārtā un piecu minūšu laikā uzsāk *High Sensitivity DNA Assay 1.03* analīzi.
17. Atver bioanalizatora *Agilent 2100* vāku, *High Sensitivity DNA* čipu ievieto tam paredzētajā vietā un aizver vāku.
18. Atver *2100 Expert* programmu, norāda analīzes metodi, sadaļā *Assays* norādot *dsDNA/High Sensitivity DNA*. Aizpilda *Sample name* tabulu, norādot paraugu nosaukumus, kas atrodas atbilstošajās bedrītēs. Uzsāk analīzi.
19. Pēc analīzes, čipu izņem no *Agilent* aparāta, ievieto čipu ar ūdeni uz pāris minūtēm, izņem čipu un pagaida, kamēr elektrodi ir nožuvuši.

### i) Bibliotēku DNS koncentrācijas noteikšana

Bibliotēku DNS koncentrāciju nosaka ar *Qubit* iekārtu un *DNA High Sensitivity* reaģentu komplektu.

Protokols:

1. Pagatavo reakcijas maisījumu, kur pievieno buferi 199 x n µl un fluorescento krāsu 1 x n µl, kur n ir stobriņu skaits (paraugu skaitam jāpieskaita divi standartu stobriņi).
2. Nepieciešama 10% reaģentu rezerve. Maisījumu apmaisa, to pāris reizes invertējot.
3. Katrā no nomarkētajiem *Qubit* stobriņiem (nedrīkst aprakstīt stobriņa sānus, jo caur stobriņu tiks raidīts gaismas stars), kuros būs paraugs, iepilina 198 µl reakcijas maisījuma, bet tajos stobriņos, kuros būs pirmais un otrais standarts – 190 µl reakcijas maisījuma.
4. Katrā no parauga stobriņiem iepilina 2 µl DNS parauga. Katrā no standarta stobriņiem iepilina 10 µl standarta.
5. Katru stobriņu vorteksē 2-3 sekundes un īsi centrifugē tā, lai uz stobriņa sāniem nepaliktu pilieni.
6. *Qubit* fluorometrā izvēlējas režīmu *DNA High Sensitivity*. Lai nokalibrētu *Qubit* fluorometru, tajā ievieto 1. standartu, pēc tam 2. standartu. Izvēlas opciju *Calculate stock concentration*, kur atzīmē, ka izmantotais parauga tilpums ir 2 µl.
7. Pa vienam paraugam ievieto *Qubit* fluorometrā un nolasa koncentrāciju ng/µl.

### 2.2.8. Bakteriālās DNS izdalīšana no fēču paraugiem ar *FastDNA SPIN Kit for Soil*

Protokols:

1. 200 mg parauga ievieto *Lysing Matrix E* stobriņā.
2. Pievieno 987 µl nātrija fosfāta bufera un 122 µl MT bufera.
3. Homogenizē stobriņus 40 sekundes pie ātruma 6 m/s, izmantojot *Fast Prep* iekārtu.
4. Centrifugē stobriņu 10 min pie 14 000 x g.
5. Supernatantu pārnes uz tīru 2 ml stobriņu. Tam pievieno 250 µl PPS (*Protein Precipitation Solution*) šķīduma un samaisa, 10 reizes invertējot stobriņu.
7. Centrifugē stobriņu 5 min pie 14 000 x g. Iegūto supernatantu pārnes uz tīru 15 ml
8. stobriņu.

9. Rūpīgi samaisa saistīšanas matricu šķīdumu un 1 ml no tā pievieno paraugam, kas atrodas 15 ml stobriņā.
10. Paraugu 2 minūtes maisa invertējot, tādējādi nodrošinot DNS piesaistīšanu matricai. Pēc tam stobriņu novieto statīvā, lai 3 minūtes ļautu matricai nosēsties.
11. Neaizskarot saistīšanas matricu, no stobriņa aizvāc 500 µl supernatanta.
12. Atlikušo supernatantu resuspendē kopā ar saistīšanas matricu. Aptuveni 600 µl no
13. maisījuma pārnes uz stobriņu ar *SPIN<sup>TM</sup>* filtru un centrifugē 1 min pie 14 000 x g. Filtrātu izlej un *SPIN<sup>TM</sup>* filtram pievieno atlikušo maisījumu no 15 ml stobriņa, atkārtoti centrifugēšanu.
14. Paraugam pievieno 500 µl SEWS-M (sajaukts ar etanolu attiecībā 1,2:1) un pipetējot samaisa virs filtra esošo saistīšanas matricu.
15. Centrifugē stobriņu 1 min pie 14 000 x g, filtrātu izlej.
16. Centrifugē stobriņu atkārtoti 2 min pie 14 000 x g, lai izžāvētu matricu un atbrīvotos no skalošanas šķīduma paliekām. Filtrēšanas kolonu ievieto tīrā stobriņā.
17. *SPIN<sup>TM</sup>* filtru žāvē 5 min istabas temperatūrā.
18. Uzmanīgi resuspendē virs filtra esošo saistīšanas matricu, pievienojot 100 µl DES (*Dnase/Pyrogen-Free Water*) šķīduma. Paraugu inkubē 5 min 55 °C, lai palielinātu iegūtās DNS daudzumu.
19. Centrifugē stobriņu 1 min pie 14 000 x g. Aizvāc *SPIN* filtru. Iegūto filtrātu, kas satur mikrobiālo DNS, uzglabā pie -20 °C.

### **2.2.9. Metagenoma bibliotēku sagatavošana ar *MGIEasy DNA Library Prep Set* reaģentu komplektu**

#### **a) DNS fragmentēšana**

Protokols:

1. No DNS parauga 0,2 ml stobriņā pārnes 300 ng DNS un pievieno ūdeni, lai kopējais tilpums būtu 55 µl.
2. Iegūtos 55 µl atšķaidītā parauga pārnes uz Covaris stobriņu, pipetes uzgali izdurot
3. caur stobriņa korķim.
4. Uzpilda *Covaris S220* ūdens tvertni ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei 12,5 (FILL).

5. Ieslēdz *Covaris S220*, pēc tam dzesētāju un datoru.
6. Datorā atver datorprogrammu *SonoLab7* un uzstāda programmu *MGI Seq 400bp 50µl PE150*, kurai ir iestatīti šādi parametri:
  - Peak Power – 75;
  - DutyFactor – 10%;
  - Cycles per burst – 1000;
  - Time – 55.
7. Nogaida, kamēr ūdens tiek atdzesēts līdz nepieciešamajām vērtībām.
8. *Covaris* stobriņu nostiprina tam paredzētajā statīvā tā, lai *Covaris* stobriņa stikla daļa un viss paraugs ir ūdenī, bet *Covaris* stobriņa vāciņš tieši virs ūdens.
9. Pēc rezultātu iegūšanas vispirms izslēdz datoru, pēc tam *Covaris S220* un dzesētāju.

#### **b) 420 bp garu fragmentu atlase**

Protokols:

1. *MGIEasy DNA Clean Beads* magnētiskās lodītes pirms lietošanas izņem no ledusskapja un 30 minūtes atstāj sasilt istabas temperatūrā. Pirms lietošanas kārtīgi samaisa un īsi centrifugē.
2. Visu fragmentēšanas produktu no *Covaris* stobriņa pārnes uz jaunu 1,5 ml stobriņu un pievieno 45 µl TE buferi līdz kopējam tilpumam 100 µl.
3. Pievieno 60 µl DNS attīrīšanas magnētiskās lodītes. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
4. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
5. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2–5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
6. Uzmanīgi, nenoņemot stobriņu no magnētiskā statīva, pārnes 160 µl supernatanta uz jaunu 1,5 ml stobriņu. Lodītes izmet.
7. Stobriņam ar supernatantu pievieno 20 µl magnētiskās lodītes. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
8. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
9. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2–5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
10. Uzmanīgi, nenoņemot stobriņu no magnētiskā statīva, aizvāc supernatantu.

11. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva un lodītēm pievieno 200 µl svaigi pagatavotu 80% etanolu.
12. Pēc 30 sekundēm aizvāc etanolu.
13. Atkārti 11.–12. soli. Pēc tam uzmanīgi aizvāc 80% etanolu, kas ir stobriņā, nepaņemot lodītes.
14. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva ar atvērtu vāciņu un žāvē lodītes līdz to sablīvējums no spīdīga kļūst par matētu, bet pirms tās sāk plaisāt.
15. Noņem stobriņu no magnētiskā statīva un pievieno 32 µl TE buferi, lai eluētu DNS. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
16. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
17. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2–5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
18. Pārnes 30 µl supernatantu uz jaunu 1,5 ml stobriņu un veic kvantitatīvo analīzi, izmantojot *Qubit dsDNA HS Assay Kit* reaģentu komplektu, pēc norādītā protokola apraksta apakšnodaļā 2.2.3. RNS kvalitātes pārbaude.

### c) dsDNS galu labošana un A-gala pievienošana

Protokols:

1. No iepriekš iegūtā fragmentētā DNS parauga uz 0,2 ml stobriņu pārnes 50 ng DNS un pievieno TE buferi, lai kopējais tilpums būtu 40 µl. Stobriņu tur uz ledus.
2. Sagatavo reakcijas maisījumu, uz 1 paraugu apvienojot 7,1 µl ERAT buferi un 2,9 µl ERAT enzīmu maisījumu. Gala tilpums maisījumam uz katru paraugu 10 µl.
3. Pievieno 10 µl 2. solī pagatavotā reakcijas maisījuma 1. solī sagatavotajam paraugam un pipetējot samaisa.
4. Inkubē 30 min +37°C. Inkubē 15 minūtes +65°C. Noturēt reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.

### d) Adapteru ligēšana

1. MGIEasy DNA Adapter adapteri divkārtīgi atšķaida: 0,2 ml stobriņā pārnes 5 µl adaptera šķīduma un 5 µl no nukleāzēm brīvu ūdeni.
2. 0,2 ml stobriņam ar paraugu pievieno 5 µl atšķaidīto adaptera šķīdumu. Samaisa un īsi centrifugē. Stobriņu tur uz ledus.

3. Sagatavo reakcijas maisījumu. lēni pipetējot, jo reaģenti ir viskozi. Uz 1 paraugu apvieno 23,4  $\mu$ l ligēšanas buferi un 1,6  $\mu$ l DNS ligāzi. Gala tilpums maisījumam uz katru paraugu 25  $\mu$ l.
4. 0,2 ml stobriņā pievieno 25  $\mu$ l reakcijas maisījuma. Pipetējot samaisa un īsi centrifugē.
5. Inkubē 30 min +23°C. Noturēt reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.
6. Īsi centrifugē, pievieno 20  $\mu$ l TE buferi un visu paraugu pārnes uz jaunu 1,5 mL stobriņu. Šajā solī sagatavoto DNS paraugu var uzglabāt -20°C līdz 16 stundām.

#### e) Ar adapteriem ligētā DNS attīrīšana

Protokols:

1. *MGIEasy DNA Clean Beads* magnētiskās lodītes pirms lietošanas izņem no ledusskapja un 30 minūtes atstāj sasilt istabas temperatūrā. Pirms lietošanas kārtīgi samaisa un īsi centrifugē.
2. Paraugam pievieno 50  $\mu$ l magnētiskās lodītes. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
3. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
4. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2-5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
5. Uzmanīgi, nenoņemot stobriņu no magnētiskā statīva, aizvāc supernatantu.
6. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva un lodītēm pievieno 200  $\mu$ l svaigi pagatavotu 80% etanolu.
7. Pēc 30 sekundēm aizvāc etanolu.
8. Atkārto 6.-7. soli. Pēc tam uzmanīgi aizvāc visu etanolu, nenoņemot lodītes.
9. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva ar atvērtu vāciņu un žāvē lodītes līdz to sablīvējums no spīdīga kļūst par matētu, bet pirms tās sāk plaisāt.
10. Noņem stobriņu no magnētiskā statīva un pievieno 21  $\mu$ l TE buferi, lai eluētu DNS. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
11. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
12. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2—5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
13. Pārnes 19  $\mu$ l supernatantu uz jaunu 0,2 ml stobriņu.

## f) PCR amplifikācija

Protokols:

1. Sagatavo PCR reakcijas maisījumu uz 1 paraugu apvienojot 25 µl PCR enzīmu maisījumu un 6 µl PCR praimeru maisījumu. Gala tilpums maisījumam uz katru paraugu 31 µl.
2. Pievieno 31 µl reakcijas maisījuma e) apakšnodaļas 13. solī sagatavotajam stobriņam ar paraugu. Samaisa un īsi centrifugē.
3. Uzstāda PCR programmu (+95°C 3 min, 10x (+98°C 20 sek, +60°C 15 sek, +72°C 30 sek), +72°C 10 min, +4°C ∞. Reakcijas tilpums 50 µl. Noturēt reakciju vismaz 5 minūtes +4°C.
4. Īsi centrifugē, PCR produktu pārnes uz jaunu 1,5 ml stobriņu.

## g) PCR produkta attīrīšana

Protokols:

1. *MGIEasy DNA Clean Beads* magnētiskās lodītes pirms lietošanas izņem no ledusskapja un 30 minūtes atstāj sasilt istabas temperatūrā. Pirms lietošanas kārtīgi samaisa un īsi centrifugē.
2. PCR produktam pievieno 50 µl DNS attīrīšanas magnētiskās lodītes. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
3. Veic apakšnodaļā e) apakšnodaļā norādītos protokola punktus 3.–9.
4. Noņem stobriņu no magnētiskā statīva un pievieno 32 µl TE buferi, lai eluētu DNS. Samaisa, pipetējot 10 reizes.
5. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
6. Īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2—5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
7. Pārnes 30 µl supernatantu uz jaunu 1,5 ml stobriņu un veic kvantitatīvo analīzi, izmantojot Qubit dsDNA HS Assay Kit reaģentu komplektu, pēc norādītā protokola apraksta apakšnodaļā 2.2.3. un PCR produkta kvalitātes pārbaudi ar High Sensitivity DNA reaģentu komplektu, pēc norādītā apraksta 2.2.4. apraksta apakšnodaļā.

## h) PCR produktu denaturācija

Denaturācija ir process, kuras laikā tiek izjaukta nukleīnskābes vai proteīna struktūra. DNS tā ir dubultspirāles sadalīšana divās vienviediena DNS. Šo procesu panāk ar paaugstinātu temperatūru, kuras ietekmē tiek pārrautas ūdeņraža saites, kuras saista komplementārās bāzes starp abiem DNS pavedieniem.

Protokols:

1. Atkarībā no DNS bibliotēkas fragmentu garuma un koncentrācijas, izmantojot zemāk esošās formulas, aprēķina DNS tilpumu katram paraugam, lai kopā iegūtu 1 pmol DNS bibliotēkas maisījumu. Zemāk uzskaitītie aprēķini attēlo 16 DNS bibliotēku apvienošanu.

- 1.1. Aprēķina katram PCR paraugam kopējo DNS daudzumu paraugā:

$$\text{Masa (ng)} = V_{\text{PCR paraugam}}(\mu\text{l}) \times \text{Koncentrācija (ng}/\mu\text{l})$$

- 1.2. Aprēķina katram PCR paraugam DNS masu vienā pikomolā:

$$\text{DNS masa} \left( \frac{\text{ng}}{1\text{pmol}} \right) = \frac{\text{DNS fragmentu garums (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

- 1.3. Aprēķina katram PCR paraugam molāro koncentrāciju vienā mikrolitrā pēc sekojošas divpakāpju formulas:

$$\text{Molārā koncentrācija pilnā parauga } V \left( \frac{\text{pmol}}{27\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{DNS masa pilnā parauga } V_{ng}}{\frac{\text{DNS masa}_{ng}}{1\text{pmol}}}$$

$$\text{Molārā koncentrācija } 1 \mu\text{l} \left( \frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{Molārā koncentrācija pilnā parauga } V_{\text{pmol}}}{V_{\text{PCR}}}$$

- 1.4. Aprēķina bibliotēkas koeficientu – nepieciešamo datu daudzumu katram paraugam. Pēc zemāk norādītās formulas tiek paredzēts iegūt līdzīgu sekvenču sadalījumu no paraugiem, kuri tiks sekvencēti uz viena čipa kanāla:

$$\text{Bibliotēkas koeficients} = \frac{1 \text{ pmol}}{\text{paraugu skaits uz čipa kanāla}}$$

- 1.5. Aprēķina nepieciešamo DNS tilpumu katram paraugam, kur gala koncentrācija visiem paraugiem kopā veido 1 pmol:

$$\text{DNS } (\mu\text{l}) = \frac{\text{bibliotēkas koeficients}}{\text{molārā koncentrācija vienā mikrolitrā}_{\text{pmol}/\mu\text{l}}}$$

2. Vadoties pēc aprēķiniem, PCR produkti tiek apvienoti jaunā parauga stobriņā: no katra DNS parauga pārnes attiecīgā tilpuma PCR produkta uz jaunu 0,2 ml stobriņu. Pievieno TE buferi, lai kopējais tilpums paraugu maisījumam būtu 48  $\mu\text{l}$ .
3. Stobriņu ievieto termostatā un iestāda sekojošo programmu:
4. Uzreiz pēc reakcijas 0,2 ml stobriņu novieto uz ledus uz 2 minūtēm.

#### i) Vienpavediena cirkularizācija

Iepriekšējā solī iegūtajai vienpavediena DNS cirkularizācija ir nepieciešama, lai iegūtā parauga bibliotēka būtu piemērota sekvencēšanas platformai *MGI*. Cirkularizācija tiek veikta, pievienojot saistītāja (*Splint*) oligonukleotīdu sekvenci, kas ir komplementāra gan ar 5', gan 3' vienpavediena fragmenta galiem, kā rezultātā fragments izveido noslēgtu apli.

Protokols:

1. Sagatavo reakcijas maisījumu uz ledus PCR stobriņā apvienojot 11,6  $\mu\text{l}$  *Splint* buferi un 0,5  $\mu\text{l}$  *DNA Rapid* ligāzi. Gala tilpums maisījumam 12,1  $\mu\text{l}$ .
2. Pievieno 12,1  $\mu\text{l}$  reakcijas maisījuma 0,2 ml stobriņam ar denaturētu PCR produktu. Samaisa un īsi centrifugē.
3. Stobriņu ievieto termostatā un iestāda sekojošo programmu:
4. Uzreiz pēc reakcijas 0,2 ml stobriņu novieto uz ledus un veic nākamo reakciju.

#### j) Vienpavediena cirkulārās DNS enzimatiska apstrāde

Protokols:

1. Sagatavo reakcijas maisījumu uz ledus PCR stobriņā apvienojot 1,4  $\mu\text{l}$  *Digestion Buffer* buferšķīduma un 2,6  $\mu\text{l}$  *Digestion Enzyme* enzīmu. Gala tilpums maisījumam 4,0  $\mu\text{l}$ .
2. Pievieno 4  $\mu\text{l}$  reakcijas maisījuma iepriekšējos soļos sagatavotajam 0,2 ml stobriņam. Samaisa un īsi centrifugē.
3. Inkubē 30 min +37 °C, notur pie +4 °C vismaz 5 min.
4. Pēc reakcijas stobriņu centrifugē un pievieno 7,5  $\mu\text{l}$  *Digestion Stop Buffer* buferi. Samaisa un īsi centrifugē.

5. Pārnes visu reakcijas produktu uz jaunu 1,5 ml stobriņu un veic paraugu attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm.

#### **k) Vienpavediena cirkulārās DNS attīrīšana**

Protokols:

1. *MGIEasy DNA Clean Beads* magnētiskās lodītes pirms lietošanas izņem no ledusskapja un 30 minūtes atstāj sasilt istabas temperatūrā. Pirms lietošanas kārtīgi samaisa un īsi centrifugē.
2. Piektajā solī sagatavotajam stobriņam pievieno 170 µl magnētiskās lodītes. Samaisa, pipetējot vismaz 10 reizes.
3. Inkubē istabas temperatūrā 10 minūtes.
4. Stobriņu īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2—5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
5. Uzmanīgi, nenoņemot stobriņu no magnētiskā statīva, aizvāc supernatantu.
6. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva un lodītēm pievieno 500 µl svaigi pagatavotu 80% etanolu.
7. Pēc 30 sekundēm aizvāc etanolu.
8. Atkārti 6.–7. soli. Pēc tam uzmanīgi aizvāc visu šķīdumu, kas ir stobriņā, neaizskarot lodītes.
9. Atstāj stobriņu uz magnētiskā statīva ar atvērtu vāciņu un žāvē lodītes līdz to sablīvējums no spīdīga kļūst par matētu, bet pirms tās sāk plaisāt.
10. Noņem stobriņu no magnētiskā statīva un pievieno 30 µl TE buferi, lai eluētu DNS. Samaisa, pipetējot vismaz 10 reizes.
11. Inkubē istabas temperatūrā 10 minūtes.
12. Stobriņu īsi centrifugē un novieto uz magnētiskā statīva uz 2-5 minūtēm, kamēr šķīdums paliek dzidrs.
13. Pārnes 27 µl supernatantu uz jaunu 1,5 ml stobriņu un veic iegūtās vienpavediena DNS koncentrācija noteikšanu, izmantojot *Qubit ssDNA Assay Kit* reaģentu komplektu, pēc norādītā protokola apraksta apakšnodaļā 2.2.2. Attīrītais *Enzymatic digestion* produkts var tikt uzglabāts pie  $-20^{\circ}\text{C}$  vienu mēnesi.

## 2.2.10. Sekvencēšana

Sekvencēšana ir molekulārās bioloģijas metode, ar kuru var noteikt nukleotīdu secību DNS fragmentam. Nākamās paaudzes sekvencēšana (NGS) ir DNS sekvencēšanas tehnoloģija, kas ir radikāli mainījusi genomikas pētījumus. Izmantojot NGS, iespējams sekvencēt visu cilvēka genomu vienas dienas laikā. Salīdzinājumam, iepriekš izmantotajai *Sanger* sekvencēšanas tehnoloģijai tam būtu nepieciešams vairāk kā desmit gadu (Behjati & Tarpey, 2013). Lielākā priekšrocība NGS metodei ir gan jaunu, gan zināmu miRNS identificēšana, kā arī precīza to sekvenču noteikšana, piemēram, RNA-seq metode var izšķirt tās miRNS, kuras atšķiras tikai ar vienu nukleotīdu (Pritchard et al., 2012).

Sagatavoto bibliotēku sekvencēšanu veica kvalificēti speciālisti Latvijas Genoma centrā (Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra struktūrvienība). Fēču metagenoma bibliotēka tika sekvenēta ar MGI iekārtu DNBSEQ-G400RS, izmantojot DNBSEQ-G400RS *High-throughput Sequencing Set* (FCL PE150) reaģentu komplektu. Bibliotēku sagatavošanas laikā tiek izveidotas DNS nanobumbas (DNB), izmantojot vienpavediena cirkularizētas DNS. Pirms sekvencēšanas tiek noteikta DNB koncentrācija ar *Invitrogen Qubit* fluorometru. Tiek izmantots silīcija čips (*Patterned Array chip*), kuram ir DNB piesaistes vietas ar atstarpēm, kas nodrošina to, ka vienā piesaistes vietā ir viena DNB. Šāda sistēma neļauj DNB fluorescences signāliem sajaukties. Pie DNB adapteru reģiona tiek hibridizēti sekvencēšanas praimerī, lai fluorescenti iezīmēts dNTP tiktu iekļauts DNS polimerāzē. Ar augstas izšķirtspējas attēlu sistēmu tiek notverts fluorescentais signāls. Pēc optiskā signāla digitālas apstrādes tiek iegūti precīzi sekvencēšanas dati (MGI Tech Co., 2019).

Zarnu biopsiju miRNS bibliotēka tika sekvenēta ar *Illumina MiSeq* iekārtu, izmantojot *MiSeq Reagent Kit v3* (150 cycle) reaģentu komplektu. DNS vispirms tiek fragmentēts un abos galos tiek pievienoti adapteri. Bibliotēka tiek uznesta uz plūsmas čipa, un fragmenti tiek hibridizēti uz tā virsmas. Pēc tam šie fragmenti tiek notverti šūnu plūsmas joslā, un piesaistītie fragmenti tiek amplificēti klonālos klasteros ar tilta amplifikācijas metodi. Pēc tam šūna tiek apstrādāta ar četriem fluorescenti iezīmētajiem nukleotīdiem un ekrānā tiek veikta attēlveidošana, lai noteiktu fluorescējošo signālu. Cikls tiek atkārtots  $n$  reižu, lai izveidotu nolasījumu garumu no  $n$  bāzu skaita.

## 2.2.11. Darba drošība

Izstrādājot pētījuma praktisko daļu, tika ievērota darba drošība. Tika vilkts laboratorijas halāts, sejas aizsargmaska un gumijas cimdi. Pirms un pēc darba ar 70% etanolu tika dezinficētas

virsmas, uz kurām tika strādāts. RNS un DNS izdalīšana, kā arī bibliotēku sagatavošana tika veikta laminārā, lai izvairītos no paraugu kontaminācijas. Visa pētījuma laikā izmantoti pipetes uzgaļi ar filtru. Darba izstrādes laikā radušies infekciozie atriķumi tika uzglabāti speciālos atkritumu maisos, kas pēc darba veikšanas tika utilizēti tam paredzētajā darba kārtībā.

### 2.2.12. Datu apstrāde

Nolasījumu kvalitātes kontrole tika veikta ar *FastQC* rīku. Tika veikta 5' un 3' adapteru apgriešana ar *cutadapt v1.16*. Nolasījumi tika apgriezti, izmantojot *Trimmomatic v0.39*, kā 5 bp logu ar kvalitātes sliekšni 20. Metagenoma sekvencēšanas nolasījumi tika apgriezti izmantojot *Trimmomatic v0.39*, kā un 5 bp logu ar kvalitātes sliekšni 20. Turpmākai datu analīzei tika izmantoti sapārotie nolasījumi ar garumu 75 bp vai garāki.

Saimniekorganisma nolasījumi tika kartēti pret cilvēka (GRCh38) references genomu. Nekartētu nolasījumu taksonomiskā klasifikācija tika veikta ar *mOTUs2 3.0.1*.

MiRNS dati tika analizēti, izmantojot *CLC Genomics Workbench 20.0.4*. *CLC Genomics Workbench* programmā tika izmantots rīks *Quantify miRNA*, lai iegūtos nolasījumus kartētu pret *miRBase release v22*, norādot *Homo Sapiens* kā prioritāro sugu.

Diferenciālā sastopamība tika testēta ar *edgeR* paketes versiju 3.32.1. un *limma 3.46.0*. Diferenciālā testēšana tika veikta vairāku faktoru kombinācijām: dzimums, vecums, pētījuma dalībnieka slimības diagnoze. Par statistiski nozīmīgām tika uzskatītas sastopamības atšķirības ar p-vērtību < 0.05.

Metagenoma un miRNS nolasījumu skaits tika atlasīts, kā sliekšni izmantojot vidējo vērtību 10. Pirms centrētās log attiecības normalizācijas (clr) tika veikta nulles vērtību imputācija ar R paketes versiju *zCompositions 1.3.4*. Metagenoma un miRNS datu kopu korelācijas analīze tika veikta delta clr vērtībām, izmantojot retu daļējo mazāko kvadrātu regresiju R paketē *mixomics 6.15.45*.

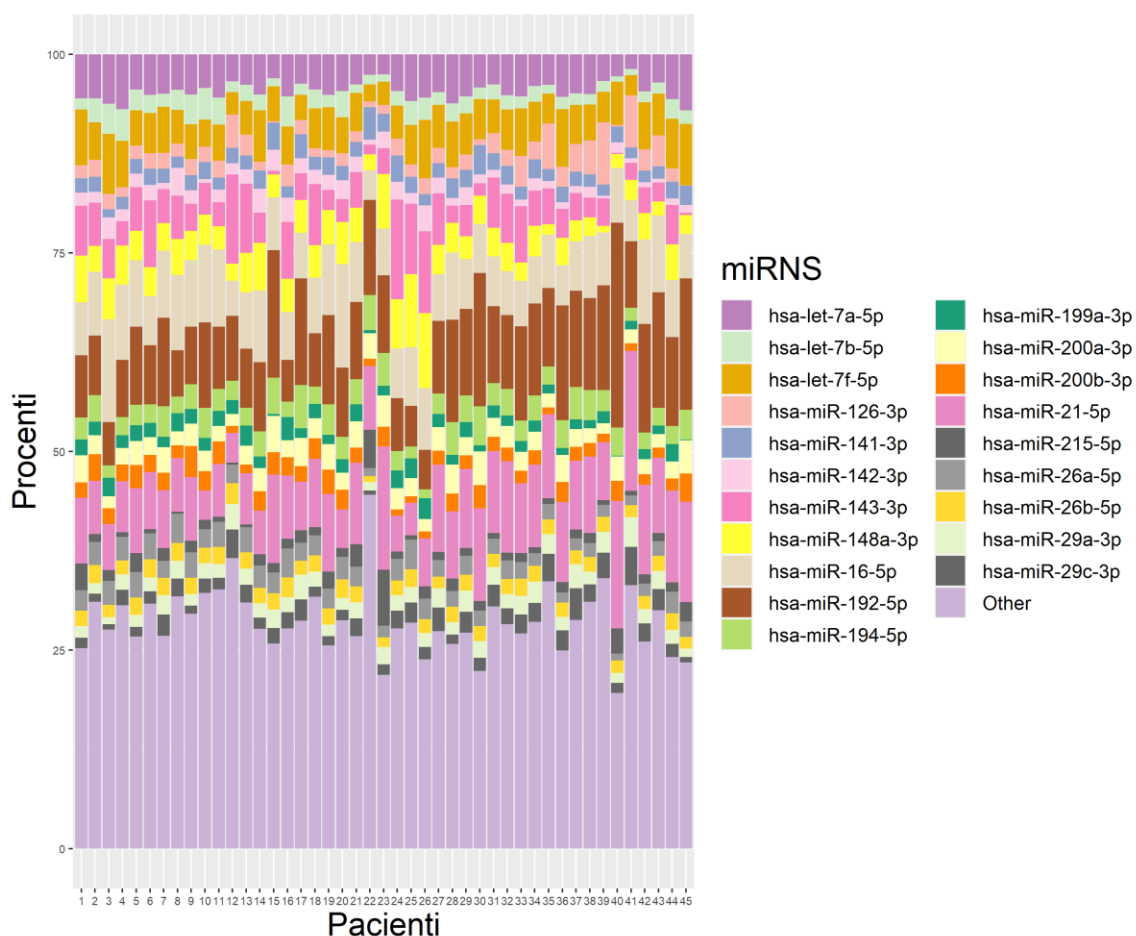
### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. MiRNS kompozīcija zarnu biopsiju paraugos

Ar miRNS sekvenēšanas metodi tika noteikta pacientu, kuriem veikta kolonoskopija, zarnu biopsiju paraugu miRNS kompozīcija. Iegūto single-end nolasījumu mediāna bija 3'475'739.

Pēc nolasījumu anotēšanas pret miRBase datubāzi, tika atrastas 982 nobriedušas miRNS, kurām bija vismaz 1 nolasījums. No identificētajām miRNS, 77 bija vismaz viens nolasījums kādā no paraugiem un 12 bija vismaz 100 nolasījumi. 20 visvairāk reprezentētās miRNS veidoja 71,91% no kopējā nolasījumu skaita.

Visās grupās hsa-miR-192-5p bija dominējošā miRNS, pēc tam sekoja hsa-miR-21-5p un hsa-miR-16-5p. Visas 20 izplatītākās miRNS bija atrodamas katrā no eksperimentālajām grupām.



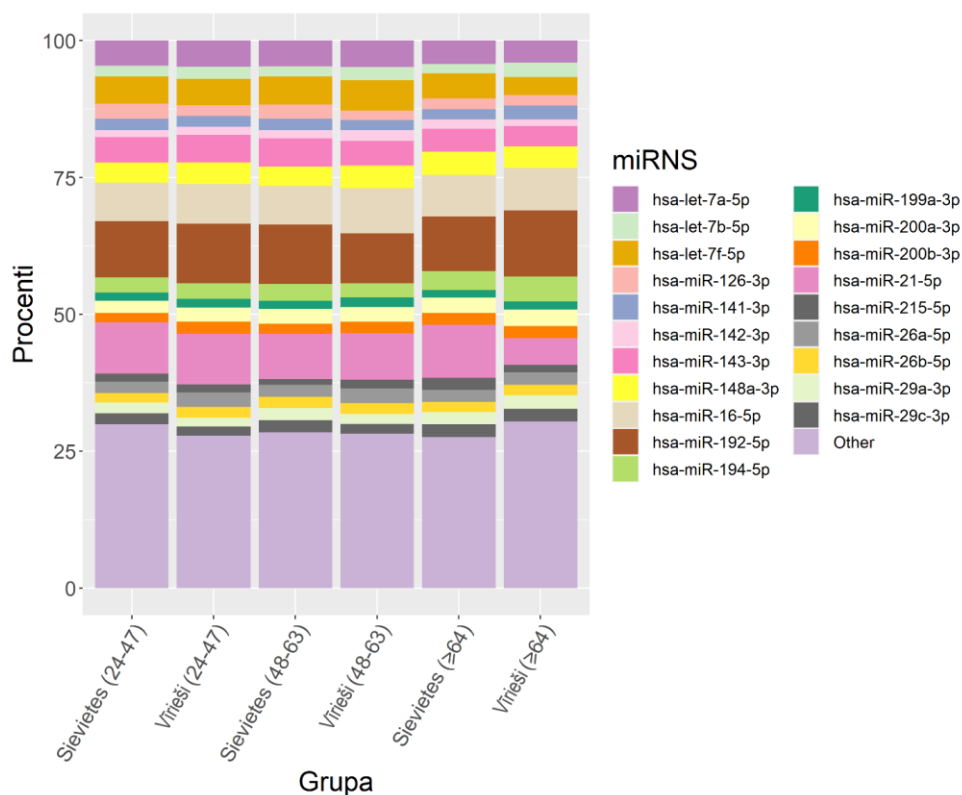
3. attēls. Relatīvais daudzums no 20 visvairāk reprezentētajām miRNS cilvēku zarnu biopsiju paraugos.

Figure 3. The relative abundances of top 20 fecal miRNAs in human intestinal biopsy samples.

### 3.2. Atšķirīgi sastopamās miRNS zarnu biopsiju paraugos

Dažādu miRNS relatīvais daudzums fēcēs starp eksperimentālajām grupām tika salīdzināts, izmantojot dažādus kontrastus. Savā starpā tika salīdzināti 1) M.Y. – vīrieši vecuma kategorijā no 24 līdz 47 gadiem, M.M. – vīrieši vecuma kategorijā no 48 līdz 63 gadiem, M.S. – vīrieši vecuma kategorijā  $\geq 64$  gadi; F.Y. – sievietes vecuma kategorijā no 27 līdz 47 gadiem, F.M. – sievietes vecuma kategorijā no 48 līdz 63 gadiem, F.S. – sievietes vecuma kategorijā  $\geq 64$  gadi; 2) pacienti ar katru no dažādām GI trakta slimībām: ZD (n=3) – zarnas divertikuloze, HG (n=13) – hronisks gastrīts, K12P (n=3) – kuņģa vai divpadsmitpirkstu zarnas čūlas jeb peptiskās čūlas, GERS (n=7) – gastroezofageāla refluksa slimība, KRV (n=5) – kolorektālais vēzis, CK (n=2) – čūlainais kolīts, ZP (n=1) – zarnas polipi pret ND (n=11) – pacienti, kuriem nav diagnosticēta kāda no šīm slimībām.

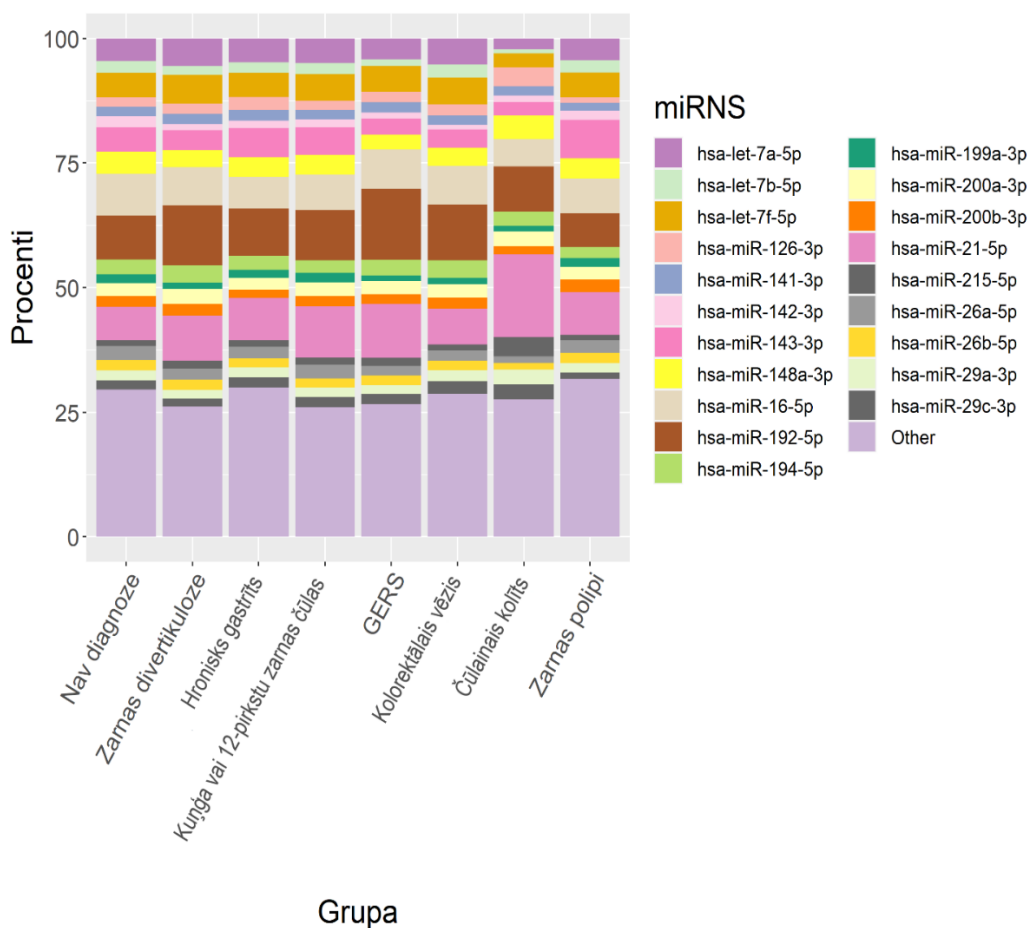
Analizējot pacientu miRNS katru no kontrastiem (M.Y., M.M., M.S., F.Y., F.M., F.S.), pēc multiplās korekcijas starp grupām netika novērotas būtiskas atšķirības, skatīt 4. attēlā.



4. attēls. Relatīvais daudzums no 20 visvairāk reprezentētajām miRNS vecuma kategorijas un dzimuma eksperimentālajās grupās.

Figure 4. The relative abundances of top 20 fecal miRNAs in age and gender related experimental groups.

Analizējot pacientu miRNS katru no kontrastiem (ND, ZD, HG, K12P, GERS, KRV, ZP, CK), pēc multiplās korekcijas starp grupām tika novērotas būtiskas atšķirības grupā pacientiem, kuriem nav diagnozes (ND) pret GERS pacientiem. Šajos paraugos tika atrastas 10 miRNS ar statistiski būtiski izmainītu sastopamību, skatīt 5. attēlu. GERS pacientiem bija palielinātas hsa-miR-192-3p (LogFC = -1.17, adj.P = 0,009), hsa-miR-190a-5p (LogFC = -0.80, adj.P = 0,009), hsa-miR-21-5p (LogFC = -0.91, adj.P = 0,009), hsa-miR-192-5p (LogFC = -0.89, adj.P = 0,009), hsa-miR-200a-5p (LogFC = -1.15, adj.P = 0,02), hsa-miR-374a-3p (LogFC = -1.29, adj.P = 0,02), hsa-miR-25-3p (LogFC = -0.72, adj.P = 0,02), taču samazinātas bija hsa-miR-197-3p (LogFC = 2.12, adj.P = 0,008), hsa-let-7d-5p (LogFC = 0.97, adj.P = 0,02) un hsa-miR-423-5p (LogFC = 1.64, adj.P = 0,02), skatīt 5. attēlā.



5. attēls. Relatīvais daudzums no 20 visvairāk reprezentētajām miRNS pacientiem ar dažādām pētītajām diagnozēm.

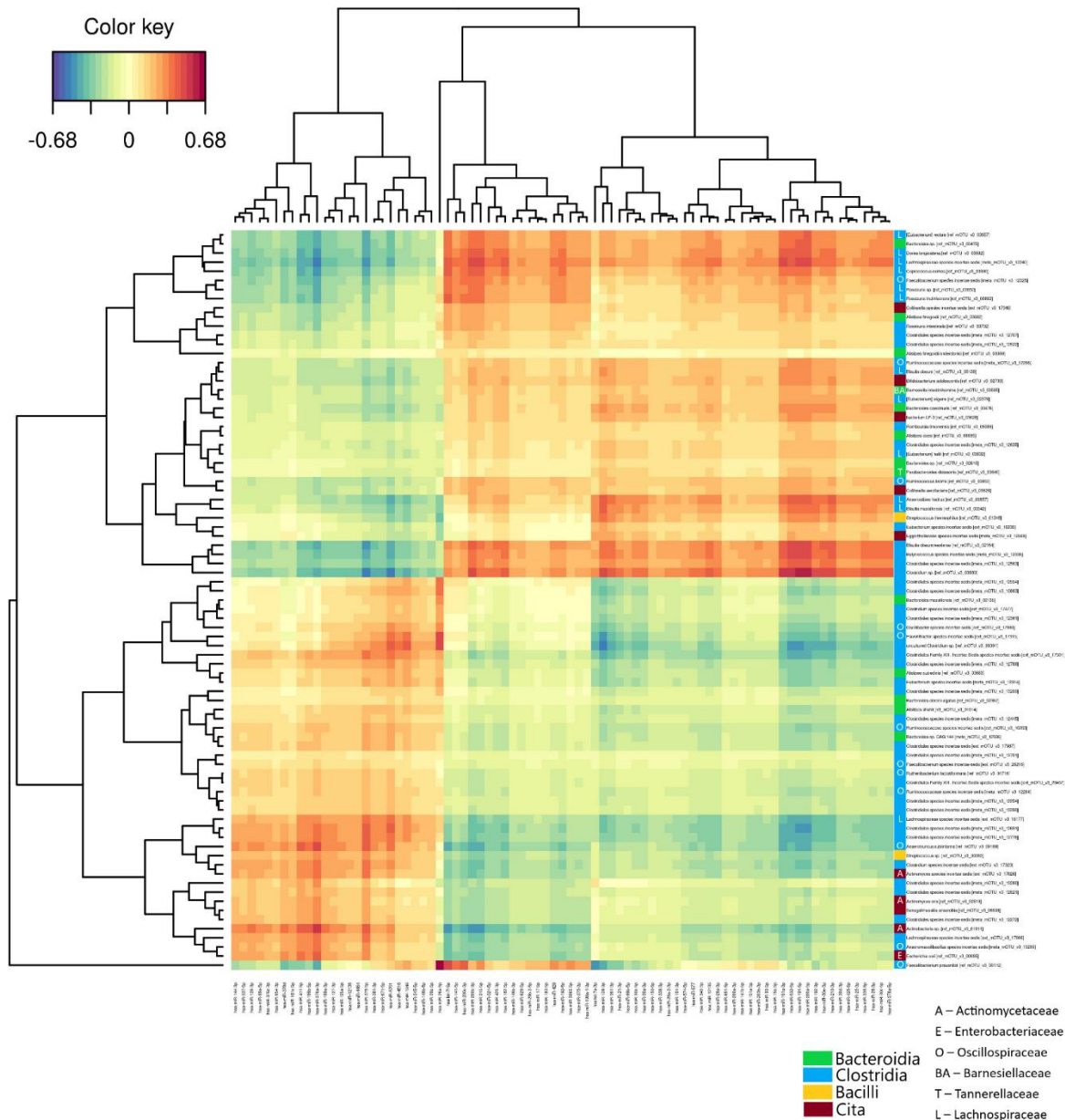
Figure 5. The relative abundances of top 20 fecal miRNAs in patients with different diagnoses studied.

### 3.3. Korelācija starp fēču miRNS un zarnu mikrobiomu

Lai analizētu, vai pastāv korelācija starp zarnu biopsiju miRNS un mikrobioma kompozīciju, tika izmantoti 45 pētījuma dalībnieku zarnu biopsiju paraugi, kā arī šo pašu pacientu fēču paraugi.

Korelācijas analīze parādīja (skatīt 6. attēlā), ka vairākas miRNS saimes, piemēram, miR-200 saimes pārstāvji – hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200a-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p pozitīvi korelē ar *Tannerellaceae* un *Lachnospiraceae* (izņemot *Lachnospiraceae species incertae sedis* (ext\_mOTU\_v3\_16177)) dzimtu pārstāvjiem, tāpat arī pozitīvi korelē ar *Barnesiellaceae* dzimtas pārstāvjiem. Negatīvi korelē ar *Actinomycetaceae* un *Oscillospiraceae* (izņemot *Faecalibacterium species incertae sedis*, *Ruminococcaceae species incertae sedis* un *Ruminococcus bromii*). Līdzīgu korelāciju parādīja arī miR-151 saimes pārstāvji – hsa-miR-151a-3p un hsa-miR-151a-5p. Dažas miRNS no miR-200 un miR-151 saimēm (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p un hsa-miR-151a-5p) pozitīvi korelēja ar vienu *Oscillospiraceae* dzimtas pārstāvi - *Faecalibacterium prausnitzii*. Arī miR-30 saimes pārstāvji (hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-3p un hsa-miR-30e-3p) korelē līdzīgi kā iepriekš minētajā. Pretējā virzienā korelāciju parādīja miR-199 saimes (hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-5p) un miR-376 saimes (hsa-miR-376a-3p un hsa-miR-376c-3p) miRNS. MiR-376 saimēm ir izņēmums – *Oscillospiraceae* dzimtas pārstāvis *Faecalibacterium prausnitzii* korelē negatīvi.

Savukārt hsa-miR-99a-5p pozitīvi korelē ar *Actinomycetaceae*, *Oscillospiraceae* (izņemot *Faecalibacterium species incertae sedis*, *Ruminococcaceae species incertae sedis* un *Ruminococcus bromii*) un *Enterobacteriaceae*, negatīvi ar *Barnesiellaceae*, *Tannerellaceae*, *Lachnospiraceae* (izņemot *Lachnospiraceae species incertae sedis* (ext\_mOTU\_v3\_16177)), pretējā virzienā korelāciju parādīja cita miR-99 saime – hsa-miR-99b-5p. Arī hsa-miR-146b-5p parādīja pozitīvu korelāciju *Actinomycetaceae*, *Oscillospiraceae* (izņemot *Faecalibacterium species incertae sedis*, *Ruminococcaceae species incertae sedis* un *Ruminococcus bromii*) un *Enterobacteriaceae*, bet negatīvu ar *Barnesiellaceae*, *Tannerellaceae*, *Lachnospiraceae* (izņemot *Lachnospiraceae species incertae sedis* (ext\_mOTU\_v3\_16177)) dzimtu pārstāvjiem, un tās pašas saimes hsa-miR-146b-3p parādīja korelāciju pretējā virzienā.



6. attēls. Korelācija starp zarnu biopsiju miRNS un zarnu mikrobiomu, noteikta noteiktas ar miRNS sekvencēšanu un metagenoma sekvencēšanu. Krāsu atšifrējums atbilst korelācijas pakāpei, ar zilo un sarkano krāsu apzīmēta negatīva un pozitīva korelācija.

Figure 6. Correlation analysis between intestinal biopsy miRNAs and gut microbiome, identified by miRNA-seq and shotgun metagenomic sequencing, respectively. The colour key indicates the correlation levels, with blue and red colour denoting negative and positive correlation, respectively.

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. Atšķirīgi sastopamās miRNS zarnu biopsiju paraugos

Pārsvārā ar vecumu saistīti miRNS pētījumi veikti, izmantojot asins seruma paraugus. Daži miR saimes pārstāvji – miR-18a, -142-3p, -192, -423-5p, -576-3p, -652, -let7e un -let7d, uzrādīja ievērojami zemāku ekspresiju pacientiem, kas vecāki par 100 gadiem (Olivieri et al., 2012). Individīdiem, kas vecāki par 64 gadiem novērota samazināta miR-151a-5p, miR-181a-5p un miR-1248 ekspresija (Noren Hooten et al., 2013). Jaundzimušajiem ir zemāka ekspresija nekā 7 gadus veciem bērniem, piemēram, miR-19a-3p, miR-1254, miR-425-5p, miR-1260b, taču augstāka miR-616-3p ekspresija (Huen et al., 2019). Savukārt vecuma kategorijā  $\geq 64$  bronhiālās biopsijās novērota zemāka miR-146a-5p, miR-146b-5p un miR-142-5p ekspresija, kas iesaistītas šūnu cikla regulēšanā, imūnsistēmā un DNS bojājumos/labošanā (Ong et al., 2019). Kopumā pētījumā iegūtie rezultāti nesakrīt ar citiem pētījumiem, taču iepriekš veiktie pētījumi nav saistīti ar vecumu un GI traktu, kas varētu ietekmēt rezultātus, kā arī miRNS ekspresija var atšķirties indivīdiem, taču ne tieši kādā noteiktā vecuma kategorijā. Tāpat arī miRNS ekspresiju ietekmē dzīvesveids (Panico et al., 2021), diēta (Kura et al., 2019) un veselības stāvoklis (Li & Kowdley, 2012).

Apstiprināts, ka plakanšūnu karcinomas gadījumā miR-137 ir ar sieviešu dzimumu saistīta molekula (Langevin et al., 2010), arī *Geekiyanaige & Chan* pētījumā parādīts, ka miR-137, miR-181c un miR-29a/b-1 ekspresijas līmeņi savvaļas tipa peļu mātišu smadzeņu garozā ir pazemināti, salīdzinot ar tēviņiem (Geekiyanaige & Chan, 2011). Savukārt *Noren Hooten et al.* pētījumā veikta dispersijas analīze, izmantojot dzimumu, rasi un vecumu, parādīja, ka rase un dzimums būtiski nekorelēja ar miRNS ekspresiju (Noren Hooten et al., 2013), kas sakrīt ar bakalaura darbā iegūtajiem rezultātiem. Tomēr šīs atšķirības dažādos pētījumos iespējams ietekmē arī citi faktori, kā veselības stāvoklis, fiziskā aktivitāte, slodze, diēta.

Iepriekš noskaidrots, ka vairākām miRNS Baretā barības vada slimības gadījumā ir izmainīta ekspresija, *Mallick et al.* pētījumā novēroja, ka ir paaugstināta miR-192, -194 un -215 un samazināta miR-203 un -205 ekspresija (Mallick et al., 2015). Pētījumā, kur šīs pašas miRNS tika aplūkotas GERS kontekstā, netrada līdzīgas saistības, izņemot to, ka ir samazināta miR-203 (Yan et al., 2016). Arī šajā pētījumā tikai novērota paaugstināta miR-192, tomēr Baretā barības vada slimība ir smagāka GERS attīstības stadija, līdz ar to bakalaura darba pētījumā iesaistītajiem pacientiem, iespējams, miRNS ekspresija tika novērota citām miR saimēm, nevis tieši tām pašām,

kas Bareta barības vada slimības gadījumā. Kā arī pētījumā būtu nepieciešams iesaistīt vairāk dalībniekus, kas slimo tieši ar GERS, lai varētu izdarīt precīzākus novērojumus.

#### 4.2. Korelācija starp fēču miRNS un zarnu mikrobiomu

Tika novērota spēcīga pozitīva korelācija starp miR-194-5p, miR-148-3p, miR-27b-3p un *Enterobacteriaceae*, kas liecina, ka šīs miRNS varētu būt starpnieki starp *Enterobacteriaceae* un iekaisumu (Viennois et al., 2019), kā arī iepriekš noskaidrots, ka *Enterobacteriaceae*, īpaši *E. Coli* sastopamība daudz pacientiem ar kolorektālo vēzi ir palielināta (Martin et al., 2004). Iegūtajos rezultātos vairākas miR saimes arī korelē pozitīvi ar *Enterobacteriaceae* dzimtas pārstāvjiem, taču tās nesakrīt ar šī pētījuma rezultātiem.

Pelēm ar miR-146a deficītu bija samazināts *Proteobacteria* ģints, *Prevotellaceae* ģimenes un *Parasutterella* ģints daudzums un ievērojami palielinājās īsās ķēdes taukskābes ražojošo baktēriju skaits, tostarp *Alistipes*, *Blautia*, *Coprococcus\_1* un *Ruminococcus* ģintis. Savvaļas tipa pelēm, kas tika izmitinātas kopā ar pelēm ar miR-146a deficītu, bija paaugstināta rezistence pret *L. monocytogenes*, kas liecina, ka miR-146a deficīts ietekmē zarnu mikrobiomu, lai mazinātu *L. monocytogenes* infekciju. Šie rezultāti liecina, ka miR-146a deficīts aizsargā pret *L. monocytogenes* infekciju, regulējot zarnu mikrobiomu (Du et al., 2018). Iegūtie rezultāti par miR-146 saimēm sakrīt ar *Du et al.* pētījumu, šajā gadījumā parādot negatīvu korelāciju ar *Ruminococcus* ģintīm pie palielināta miR-146 daudzuma gastrointestinālajā traktā.

*Ye et al.* pētījumā tika novērota negatīvā korelācija starp mmu-miR-30a-5p un *Bacteroides* pārstāvjiem kontrastē ar pretēju saistību starp citu miRNS no miR-30 saimes – mmu-miR-30e-5p un *Bacteroides*. MiR-30 kontrolē zarnu epitēlijšūnu proliferāciju un diferenciāciju (Ye et al., 2021), kas nesaskan ar pētījumā iegūtajiem rezultātiem, kur miR-30 saimes savā starpā parādīja gan līdzīgu pozitīvo korelāciju, gan negatīvo korelāciju, korelējot vienā virzienā. Savukārt GI traktā palielinot *Akkermansia muciniphila*, miR-30d spēj aizsargāt no multiplās sklerozes simptomiem eksperimentālā autoimūnā encefalomiēlīta peļu modelī (S. Liu et al., 2019).

Pētījuma limitējoši faktori bija relatīvi mazais nolasījumu skaits zarnu biopsiju paraugos, kā arī būtu svarīgi iekļaut pētījumā lielāku skaitu dalībnieku katrai pētītai grupai, lai iegūtu precīzākus datus. Tāpat arī būtu nozīmīgi veikt klasteranalīzi, lai izpētītu vai starp katru no pētītajām GI trakta slimībām ir novērojamas būtiskas atšķirības savā starpā. Kā papildus kritērijus analizē varētu iekļaut dalībnieku dzīvesveida paradumus (uzturs, fiziskā slodze, smēķēšana u.c.).

Nākotnē plānota fēču paraugu metagenoma sekvencēšana lielākam skaitam pacientu, kam veikta kolonoskopijas procedūra. Plānots arī veikt korelācijas analīzi starp fēču paraugiem un zarnu lūmena satura paraugiem.

Mikrobioma un tā ietekmes uz cilvēka veselību izpēte ir strauji augoša biomedicīnas pētījumu joma. Zarnu mikrobioma vai saimniekorganisma-mikrobioma mijiedarbību modulēšanas potenciāls sniedz jaunas terapijas stratēģiju iespējas daudzu hronisku slimību gadījumos. Detalizēta saimniekorganisma miRNS ierosinātu mikrobioma izmaiņu analīze cilvēkos ir nozīmīga veselības aprūpes uzlabošanā, kas var palielināt ar mikrobiomu saistītu slimību ārstēšanas efektivitāti un panesamību, kā arī veicināt personalizētās medicīnas attīstību.

## Secinājumi

1. Visos paraugos dominējošā miRNS ir hsa-miR-192-5p, kā arī 20 reprezentētākās miRNS sastopamas katrā paraugā.
2. MiR-200, miR-151, miR-30 saimes pozitīvi korelē ar *Tannerellaceae* un *Lachnospiraceae* dzimtas pārstāvjiem. Hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-146b-5p miRNS pozitīvi korelē ar *Actinomycetaceae* un *Oscillospiraceae* dzimtas pārstāvjiem.
3. Nav identificētas zarnu biopsiju paraugos būtiski sastopamas atšķirības starp pētījuma dalībnieku vecuma kategorijām, kā arī dzimumu. Novērotas būtiskas atšķirības atsevišķu zarnu biopsiju miRNS starp GERS pacientiem un pacientiem, kuriem nav diagnosticēta saslimšana ar kādu no GI trakta slimībām.

## Pateicības

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam Lailai Silamiķelei par palīdzību un ieteikumiem darba izstrādē, kā arī praktiskajā darbībā. Recenzentam Helvijam Niedram par darba novērtēšanu.

Darba autore izsaka pateicību arī Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par iespēju izstrādāt bakalaura darbu, kā arī Valsts iedzīvotāju genoma datubāzei par palīdzību pētījuma dalībnieku iesaistīšanā, Latvijas Genoma centra laboratorijai par paraugu sekvencēšanu un studiju centra IT un Bioinformātikas servisa centram par korelācijas analīzes veikšanu.

Pētījuma finansējuma avots – Eiropas Reģionālās attīstības fonda (ERAF) projekts:

1.1.1.1/18/A/092 MiRNS nozīme saimniekorganisma-zarnu mikrobioma mijiedarbībā metformīna terapijas kontekstā uz metabolisma traucējumu fona.

## Literatūras saraksts

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3008599>
- Aguilar, C., Mano, M., & Eulalio, A. (2019). MicroRNAs at the Host-Bacteria Interface: Host Defense or Bacterial Offense. *Trends in Microbiology*, 27(3), 206–218. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.10.011>
- Ahmed, F. E. (2014). MiRNA as markers for the diagnostic screening of colon cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 14(4), 463–485. <https://doi.org/10.1586/14737140.2014.869479>
- Bäckhed, F. (2011). Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 58 Suppl 2(SUPPL. 2), 44–52. <https://doi.org/10.1159/000328042>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. In *Cell* (Vol. 173, Issue 1, pp. 20–51). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Berstad, A., Hausken, T., Gilja, O. H., Hveem, K., Nesje, L. B., & Ødegaard, S. (1996). Ultrasonography of the human stomach. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 220(220), 75–82. <https://doi.org/10.3109/00365529609094755>
- Bi, K., Zhang, X., Chen, W., & Diao, H. (2020). MicroRNAs Regulate Intestinal Immunity and Gut Microbiota for Gastrointestinal Health: A Comprehensive Review. *Genes*, 11(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/GENES11091075>
- Biller, L. H., & Schrag, D. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*, 325(7), 669–685. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.0106>
- Bnard, F., Brkun, A. N., Martel, M., & Von Renteln, D. (2018). Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. *World Journal of Gastroenterology*, 24(1), 124. <https://doi.org/10.3748/WJG.V24.I1.124>
- Chey, W. D., Leontiadis, G. I., Howden, C. W., & Moss, S. F. (2017). ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. *American Journal of Gastroenterology*, 112(2), 212–238. <https://doi.org/10.1038/AJG.2016.563>

- Claesson, M. J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., Van Sinderen, D., O’Connor, M., Harnedy, N., O’Connor, K., Henry, C., O’Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., ... O’Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*(Suppl 1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1000097107>
- Clarrett, D. M., & Hachem, C. (2018). Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). *Missouri Medicine*, *115*(3), 214. [/pmc/articles/PMC6140167/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30140167/)
- Daniels, L., Budding, A. E., de Korte, N., Eck, A., Bogaards, J. A., Stockmann, H. B., Consten, E. C., Savelkoul, P. H., & Boermeester, M. A. (2014). Fecal microbiome analysis as a diagnostic test for diverticulitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *33*(11), 1927–1936. <https://doi.org/10.1007/S10096-014-2162-3>
- Du, C. T., Gao, W., Ma, K., Yu, S. X., Li, N., Yan, S. Q., Zhou, F. H., Liu, Z. Z., Chen, W., Lei, L. C., Yang, Y. J., & Han, W. Y. (2018). MicroRNA-146a Deficiency Protects against *Listeria monocytogenes* Infection by Modulating the Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 993, *19*(4), 993. <https://doi.org/10.3390/IJMS19040993>
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *3*(3), 153–173. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2078-6891.2012.030>
- Frøkjær, J. B., Liao, D., Bergmann, A., McMahon, B. P., Steffensen, E., Drewes, A. M., & Gregersen, H. (2005). Three-dimensional biomechanical properties of the human rectum evaluated with magnetic resonance imaging. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *17*(4), 531–540. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2005.00647.X>
- Fukuda, S., & Ohno, H. (2014). Gut microbiome and metabolic diseases. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 103–114). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0399-z>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umaphathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-*

- Month*, 65(12), 100851. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2019.02.004>
- Geekiyana, H., & Chan, C. (2011). MicroRNA-137/181c Regulates Serine Palmitoyltransferase and In Turn Amyloid  $\beta$ , Novel Targets in Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 31(41), 14820–14830. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3883-11.2011>
- Gilja, O. H., Lunding, J., Hausken, T., & Gregersen, H. (2006). Gastric accommodation assessed by ultrasonography. *World Journal of Gastroenterology*, 12(18), 2825–2829. <https://doi.org/10.3748/WJG.V12.I18.2825>
- Glover, M., Mansoor, E., Panhwar, M., Parasa, S., & Cooper, G. S. (2019). Epidemiology of Colorectal Cancer in Average Risk Adults 20–39 Years of Age: A Population-Based National Study. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(12), 3602–3609. <https://doi.org/10.1007/S10620-019-05690-8>
- Gorbach, S. L. (1996). Chapter 95 Microbiology of the Gastrointestinal Tract Composition and Distribution of the Microflora Metabolic Activities of the Microflora The Intestinal Microflora and Infection. *Baron S, Editor. Medical Microbiology. 4th Edition.*, 1–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7670/>
- Gorkiewicz, G., & Moschen, A. (2017). Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv 2017 472:1*, 472(1), 159–172. <https://doi.org/10.1007/S00428-017-2277-X>
- Halling, M. L., Kjeldsen, J., Knudsen, T., Nielsen, J., & Hansen, L. K. (2017). Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 23(33), 6137. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I33.6137>
- Harrison County: Environmental Health: Food Poisoning*. (n.d.). Retrieved May 24, 2022, from <https://www.in.gov/localhealth/harrisoncounty/environmental-health/food-protection/food-safety-certification-classes/food-poisoning/>
- He, J.-F. F., Luo, Y.-M. M., Wan, X.-H. H., & Jiang, D. (2011). Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(6), 404–408. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbt.20396>
- Hounnou, G., Destrieux, C., Desmé, J., Bertrand, P., & Velut, S. (2002). Anatomical study of the length of the human intestine. *Surgical and Radiologic Anatomy 2002 24:5*, 24(5), 290–294. <https://doi.org/10.1007/S00276-002-0057-Y>
- Hu, S., Liu, L., Chang, E. B., Wang, J. Y., & Raufman, J. P. (2015). Butyrate inhibits proliferative miR-92a by diminishing c-Myc-induced miR-17-92a cluster transcription in

- human colon cancer cells. *Molecular Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-015-0450-X>
- Huen, K., Lizarraga, D., Kogut, K., Eskenazi, B., & Holland, N. (2019). Age-Related Differences in miRNA Expression in Mexican-American Newborns and Children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(4). <https://doi.org/10.3390/IJERPH16040524>
- Jacobs, D. O. (2007). Clinical practice. Diverticulitis. *The New England Journal of Medicine*, 357(20), 2057–2066. <https://doi.org/10.1056/NEJMCP073228>
- Kandulski, A., Moleda, L., & Müller-Schilling, M. (2018). Diagnostic Investigations of Gastroesophageal Reflux Disease: Who and When to Refer and for What Test. *Visceral Medicine*, 34(2), 97–100. <https://doi.org/10.1159/000488184>
- Kavitt, R. T., Lipowska, A. M., Anyane-Yeboah, A., & Gralnek, I. M. (2019). Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine*, 132(4), 447–456. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2018.12.009>
- Kucharzik, T., Koletzko, S., Kannengießer, K., & Dignauß, A. (2020). Ulcerative Colitis—Diagnostic and Therapeutic Algorithms. *Deutsches Ärzteblatt International*, 117(33–34), 564. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2020.0564>
- Kuntz, T. M., & Gilbert, J. A. (2017). Introducing the Microbiome into Precision Medicine. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 38, Issue 1, pp. 81–91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.001>
- Kura, B., Parikh, M., Slezak, J., & Pierce, G. N. (2019). The Influence of Diet on MicroRNAs that Impact Cardiovascular Disease. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24081509>
- Langevin, S. M., Stone, R. A., Bunker, C. H., Grandis, J. R., Sobol, R. W., & Taioli, E. (2010). MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 31(5), 864–870. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGQ051>
- Li, Y., & Kowdley, K. V. (2012). MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 10(5), 246–253. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2012.07.005>
- Liao, D. H., Zhao, J. B., & Gregersen, H. (2009). Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 15(2), 169. <https://doi.org/10.3748/WJG.15.169>

- Lieberman, D. A., Weiss, D. G., Bond, J. H., Ahnen, D. J., Garewal, H., Harford, W. V., Provenzale, D., Sontag, S., Schnell, T., Durbin, T. E., Nelson, D. B., Ewing, S. L., Triadafilopoulos, G., Ramirez, F. C., Lee, J. G., Collins, J. F., Fennerty, M. B., Johnston, T. K., Corless, C. L., ... Chejfec, G. (2009). Use of Colonoscopy to Screen Asymptomatic Adults for Colorectal Cancer. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM200007203430301*, 343(3), 162–168. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007203430301>
- Liu, L., Chen, Y., Liu, T., Yu, J., Ma, L., & Wu, H. (2021). Genome-wide DNA methylation profiling and gut flora analysis in intestinal polyps patients. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1071–1081. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000002181>
- Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R., & Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host and Microbe*, 19(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005>
- Liu, S., Rezende, R. M., Moreira, T. G., Tankou, S. K., Cox, L. M., Wu, M., Song, A., Dhang, F. H., Wei, Z., Costamagna, G., & Weiner, H. L. (2019). Oral Administration of miR-30d from Feces of MS Patients Suppresses MS-like Symptoms in Mice by Expanding Akkermansia muciniphila. *Cell Host & Microbe*, 26(6), 779-794.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.10.008>
- Liu, S., & Weiner, H. L. (2016). Control of the gut microbiome by fecal microRNA. In *Microbial Cell* (Vol. 3, Issue 4, pp. 176–177). Shared Science Publishers OG. <https://doi.org/10.15698/mic2016.04.492>
- Mallick, R., Patnaik, S. K., Wani, S., & Bansal, A. (2015). A Systematic Review of Esophageal MicroRNA Markers for Diagnosis and Monitoring of Barrett’s Esophagus. *Digestive Diseases and Sciences 2015 61:4*, 61(4), 1039–1050. <https://doi.org/10.1007/S10620-015-3959-3>
- Martin, H. M., Campbell, B. J., Hart, C. A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H. F., & Rhodes, J. M. (2004). Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn’s disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127(1), 80–93. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2004.03.054>
- Mattuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Annals of Translational Medicine*, 7(21), 609–609. <https://doi.org/10.21037/ATM.2019.07.91>
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract.

- In *Diabetologia* (Vol. 59, Issue 3, pp. 426–435). Springer Verlag.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>
- MGI Tech Co. (2019). *MGI sequencing platforms: High-throughput gene sequencers, DNBSEQ™ sequencing technology-MGI*. <https://en.mgi-tech.com/products/>
- Moloney, G. M., Viola, M. F., Hoban, A. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). Faecal microRNAs: indicators of imbalance at the host-microbe interface? *Beneficial Microbes*, 9(2), 175–183. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0013>
- Monson, J. R., & Macklin, C. (2022). Colonoscopy. *Diseases of the Colon and Rectum*, 49(11), 1794–1796. <https://doi.org/10.1007/s10350-006-0671-6>
- Nakata, K., Sugi, Y., Narabayashi, H., Kobayakawa, T., Nakanishi, Y., Tsuda, M., Hosono, A., Kaminogawa, S., Hanazawa, S., & Takahashi, K. (2017). Commensal Microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15426–15433. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.788596/ATTACHMENT/98196473-9966-4A03-8392-2D15790E2C59/MMC1.ZIP>
- Noren Hooten, N., Fitzpatrick, M., Wood, W. H., De, S., Ejiogu, N., Zhang, Y., Mattison, J. A., Becker, K. G., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2013). Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)*, 5(10), 725. <https://doi.org/10.18632/AGING.100603>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 402). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Oh, H., Lee, D. H., Giovannucci, E. L., & Keum, N. N. (2020). Gastric and duodenal ulcers, periodontal disease, and risk of bladder cancer in the Health Professionals Follow-up Study. *Cancer Causes and Control*, 31(4), 383–391. <https://doi.org/10.1007/S10552-020-01274-4>
- Olivieri, F., Spazzafumo, L., Santini, G., Lazzarini, R., Albertini, M. C., Rippo, M. R., Galeazzi, R., Abbatecola, A. M., Marcheselli, F., Monti, D., Ostan, R., Cevenini, E., Antonicelli, R., Franceschi, C., & Procopio, A. D. (2012). Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(11–12), 675–685. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2012.09.004>
- Ong, J., Woldhuis, R. R., Boudewijn, I. M., van den Berg, A., Kluiver, J., Kok, K., Terpstra, M. M., Guryev, V., de Vries, M., Vermeulen, C. J., Timens, W., van den Berge, M., & Brandsma,

- C. A. (2019). Age-related gene and miRNA expression changes in airways of healthy individuals. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39873-0>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), 1556–1573. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050177>
- Panico, A., Tumolo, M. R., Leo, C. G., De Donno, A., Grassi, T., Bagordo, F., Serio, F., Idolo, A., De Masi, R., Mincarone, P., & Sabina, S. (2021). The influence of lifestyle factors on miRNA expression and signal pathways: a review. *Epigenomics*, 13(2), 145–164. <https://doi.org/10.2217/EPI-2020-0289>
- Parra, D. A., & Navarro, O. M. (2008). Sonographic diagnosis of intestinal polyps in children. *Pediatric Radiology*, 38(6), 680–684. <https://doi.org/10.1007/S00247-008-0812-2>
- Patel, T., Bhattacharya, P., & Das, S. (2016). Gut microbiota: an Indicator to Gastrointestinal Tract Diseases. *Journal of Gastrointestinal Cancer 2016 47:3*, 47(3), 232–238. <https://doi.org/10.1007/S12029-016-9820-X>
- Periyasamy, K., & Pandey, V. P. (2013). Novel approaches for colon specific drug delivery system- a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 118–122. <https://doi.org/10.30750/IJPBR.1.3.12>
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., ... Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317–2323. <https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>
- Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: Approaches and considerations. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 5, pp. 358–369). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3198>
- Pylori, H., Tzeng, J.-E., Lin, Y.-L., Chung, S.-M., & Chu, Y.-T. (2005). Four diagnostic methods for Comparison of Four Diagnostic Methods for Helicobacter pylori. *Tzu Chi Med J*, 5.
- QIAGEN. (2020). *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit*. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/allprep-dnarnamirna-universal-kit/>
- Reed, K. K., & Wickham, R. (2009). Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro.

- Seminars in Oncology Nursing*, 25(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.SONCN.2008.10.002>
- Rex, D. K., Petrini, J. L., Baron, T. H., Chak, A., Cohen, J., Deal, S. E., Hoffman, B., Jacobson, B. C., Mergener, K., Petersen, B. T., Safdi, M. A., Faigel, D. O., & Pike, I. M. (2006). Quality indicators for colonoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 63(4), S16–S28. <https://doi.org/10.1016/J.GIE.2006.02.021>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(0). <https://doi.org/10.3402/MEHD.V26.26050>
- Saffrey, M. J. (2014). Aging of the mammalian gastrointestinal tract: A complex organ system. *Age*, 36(3), 1019–1032. <https://doi.org/10.1007/S11357-013-9603-2/FIGURES/1>
- Sarshar, M., Scribano, D., Ambrosi, C., Palamara, A. T., & Masotti, A. (2020). Fecal micrnas as innovative biomarkers of intestinal diseases and effective players in hostmicrobiome interactions. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12082174>
- Schulmann, K., Pox, C., Tannapfel, A., & Schmiegel, W. (2007). The patient with multiple intestinal polyps. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 21(3), 409–426. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2006.11.003>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sheffield, K. M., Han, Y., Kuo, Y. F., Riall, T. S., & Goodwin, J. S. (2013). Potentially inappropriate screening colonoscopy in medicare patients: Variation by physician and geographic region. *JAMA Internal Medicine*, 173(7), 542–550. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.2912>
- Singh, N., Shirdel, E. A., Waldron, L., Zhang, R. H., Jurisica, I., & Comelli, E. M. (2011). The murine caecal microRNA signature depends on the presence of the endogenous microbiota. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 171–186. <https://doi.org/10.7150/IJBS.8.171>
- Sipponen, P., & Maaros, H. I. (2015). Chronic gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(6), 657. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1019918>
- Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., & Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. In *Comparative*

*Clinical Pathology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 235–239). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-0979-4>

- Sperber, A. D., Bangdiwala, S. I., Drossman, D. A., Ghoshal, U. C., Simren, M., Tack, J., Whitehead, W. E., Dumitrascu, D. L., Fang, X., Fukudo, S., Kellow, J., Okeke, E., Quigley, E. M. M., Schmulson, M., Whorwell, P., Archampong, T., Adibi, P., Andresen, V., Benninga, M. A., ... Palsson, O. S. (2021). Worldwide Prevalence and Burden of Functional Gastrointestinal Disorders, Results of Rome Foundation Global Study. *Gastroenterology*, *160*(1), 99-114.e3. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.04.014>
- Strate, L. L., Erichsen, R., Baron, J. A., Mortensen, J., Pedersen, J. K., Riis, A. H., Christensen, K., & Sørensen, H. T. (2013). Heritability and familial aggregation of diverticular disease: a population-based study of twins and siblings. *Gastroenterology*, *144*(4). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2012.12.030>
- Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. A., Sommer, S. S., & Rossi, J. J. (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, *15*(9), 1640–1651. <https://doi.org/10.1261/rna.1560209>
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6061), 1420–1424. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1213214>
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., Dore, J., & Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2574–2584. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.01982.X>
- Technologies, A. (n.d.). *Agilent Technologies Agilent Small RNA Kit Guide*.
- Thermo Fisher Scientific. (2019). *Qubit Assays | Thermo Fisher Scientific - LV*. <https://www.thermofisher.com/lv/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* *2007* *449*:7164, *449*(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006).

- An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/NATURE05414>
- Tursi, A. (2016). Diverticulosis today: Unfashionable and still under-researched. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 9(2), 213–228. <https://doi.org/10.1177/1756283X15621228>
- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamäki, T., & Siurala, M. (1996). Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(6), 546–550. <https://doi.org/10.3109/00365529609009126>
- Viennois, E., Chassaing, B., Tahsin, A., Pujada, A., Wang, L., Gewirtz, A. T., & Merlin, D. (2019). Host-derived fecal microRNAs can indicate gut microbiota healthiness and ability to induce inflammation. *Theranostics*, 9(15), 4542. <https://doi.org/10.7150/THNO.35282>
- Yan, X., Zhu, S., & Zhang, H. (2016). MiR-203 Expression in Exfoliated Cells of Tongue Coating Represents a Sensitive and Specific Biomarker of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2349453>
- Yang, X., Xie, L., Li, Y., & Wei, C. (2009). More than 9,000,000 Unique Genes in Human Gut Bacterial Community: Estimating Gene Numbers Inside a Human Body. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006074>
- Ye, Y., Zhang, L., Hu, T., Yin, J., Xu, L., Pang, Z., & Chen, W. (2021). CircRNA\_103765 acts as a proinflammatory factor via sponging miR-30 family in Crohn's disease. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80663-w>

Bakalaura darbs „Saimniekorganisma miRNS un zarnu mikrobioma mijiedarbība dažādos kolonoskopijas izmeklējumu paraugos” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Paula Rūta Celmiņa                      24.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag. biol. Laila Silamiķele                      24.05.2022.

Recenzents:                      Mag. biol. Helvijs Niedra

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 24.05.2022.

Lietvede: .....

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.                      , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: