

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

AR METFORMĪNA LIETOŠANU ASOCIĒTAS IZMAIŅAS
CILVĒKA ZARNU MIKROBIOMA SASTĀVĀ UN DNS
METILĒŠANAS PROFILOS

Maģistra darbs

Autors: Ilze Elbere

St.apl.nr.: ie12017

Darba vadītājs: Assoc. prof., Dr. biol. Jānis Kloviņš

Darba konsultante: Dr. biol. Ineta Kalniņa

Recenzents: Dr.med. Ģirts Šķenders

RĪGA 2017

SATURS

KOPSAVILKUMS	3
SUMMARY	4
SAĪSINĀJUMI	5
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Cilvēka mikrobiota un mikrobioms	9
1.2. Zarnu mikrobioms	10
1.2.1. Zarnu mikrobioma vispārīgs raksturojums	10
1.2.2. Zarnu mikrobioma kompozīcija	11
1.3. Mikrobioma paraugu ievākšanas un analīzes metodes	13
1.4. DNS epigenētiskā regulācija	16
1.5. Cukura diabēts	18
1.6. Metformīns	19
2. MATERIĀLI UN METODES	22
2.1. Materiāli	22
2.1.1. Izmantotie laboratorijas piederumi	22
2.1.2. Izmantotie reaģenti	22
2.1.3. Izmantotā aparatūra	23
2.1.4. Izmantotā programmatūra	23
2.2. Metodes	23
2.2.1. Pētījuma dizains	23
2.2.2. Bakteriālās DNS izdalīšana	25
2.2.3. DNS agarozes gēla elektroforēze	26
2.2.5. Parauga DNS koncentrācijas mērīšana	26
2.2.6. PCR 16S rRNS gēna V3 rajona fragmentu pavairošanai	27
2.2.7. PCR produkta attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm	28
2.2.8. Paraugu kvalitātes un kvantitātes novērtēšana	28
2.2.9. Sekvenēšana	28
2.2.10. Metilēšanas analīze un paraugu sagatavošana	29
2.2.11. Datu analīze	29
REZULTĀTI	31
DISKUSIJA	38
SECINĀJUMI	45
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	46
KONFERENČU TĒZES	46
PATEICĪBAS	47
LITERATŪRAS SARAKSTS	48
Pielikumi	60

KOPSAVILKUMS

Metformīns ir pirmās izvēles medikaments 2. tipa cukura diabēta ārstēšanā. Tam raksturīga variabilitāte terapijas efektivitātē un biežas blaknes. Medikamenta iedarbību var ietekmēt tādi faktori kā mijiedarbība ar zarnu mikrobiomu un gēnu ekspresijas regulācija DNS metilēšanas līmenī. Maģistra darba mērķis bija noskaidrot, kādas izmaiņas metformīns ierosina cilvēka zarnu mikrobioma kompozīcijā un leukocītu metilēšanas profilā. Darbā tika veikta *16S rRNS* amplikonu analīze 18 metformīna lietotāju fēču paraugos un DNS metilēšanas novērtēšana 12 indivīdiem. Metformīna ierosinātas izmaiņas gan zarnu mikrobiomā, gan metilēšanas profilā tika novērotas jau pirmo 24 stundu laikā, daļēji skaidrojot iespējamās blakņu cēloņus un pozitīvo efektu pamatā esošos mehānismus.

Darbs izstrādāts 06.2015. – 05.2017. Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Atslēgas vārdi: metformīns, zarnu mikrobioms, *16S rRNS*, DNS metilēšana, cukura diabēts.

SUMMARY

Metformin is a first line agent for treatment of type 2 diabetes. It has high efficacy variability and side effects are common. The effect of medicament can be influenced by such factors as interaction with gut microbiome and regulation of gene expression via DNA methylation. The aim of this work was to investigate the impact of metformin on composition of gut microbiome and methylation profile of leucocytes. Fecal samples from 18 participants were used in *16S rRNA* analysis and DNA methylation was evaluated in 12 individuals. Metformin induced changes in gut microbiome and methylation profiles were observed within the first 24 hours, thus partly explaining the possible causes for side effects and mechanisms of positive effects.

The work was carried out in the Latvian Biomedical Research and Study Centre during the period 06.2015 – 05.2017.

Key words: metformin, gut microbiome, *16S rRNA*, DNA methylation, *diabetes mellitus*.

The title of this work: “Changes in the human gut microbiome composition and DNA methylation profiles that are associated with the administration of metformin”.

SAĪSINĀJUMI

<i>16S rRNS</i>	mazās ribosomālās subvienības gēns
<i>23S rRNS</i>	lielās ribosomālās subvienības gēns
ACC	acetil- KoA karboksilāze (<i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
ALAT	aspartāta aminotransferāze
AMP	adenozīna monofosfāts
<i>ANK3</i>	ankirīns 3 (<i>ankyrin-3</i>)
<i>BACE2</i>	beta-vietā amiloīdā prekursora proteīna šķeļošais enzīms 2 (<i>beta-site APP-cleaving enzyme 2</i>)
<i>C15orf54</i>	15. hromosomas atvērtais nolasīšanas rāmis 54 (<i>chromosome 15 open reading frame 54</i>)
<i>CAMKK1</i>	kalcija/kalmodulīna atkarīgā proteīnu kināzes kināze 1 (<i>calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 1</i>)
cAMP	cikliskais adenoziņa monofosfāts (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CNS	centrālā nervu sistēma
AMPK	AMP-aktivētā proteīnkināze
ATF	adenozīna trifosfāts
bp	bāzu pāri
CBP	CREB saistošais proteīns (<i>CREB-binding protein</i>)
ChREBP	ogļhidrātu-jūtīgo elementu saistošais proteīns (<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>)
CNS	centrālā nervu sistēma
<i>cpn60</i>	čaperonīna-60 gēns
CREB	cAMP atbildes elementu saistošais proteīns (<i>cAMP response element binding protein</i>)
CRTC2	CREB regulētais transkripcijas ko-aktivētājs 2 (<i>CREB Regulated Transcription Coactivator 2</i>)
DES	No DNāzēm un pirogēniem brīvs ūdens (<i>Dnase/Pyrogen-Free Water</i>)
DNMT	DNS metiltransferāze
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
<i>EPHB1</i>	efrīna receptors B1 (<i>Ephrin Type-B Receptor 1</i>)
FDR	kļūdaino atklājumu līmenis (<i>false discovery rate</i>)
H19	garā nekodējošā RNS (<i>Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 8</i>)
HFD	diēta ar augstu tauku saturu (<i>high-fat-diet</i>)

ķMI	ķermeņa masas indekss
LMW	vielas ar zemu molekulāro masu
NMDS	neparametriskā multidimensiju mērogošana
NADH	reducēts nikotīnamīda adenīdinukleotīds
ncRNS	nekodējošās RNS (<i>non coding RNA</i>)
N/L	neitrofilu/leikocītu attiecība
MBD	metil-CpG-saistīšanās domēns (<i>methyl-CpG-binding domain</i>)
mGDP	mitohondriju glicerīn-fosfāta dehidrogenāze (<i>mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase</i>)
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MP	mikrobioma paraugs
MRCC1	mitohondriālās elpošanas ķēdes pirmais komplekss (<i>mitochondrial respiratory-chain complex I</i>)
NAFLD	nealkoholiskā taukaino aknu slimība (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)
OCT	organisko katjonu transportieris (<i>organic cation transporter</i>)
OTU	taksonomiskā vienība (<i>operational taxonomic unit</i>)
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija (<i>polymerase chain reaction</i>)
PERMANOVA	permutāciju analīze (<i>Permutational Multivariate Analysis of Variance</i>)
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
PKA	proteīnkināze A (<i>protein kinase A</i>)
<i>POFUT2</i>	proteīnu O-fukoziltransferāze 2 (<i>Protein O-Fucosyltransferase 2</i>)
PPS	proteīnu izgulsnēšanas šķīdums (<i>Protein Precipitation Solution</i>)
<i>rpoBRNS</i>	polimerāzes beta-subvienības gēns
<i>RPS21</i>	ribosomālais proteīns S21 (<i>ribosomal protein S21</i>)
SAHH	S-adenozilhomocisteīna hidrolāze
SCFA	īso ķēžu taukskābes
SIRT1	sirtuīns 1 (<i>Sirtuin 1</i>)
SREBP	Sterīna regulējošo elementu saistošais proteīns (<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>)
T1D	1. tipa cukura diabēts
T2D	2. tipa cukura diabēts
<i>TMEM161A</i>	transmembrānas proteīns 161A (<i>transmembrane protein 161A</i>)
TSS	transkripcijas sākuma vieta (<i>transcription starting site</i>)
WBC	baltās asins šūnas (<i>white blood cells</i>)

IEVADS

Antidiabētiskais medikaments metformīns ir viens no pasaulē visplašāk izmantotajiem līdzekļiem 2. tipa cukura diabēta (T2D) ārstēšanā (Bailey and Turner 1996), kam raksturīgas vairākas priekšrocības: zems hipoglikēmijas risks (0-21%), augsta efektivitāte, neitralitāte vai pazeminoša ietekme attiecībā uz ķermeņa svaru, kardioprotektīvs efekts un tam ir relatīvi zemas izmaksas (Bolen *et al.* 2007, Fung *et al.* 2015, Inzucchi *et al.* 2015). Tomēr vairāk nekā 30% pacientu netiek sasniegts terapeitiskais mērķis un līdz pat 25% pacientu novērojami gastrointestināli blakusefekti un aptuveni 5% pārtrauc terapiju medikamenta nepanesamības dēļ (Kirpichnikov *et al.* 2002, McCreight *et al.* 2016).

Mūsdienās arvien vairāk tiek atzīta un pētīta cilvēka zarnu mikrobioma loma saistībā ar zarnās dzīvojošo mikroorganismu iespējamo līdzdalību medikamentu uzņemšanas procesā, metabolismā, efektivitātē un blakņu izraisīšanā vai novēršanā (David *et al.* 2014, Enright *et al.* 2016, Saad *et al.* 2012). Tiek uzskatīts, ka šāda mijiedarbība vismaz daļēji izskaidro metformīna terapeitiskos efektus.

Tā piemēram, ievadot metformīnu orāli ir novērojams izteiktāks uzlabojums glikozes metabolismā organismā nekā ievadot medikamentu intravenozi (Bonora *et al.* 1984). Tāpat medikamenta formām ar kavētu absorbciju, kas tiek atbrīvotas tikai tievo zarnu distālajā daļā, un līdz ar to ir ar zemāku biopieejamību (līdz pat 50%), glikozes pazeminošā iedarbība ir līdzvērtīga vai pat augstāka par tūlītējas iedarbības metformīna efektu (Buse *et al.* 2016, DeFronzo *et al.* 2016). Metformīna un zarnu mikrobioma metagenomikas pētījumi parāda terapijas laikā paaugstinātu labvēlīgās, īso ķēžu taukskābes (SCFA) producējošās *Akkermasia* ģints, kā arī oportūnistisko patogēnu *Escherichia-Shigella* spp. pieaugumu (Forslund *et al.* 2015, Wu *et al.* 2017), kas apstiprina zarnu trakta un tajā esošā mikrobioma lomu metformīna darbībā un novērotajos efektos.

Tāpat ir parādīta DNS metilēšanas ietekme uz dažādu medikamentu efektivitāti un toleranci, papildinot līdz šim zināmos ģenētiskos farmakodinamiku regulējošos faktoros (Tang *et al.* 2014). Metformīnam ir raksturoti vairāki molekulārie mērķi, tomēr aprakstītie mehānismi nesniedz pamatojumu visiem zināmajiem terapijas efektiem, kā arī esošie dati par ģenētisko variantu ietekmi nepilnīgi izskaidro izvirzītās asociācijas (Pollastro *et al.* 2015). Iespējams, daļa no šiem efektiem varētu tikt kontrolēti epigēnētiskā līmenī.

Iepriekšminētie faktori norāda, ka ir būtiski pētīt metformīna mijiedarbību ar zarnu mikrobioma pārstāvjiem un iespējamo saistību starp izmaiņām mikrobioma kompozīcijā un novērotajām blaknēm, kā arī līdz šim vēl ļoti maz raksturoto ietekmi uz DNS metilēšanu.

Darba mērķis: Noskaidrot, kā antidiabētiskais medikaments metformīns mijiedarbojas ar cilvēka zarnu mikrobiomu un ietekmē metilācijas profilus baltajās asins šūnās.

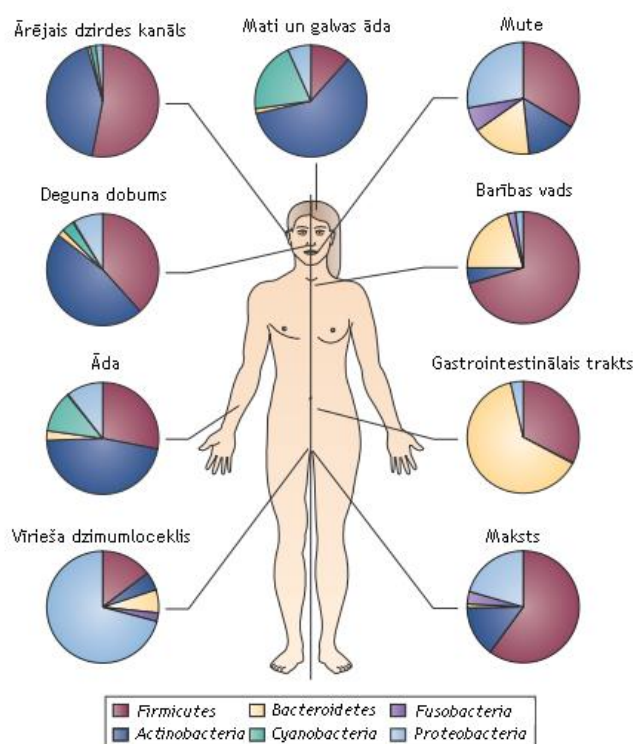
Izvirzītā darba mērķa sasniegšanai nepieciešams izpildīt šādus uzdevumus:

- Raksturot un salīdzināt pētījuma dalībnieku zarnu mikrobiomu;
- Analizēt potenciālās metformīna izraisītās izmaiņas zarnu mikrobioma kompozīcijā un daudzveidībā;
- Novērtēt iespējamo saistību starp novērotajām izmaiņām zarnu mikrobiomā un metformīna izraisītajām blaknēm;
- Noskaidrot iespējamās metformīna ierosinātās izmaiņas balto asins šūnu metilēšanas profilos.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cilvēka mikrobiota un mikrobioms

Cilvēka organisms ir mājvieta plašam lokam mikrobu (baktērijām, arhejiem, vīrusiem un arī eikariotiem, kā piemēram, sēnēm), kuri apdzīvo gan tā ādu, gan gļotādas. Ar cilvēku cieši saistīto mikroorganismu šūnu skaits desmitkārtīgi pārsniedz paša cilvēka šūnu daudzumu. Lielākā daļa no šiem mikroorganismiem ir komensāļi un simbionti (Hawkins and O'Doherty 2011, Tralau *et al.* 2014, Turnbaugh *et al.* 2007). Šie mikroorganismi dzīvo vidē un apstākļos, kas raksturīgi tieši cilvēka organismam, tādējādi veidojot specifisku, katram indivīdam atšķirīgu kopieni, kas tiek dēvēta par cilvēka mikrobiotu (1. attēls). Viss šajā kopienā ietvertais ģenētiskais materiāls veido cilvēka mikrobiomu. Mikrobioma jēdziens* galvenokārt tiek lietots kā daļējs sinonīms mikrobiotai, šajā gadījumā definējot konkrētajā lokalizācijā esošo mikroorganismu un to gēnu kopumu (Miller B. F. and Keane C. B 2005, Oxford University Press 2014, The Human Microbiome Project Consortium 2012).



1. attēls. Veselam cilvēkam raksturīgā mikrobioma kompozīcija dažādos ķermeņa apvidos, raksturojot sešu dominējošo baktēriju tipu relatīvo sastopamību katrā no ķermeņa apvidiem (Spor *et al.* 2011).

Figure 1. Microbial community composition at different body locations in a healthy human, revealed by describing the relative abundances of the six dominant bacterial phyla in each of the different body sites (Spor *et al.* 2011).

* Turpmāk tekstā ar jēdzienu „mikrobioms” tiks apzīmēta mikrobiota ar tajā esošo gēnu kopumu.

Cilvēka mikrobioms tiek iedalīts četrās galvenajās grupās atkarībā no mikroorganismu lokalizācijas: (1) āda, (2) mute un deguns, (3) zarnas un (4) maksts (The Human Microbiome Project Consortium 2012). Cilvēka mikrobiomam tiek izšķirti arī elpošanas trakta un konjunktīvas apvidi, kā arī no zarnu apvidus reizēm tiek sīkāk nodalīts kuņģis. Mikrobioma kompozīcija tiek pētīta arī tādās lokalizācijās kā ārējais dzirdes kanāls, galvas āda, barības vads, vīrieša dzimumloceklis u.c. (1. attēls) (Anonymous 2014, Spor *et al.* 2011).

Kopumā cilvēka mikrobioms ir veidots no relatīvi nošķirtām mikroorganismu ekosistēmām, kurām raksturīga liela variabilitāte (Ursell *et al.* 2012). Līdz šim zināms, ka vismazākā mikroorganismu daudzveidība ir tieši uz ādas, taču vislielākā ir zarnās. Ādas mikrobiomu veido dažas mikroorganismu ģintis, piemēram, *Propionibacterium* un *Malassezia* (Grice and Segre 2013). Deguna dobumā to skaits ir nedaudz lielāks, tur novērojams liels tādu ģinšu īpatsvars, kuras pieder pie *Staphylococcaceae* dzimtas (Bassis *et al.* 2014). Mutes dobumā sastopamo baktēriju ģinšu skaits jau sasniedz vairākus simtus (dominējošā ģints ir *Streptococcus*) ar būtiskām kompozīcijas atšķirībām siekalās, uz mēles, uz zobiem un citās lokalizācijās. Zarnās atrodamas vairāk nekā 500 mikroorganismu ģintis. Uz doto brīdi tiek pieņemts, ka cilvēka zarnu traktā dzīvo aptuveni 40000 dažādu baktēriju sugu, kas veido tā mikrobiomu (Eckburg *et al.* 2005, Guarner and Malagelada 2003, Morgan and Huttenhower 2012, The Human Microbiome Project Consortium 2012). Neskatoties uz lielo daudzveidību, līdz šim visvairāk izpētītais ir tieši zarnu mikrobioms (Guarner and Malagelada 2003).

1.2. Zarnu mikrobioms

1.2.1. Zarnu mikrobioma vispārīgs raksturojums

Zarnu mikrobioma pārstāvji veic vairākas būtiskas funkcijas cilvēka organismā. Tie palīdz pārstrādāt uzņemto ēdienu (veicot tādu produktu un savienojumu fermentāciju un šķelšanu, ko cilvēka organisma enzīmi nespēj veikt), uzturēt cilvēka organisma imūno sistēmu, kā arī iesaistās epitēlija šūnu augšanas un diferencēšanās procesos. Zarnu mikrobiomam ir būtiska loma metabolās homeostāzes uzturēšanā, sintezējot īso ķēžu taukskābes, kas var tālāk kalpot kā metabolie substrāti saimniekorganismam (Guarner and Malagelada 2003, Tralau *et al.* 2014). Zarnās esošie mikroorganismi producē arī vairākus cilvēka organismam svarīgus vitamīnus, piemēram, K un B12, kā arī folijskābi. Tie iesaistās dažādu kancerogēnu savienojumu, kā piemēram, heterociklisko amīnu, pārveidošanā un neitralizēšanā (Khachatryan *et al.* 2008, Lunn *et al.* 2007). Pēdējos gados ir arvien vairāk tiek pētīta arī zarnu mikrobioma mijiedarbība ar centrālo nervu sistēmu (CNS) jeb zarnu-smadzeņu ass (*gut-brain axis*). Šī divvirziena saziņa tiek nodrošināta ar neirāliem, endokrīniem, imūniem un humorāliem

signāliem (Carabotti *et al.* 2015). Vairāki pētījumi asociē zarnu mikrobioma disbiozi ar dažādām CNS slimībām, piemēram, autismu, depresiju un citām (Mayer *et al.* 2014).

To, kāda būs mikrobioma struktūra un to raksturojošā variabilitāte laikā, nosaka tādi faktori kā augļa dzemdību veids, ģeogrāfiskā izcelsme, cilvēka genotips, diēta, vecums, stresa līmenis, kā arī antibiotiku un probiotiķu lietošana (Backhed *et al.* 2012). Līdz ar to zarnu mikrobioma kompozīcijā novērojamas izmaiņas ne tikai laika gaitā, bet arī krasas atšķirības starp indivīdiem (Eckburg *et al.* 2005).

1.2.2. Zarnu mikrobioma kompozīcija

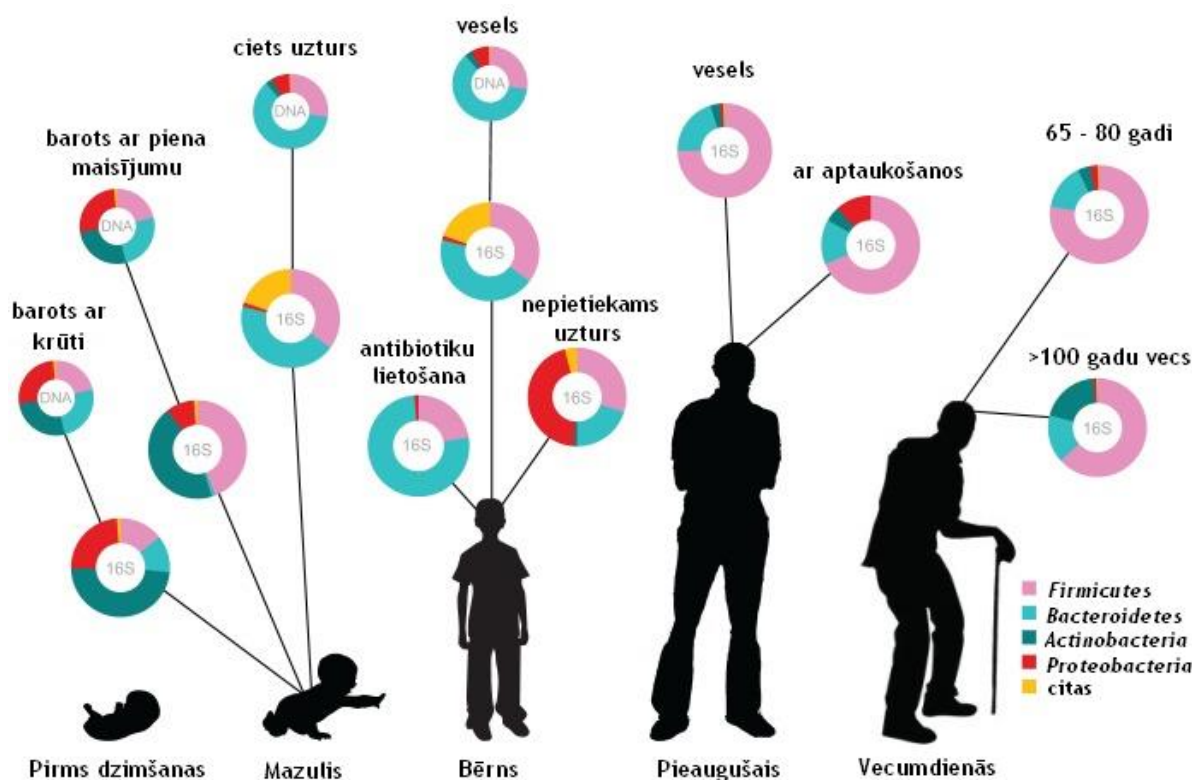
Mikrobioms sāk veidoties līdz ar piedzimšanas brīdi. Zīdaiņiem, kuri dzimuši dabiskās dzemdībās, jau pirmajās 20 minūtēs zarnu mikrobioms līdzinās tam, kāds ir mātes makstī, taču tiem, kas dzimuši ar ķeizargrieziena palīdzību, tas sastāv no mikroorganismiem, kas raksturīgi mātes ādai un dzemdību telpai (Dominguez-Bello *et al.* 2010). Zarnu mikrobioms visstraujāk mainās jaundzimušā pirmajā dzīves gadā, noritot uztura un gastrointestinālā trakta pārmaiņām (Palmer *et al.* 2007). Līdz pat aptuveni 2 – 3 gadu vecumam bērna zarnu mikrobiomu raksturo zema sugu dažādība un augsts svārstību līmenis tieši baktēriju populācijās (Bergstrom *et al.* 2014). Šajā vecumā galvenie zarnu mikrobioma pārstāvji ir no *Bifidobacterium* ģints. Funkcionāli lielā skaitā novērojama tādu baktēriju klātbūtne, kuras ir iesaistītas folāta biosintēzē (Yatsunenko *et al.* 2012).

Kā galvenie vesela, pieauguša cilvēka mikrobioma pārstāvji tiek izdalīti divi baktēriju tipi – *Firmicutes* un *Bacteroidetes*. To daudzums un savstarpējā attiecība tiek asociēti ar saimniekorganisma fenotipu. Piemēram, samazināta *Bacteroidetes* klātbūtne un paaugstināts *Firmicutes* daudzums zarnu mikrobiomā ir konstatēts indivīdiem ar aptaukošanos (Ley *et al.* 2006, Ursell *et al.* 2012). Pie bieži sastopamiem baktēriju tipiem, kuri gan veido nelielu īpatsvaru no kopējā mikrobioma, tiek pieskaitīti *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* un *Verrucomicrobia* (Eckburg *et al.* 2005, Guarino *et al.* 2013). Tāpat cilvēka zarnu mikrobiomu veido arī metanogēnās arhebaktērijas (galvenokārt *Methanobrevibacter smithii*), eikarioti (galvenokārt raugi) un vīrusi (galvenokārt fāgi) (Lozupone *et al.* 2012).

Jāņem vērā, ka strauji izmainīta ierastā diēta var būtiski izmainīt mikrobioma sastāvu (atšķirība novērojama aptuveni vienas līdz trīs dienu laikā pēc jaunās diētas uzsākšanas). Piemēram, ar šķiedrvielām bagātas diētas uzsākšana jau nākamajā dienā palielina tādu baktēriju ģinšu kā *Bifidobacteria* un *Roseburia* īpatsvaru kopējā mikrobiomā. Ir zināms arī tas, ka diēta, kas ietver daudz dzīvnieku valsts produktu, tiek saistīta ar žults-tolerantu baktēriju ģinšu skaita pieaugumu, kā piemēram *Alistipes*, *Bilophila* un *Bacteroides*, bet samazinātu tādu *Firmicutes* tipa pārstāvju daudzumu, kas ir iesaistīti augu valsts polisaharīdu metabolizācijā (David *et al.*

2014). Tāpat ir novērots, ka palielināts citrusaugļu daudzums uzturā pozitīvi korelē ar *Clostridiales* kārtas baktēriju īpatsvaru. Šādas īslaicīgas izmaiņas parasti gan ir atgriezeniskas un neatstāj ietekmi uz veselības stāvokli (David *et al.* 2014, Sonnenburg *et al.* 2010).

Arī novecošana ir viens no faktoriem, ar ko tiek asociētas izmaiņas zarnu mikrobioma kompozīcijā. Līdz šim gan nav atklātas būtiskas atšķirības mikrobioma sastāvā pieaugušiem cilvēkiem starp ~20 – 50 gadu un ~70 – 80 gadu vecuma grupām. Salīdzinot pieauguša cilvēka mikrobiomu ar indivīdiem, kuru vecums pārsniedz 100 gadus, pēc 100 gadu vecuma ir novērojamas *Firmicutes* tipa pārstāvju savstarpējā īpatsvara izmaiņas, kā arī fakultatīvo anaerobu, īpaši oportūnistisko patogēnu, īpatsvara pieaugums. Ņemot vērā, ka mikrobioma sastāvam ir būtiska ietekme uz imūnās sistēmas darbību, šīs izmaiņas vecumdienās varētu būt saistītas ar indivīdu augsto jutību pret infekcijām un dažādām citām saslimšanām (Biagi *et al.* 2010). Vispārējs zarnu mikrobioma raksturojums un tai raksturīgā dinamika, sākot ar piedzimšanas brīdi līdz pat novecošanai, ir attēloti 2. attēlā (Ottman *et al.* 2012).



2. attēls. Vispārējs kopsavilkums par cilvēka mikrobiomā dominējošo baktēriju tipu relatīvo īpatsvaru atšķirīgos dzīves etapos un dažādu ārējo faktoru ietekmē. Dati tika iegūti, izmantojot 16S rRNS gēna sekvenēšanu vai arī metagenomikas metodes (Ottman *et al.* 2012).

Figure 2. A global overview of the relative abundance of key phyla of the human microbiome composition in different stages of life in presence of various external factors. Measured by either 16S rRNA or metagenomic approaches (DNA) (Ottman *et al.* 2012).

Neskatoties uz to, ka pastāv liela interindividuālā cilvēka zarnu mikrobioma kompozīcijas dažādība, vairāki pētījumi ir centušies definēt centrālo (*core*) mikrobiomu, kas būtu līdzīgs dažādās populācijās. Veicot metagenomikas pētījumus pieaugušiem Eiropā dzīvojošiem indivīdiem 2011. gadā pirmo reizi definēja trīs izteiktas mikrobioma kompozīcijas grupas jeb enterotipus, kuri nav saistīti ar dzimumu, vecumu, ķermeņa masas indeksu (ĶMI), nacionālo piederību vai ģeogrāfisko izcelsmi. Enterotipi tiek izšķirti pēc īpatsvara variācijām trīs baktēriju ģintīs: (1) *Bacteroides*, (2) *Prevotella* un (3) *Ruminococcus* (Arumugam *et al.* 2011). Vēlāk šie rezultāti tika apstiprināti pētījumos arī citās populācijās (ASV, Japāna, Ķīna, Taivāna) (Guarino *et al.* 2013, Liang *et al.* 2017, Qin *et al.* 2012). Veiktajos pētījumos ir atrasta saistība ar enterotipiem un ilgtermiņa diētu pieaugušajos. *Bacteroides* enterotips tiek asociēts ar proteīniem un taukiem bagātu diētu, turpretī *Prevotella* enterotips ir raksturīgs indivīdiem, kuru uzturu pārsvarā veido cukuri un citi ogļhidrāti. Trešā enterotipa definīcija un loma joprojām ir neskaidra (Yatsunenکو *et al.* 2012, Wu *et al.* 2011). Mikrobioma sastāvs bērniem nav pielīdzināms kādam konkrētam enterotipam, kas skaidrojams ar to, ka bērnu mikrobioms vēl nav nostabilizējies un ir mainīgs (Arumugam *et al.* 2011). Sākotnēji tika plānots, ka enterotipu definēšana varētu sniegt priekšrocības dažādu ar slimībām saistītu risku faktoru vai biomarkieru ātrākai, efektīvākai novērtēšanai un diagnostikai (Arumugam *et al.* 2011, Fan *et al.* 2017, Roager *et al.* 2014), tomēr viens no jaunākajiem pētījumiem ir prezentējis pierādījumus, ka šis iedalījums varētu būt konkrēto taksonomisko grupu lielā īpatsvara radīts artefakts (Gorvitovskaia *et al.* 2016).

Novirzes no normāla cilvēkam raksturīgā zarnu mikrobioma jeb disbioze tiek saistīta ar tādām saslimšanām kā aptaukošanās, metabolois sindroms, 1.tipa cukura diabēts (T1D), 2. tipa cukura diabēts (T2D), kairinātās zarnas sindroms, astma, celiakija un dažādas alerģijas. Tāpat ir zināms, ka konkrētas izmaiņas mikrobioma sastāvā var padarīt cilvēku uzņēmīgāku pret infekcijām. Piemēram, antibiotiku radītās izmaiņas, kas raksturojamas kā zarnu mikrobioma ekosistēmas līdzsvara izjaukšana, paaugstina risku saslimt ar infekcijām, ko rada oportūnistiskie patogēni (piemēram, *Clostridium difficile*) (Backhed *et al.* 2012, Lozupone *et al.* 2012, Shreiner *et al.* 2015).

1.3. Mikrobioma paraugu ievākšanas un analīzes metodes

Mikrobioma analīzes veikšanai, sākotnēji jāveic atbilstošu paraugu ievākšana. Zarnu mikrobioma gadījumā var tikt ievākti fēču paraugi vai arī veiktas zarnu biopsijas. Fēču paraugu iegūšana ir neinvazīva, taču tajos tiks reprezentēts galvenokārt ar fēcēm asociētais lūmena mikrobioms, kas atšķiras no ar zarnu sienīņu audiem un gļotādu saistīto mikrobiomu. Biopsijas paraugus ir grūtāk iegūt, turklāt, pacientiem pirms biopsijas veikšanas ir jālieto caurejas

līdzekļi, kas var būtiski ietekmēt iegūtos rezultātus (Tyler *et al.* 2014). Tāpat mikrobioma kompozīcija var atšķirties arī atkarībā no biopsijas iegūšanas vietas zarnu traktā, kur baktērijām raksturīgs komplicēts bioģeogrāfiskais izvietojums (Donaldson *et al.* 2016).

Mikrobioma paraugu analīzei tiek izšķirtas divas galvenās metodiskās pieejas: kultūras-atkarīgas un kultūras-neatkarīgas metodes. Pirmajā gadījumā, pirms tālāko pētījumu veikšanas, izdalītie mikroorganismi tiek audzēti kultūrās laboratorijas apstākļos. Pielietojot kultūras-neatkarīgās metodes, tiek analizēta mikrobiālā DNS, kas iegūta tieši no interesējošā parauga. Mikrobioma pētījumu pirmsākumos izmantoja kultūras-atkarīgās metodes. Tomēr, ir jāņem vērā, ka lielāko daļu mikrobiomu veidojošo organismu nav iespējams kultivēt laboratorijas apstākļos. Īpaši grūti izaudzēt ir tieši obligāti-anaerobās baktērijas un citas, kurām raksturīgas unikālas vai vēl nenoskaidrotas prasības uz augšanas vidi. Šis trūkums veicināja kultūras-neatkarīgo metožu attīstību (Morgan and Huttenhower 2012, Pace *et al.* 1986, Smith *et al.* 2014).

Kultūras-neatkarīgās metodes var iedalīt divās apakšgrupās: (1) mērķtiecīgi izvēlētu amplikonu pētījumi un (2) metagenomikas pētījumi. Salīdzinot abas šīs grupas, zināms, ka amplikonu pētījumi, izmantojot nelielu, bet specifisku informācijas daudzumu, iegūst priekšstatu par mikrobioma sastāvu un daudzveidību. Metagenomika sniedz daudzveidīgākus un informatīvākus datus gan par mikrobioma pārstāvju iespējamajām funkcijām, gan taksonomisko sastāvu, taču tās galvenais trūkums ir nepilnīgās un kļūdas saturošās datu bāzes. Īpaši sarežģīti ir iegūt precīzus rezultātus par taksonomiskajām grupām ar augstu mainību (Kuczynski *et al.* 2011, Teeling and Glockner 2012).

Mērķtiecīgi izvēlētu amplikonu pētījumos mikrobioma daudzveidības analīzei tiek izmantoti dažādi filoģenētiski informatīvi marķieri. Populārākais no tiem ir mazās ribosomālās subvienības (16S rRNS) gēns, kurš ir sastopams visos prokariotiskos organismos. Tā garums ir aptuveni 1500 bāzu pāri (bp), variējot starp dažādām baktēriju ģintīm. Galvenā rRNS gēnu priekšrocība ir tā, ka tie ir visos dzīvajos organismos. Ribosomālie gēni satur gan salīdzinoši konservatīvus reģionus (piemēroti plaša spektra universālu polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) oligonukleotīdu izveidei), gan reģionus ar strauju mainību (dod iespēju klasificēt organismus smalkākos taksonomiskajos līmeņos) (Kuczynski *et al.* 2011, Pei *et al.* 2010, Weisburg *et al.* 1991). Pirmo reizi 16S rRNS gēns baktēriju taksonomisko vienību identificēšanai tika izmantots 1977. gadā (Woese and Fox 1977). Pielietojot šo gēnu mikrobioma analīzē, ir jāizprot un jāņem vērā gan tā priekšrocības attiecībā pret cita veida marķieriem, gan arī trūkumi, kas apkopoti 1. tabulā (Tyler *et al.* 2014).

Priekšrocības un trūkumi 16S rRNS gēna izmantošanai par marķieri baktēriju filoģenētiskās un taksonomiskās piederības noteikšanai (Tyler *et al.* 2014).

Table 1

Advantages and disadvantages of using 16S rRNA gene-based analyses in construction of bacterial phylogenies and taxonomic assignment (Tyler *et al.* 2014).

Priekšrocības	Trūkumi
Ir atrodams gan baktērijās, gan arhejos.	Lielā daļā organismu tas ir vairākās kopijās, līdz ar to analizējot datus var tikt pārvērtēta dažu populāciju bagātība.
Satur izteikti konservatīvus reģionus, kas ir piemēroti oligonukleotīdu izveidei.	Nelielam skaitam organismu šī gēna konservatīvie reģioni ir mainīgi, tas var traucēt oligonukleotīdu hibridizācijai.
Satur strauji mainīgus variablos reģionus, kuri ir izmantojami kā unikāli identifikatori.	Variablie reģioni ne vienmēr spēj nodrošināt organismu klasifikāciju līdz sugas līmenim
Ir pieejamas vairākas datubāzes, kas nodrošina iespēju salīdzināt sekvenču un noteikt organismu taksonomisko klasifikāciju.	Vairākas datubāzes satur kļūdainas vai nepilnīgas sekvenču.
Ir pieejami labi izpētīti oligonukleotīdu pāri, ar kuriem ir iespējama amplifikāciju lielākajai daļai organismu. Ar augstu specifiku ir izveidoti oligonukleotīdu pāri īpaši baktērijām.	Tie var būt nepietiekami specifiski dažām baktēriju grupām, tādējādi radot neprecizitātes mikrobioma sastāva novērtējumā.

16S rRNS gēns satur deviņus variablos reģionus (V1-V9) (3. attēls). V2 un V3 tiek uzskatīti par vispiemērotākajiem, lai kvalitatīvi varētu klasificēt lielāko daļu baktēriju līdz ģints līmenim, izņemot tuvradnieciskas *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas. Tāpat V1 un V6 ir pieņemti kā pietiekami informatīvi reģioni baktēriju klasifikācijai. V4, V5, V7 un V8 reģioni nav pietiekami specifiski, lai izšķirtu ģintis un sugas. V9 reģions šajā kontekstā ir maz pētīts (Chakravorty *et al.* 2007).

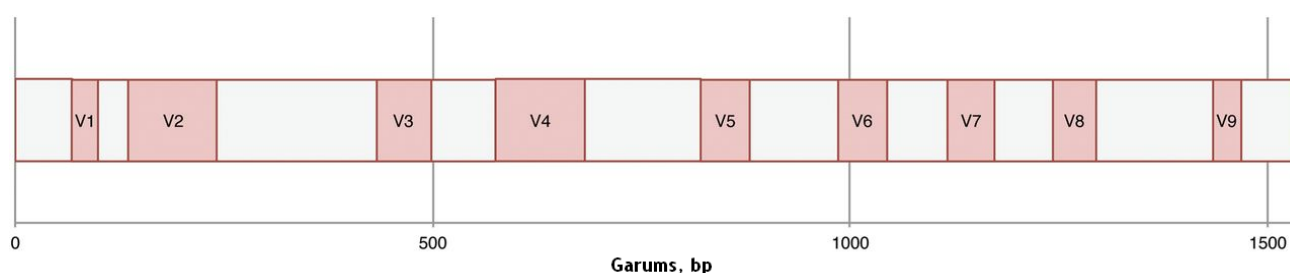
3. attēls. *E.coli* 16S rRNS gēna struktūra (Cox *et al.* 2013).

Figure 3. Structure of the *E.coli* 16S rRNA gene (Cox *et al.* 2013).

Mikrobioma raksturošanai un analīzei tiek izmantoti arī tādi marķieri kā lielās ribosomālās subvienības 23S rRNS gēns, čaperonīns-60 (*cpn60*) un RNS polimerāzes beta-subvienību kodējošais gēns (*rpoB*) (Hunt *et al.* 2006, Mollet *et al.* 1997, Schellenberg *et*

al. 2009). Šie marķieri tiek lietoti, lai kompensētu 16S rRNS gēna izmantošanai raksturīgos trūkumus (1.tabula) taksonomiskās piederības noteikšanā, tomēr tiem ir ievērojami mazāks pieejamo referenču apjoms datubāzēs (Tyler *et al.* 2014). Papildus arvien vairāk tiek analizēta arī eikariotisko mikrobioma pārstāvju loma, kuras novērtēšanai par filoģenētisko marķieri tiek izmantots mazās ribosomālās subvienības 18S rRNS gēns (Dollive *et al.* 2012).

Metagenomikas pētījumi sniedz ieskatu kopējā mikroorganismu ģenētiskajā materiālā, kas atrodami mikrobiomā. Šī pieeja tiek dēvēta arī par funkcionālo profilēšanas pieeju, jo iegūtie dati ļauj analizēt iespējamus metabolos ceļus. Metagenomikas pirmsākumos tika sekvenēti kloni, kuri saturēja liela izmēra bibliotēkas kā insertus (piemēram, baktēriju mākslīgās hromosomas). Šobrīd tiek izmantota lielapjoma paralēlā randomizētā (*shotgun*) sekvenēšana, kura ir lētāka un ātrāka (Gilbert and Dupont 2011, Kuczynski *et al.* 2011). Lai iegūtu vairāk informatīvus datus, metagenomika bieži vien tiek kombinēta ar tādām metodēm kā proteomika un metabolomika (Morgan and Huttenhower 2012).

Būtiski minēt, ka mūsdienās strauji pieaugošā nepieciešamība radīt jaunus probiotiskus liek atgriezties pie kultūras-atkarīgām metodēm kā neaizstājama instrumenta šāda veida pētījumos. Protams, šo nozari ir veicinājusi straujā kultūras-neatkarīgo metožu attīstība, kas devusi iespēju identificēt daudzus potenciālos mikrobioma pārstāvjus, kuri tiek asociēti ar uzlabotu veselību (Wade 2017).

1.4. DNS epigēnētiskā regulācija

Jēdzienu “epigēnētika” pirmo reizi 1942. gadā ieviesa Konrāds Vadingtons (*Conrad Waddington*), lai raksturotu mijiedarbības starp gēniem un to produktiem, kuras nodrošina fenotipa realizēšanos (Waddington 1942). Laika gaitā šī jēdziena nozīme ir mainījusies un kļuvusi precīzāka, mūsdienās definējot izmaiņas gēna funkcijās, kas ir mitotiski un/vai meiotiski pārmantojamas un nav saistītas ar izmaiņām DNS sekvencē (Wu and Morris 2001). Kā būtisks faktors epigēnētiskajām izmaiņām tiek uzvērts to atgriezeniskums (Schuebel *et al.* 2016).

Tiek izšķirti divi galvenie epigēnētiskās regulācijas veidi: histonu modifikācijas un DNS metilēšana. Histonu pēc-translācijas modifikācijas ietver tādas dažādu aminoskābju (serīna, lizīna, arginīna) kovalentās modifikācijas kā fosforilācija, ubikvitinēšana, acetilācija, metilēšana un citas. Izšķir histonus, kuri veido oktamēru, kas ir nukleosomas jeb DNS un histonu kompleksa pamatā, – H2A, H2B, H3 un H4 – un savienotājhistonu jeb linkeru H1, kas piesaistās pie DNS starp divām nukleosomām (Dupont *et al.* 2009, Kouzarides 2007). Modifikācijas ir sastopamas visiem histoniem, galvenokārt N-terminālajā galā (Bannister and Kouzarides 2011). Tiek uzskatīts, ka dažādās histonu modifikāciju kombinācijas korelē ar

atšķirībām transkripcijas statusā. Šī saistība tiek dēvēta par “Histonu koda hipotēzi”, kas kopumā cenšas raksturot tādu detaļu ietekmi kā nukleosomas relatīvais attālums no gēna transkripcijas sākuma vietas (TSS), kā arī modifikāciju lokalizācijas, veida un apmēru kombinācija (Dupont *et al.* 2009, Strahl and Allis 2000). Histonu modifikācijām ir būtiska nozīme transkripcijas regulācijā, DNS reparācijā (Huertas *et al.* 2009), replikācijā, alternatīvajā splicingā un hromosomu kondensācijā (Kouzarides 2007, Luco *et al.* 2010).

DNS metilēšana ir kovalenta metilgrupas pievienošana pie sekvencē esošā citozīna C-5 (gredzena piektā oglekļa atoma) pozīcijā, ko veic specifisku enzīmu saime - DNS metiltransferāzes (DNMT). Zīdītājiem vairāk nekā 98% no šīm modifikācijām notiek tieši sekvencēs, kur citozīnam (C) seko guanīns (G), jeb CpG dinukleotīdos. Genoma reģioni, kuros šie dinukleotīdi ir bieži sastopami, tiek dēvēti par CpG saliņām (Bird 1980, Hamilton 2011). Papildus ir zināms, ka embrionālajās cilmes šūnās DNS metilēšana aptuveni 25% gadījumu novērojama ne-CpG sekvencēs, nodrošinot šīm šūnām specifisku gēnu regulāciju embrionālās attīstības laikā (Lister *et al.* 2009). Kopumā CpG saliņu metilēšana tiek asociēta ar gēnu ekspresijas inhibēšanu. DNS metilēšanai ir būtiska loma arī genomiskajā imprintingā, kad vienas no vecākalēļu hipermetilācija rezultējas monoalēliskā ekspresijā (Kacem and Feil 2009). Līdzīgi mehānismi raksturīgi arī X-hromosomas inaktivācijā (Reik and Lewis 2005).

DNS metilēšanas inhibējošā ietekme uz gēnu ekspresiju realizējas ar vairāku mehānismu starpniecību. Tā var tieši inhibēt transkripciju kavējot tai nepieciešamo DNS saistošo proteīnu piesaisti mērķsekvencēm. Metilēta DNS var veicināt metil-CpG-saistīšanās domēnu (MBD) proteīnu piesaisti. MBD saimes pārstāvji tālāk piesaista histonus modificējošos un hromatīnu remodelējošos kompleksus (Esteller 2007, Lopez-Serra and Esteller 2008). Retākos gadījumos ir zināma pozitīva DNS metilēšanas korelācija ar transkripcijas aktivāciju. Tas parasti notiek gadījumos, kad metilēts ir nevis gēna promotera reģions, bet gan pats gēns, un šī asociācija ir novērota organismā plaši (dažādos audos) ekspresētiem gēniem (Hellman and Chess 2007). Šobrīd tiek uzskatīts, ka iemesls tam ir DNS metilēšanas radīta paaugstināta elongācijas efektivitāte un kļūdainas transkripcijas iniciācijas, kas iespējama promoterim līdzīgās sekvencēs pašā gēnā, kavēšana (Zilberman *et al.* 2007).

Jaunākajā literatūrā tiek diskutēta arī nukleosomu pozicionēšanas nozīme attiecībā pret TSS un dažādu transkripcijas regulācijā būtisku reģionu novietojumu uz tām (Schones *et al.* 2008), kā arī arvien vairāk tiek pētītas nekodējošās RNS (ncRNS) un mehānismi ar kādiem tās iesaistās epiģenētiskajā regulācijā (Zaratiegui *et al.* 2007). Būtiski ir ņemt vērā visu dažādo epiģenētisko modifikāciju ietekmi, jo gala rezultāts uz gēnu darbību rodas to mijiedarbībā.

1.5. Cukura diabēts

Cukura diabēts ir metabolo slimību grupa, kuras galvenā pazīme ir hiperglikēmija jeb paaugstināts cukura (glikozes) līmenis asinīs. Pacienti tiek diagnosticēti cukura diabēts, ja glikozes līmenis asinīs tukšā dūšā ir virs 7 mmol/l, taču tas var pārsniegt pat 15 – 20 mmol/l. Normāls glikozes līmenis asinīs tukšā dūšā, vismaz astoņas stundas bez uztura uzņemšanas, ir 3,9 – 5,5 mmol/l (Cleveland Clinic 2014). Cukura diabēts tiek saistīts ar samazinātu dzīvildzi un dzīves kvalitāti, kā arī ar mikrovaskulārām, piemēram, retinopātiju, nefropātiju, neiropātiju, un makrovaskulārām, piemēram, sirds išēmiju, trieku, komplikācijām. (American Diabetes Association 2008, Goldenberg and Punthakee 2013, World Health Organization 2006).

Uz doto brīdi visā pasaulē ar diabētu slimo 415 miljoni cilvēku jeb 9% no kopējās populācijas. Latvijā 2015. gadā bija 86 941 pacients ar cukura diabētu jeb 4% no Latvijas populācijas, no kuriem 6 271 bija no jauna diagnosticēti pacienti (International Diabetes Federation 2017, Slimību profilakses un kontroles centrs 2016). Cukura diabētam ir vairākas formas, no kurām zināmākās ir 1. tipa (T1D) un 2. tipa (T2D) cukura diabēts, taču izšķir arī citus specifiskus tipus (American Diabetes Association 2008).

T1D veido 5 – 10 % no kopējā saslimšanas gadījumu skaita ar cukura diabētu. To izraisa šūnu vadīta autoimūna aizkuņģa dziedzera β -šūnu iznīcināšana, kā rezultātā organismā rodas absolūts insulīna trūkums. Tas, cik strauji noris β -šūnu iznīcināšana, galvenokārt atkarīgs no vecuma, zīdaiņiem un maziem bērniem tas notiek straujāk nekā pieaugušajiem. Kā iemesls šādai autoimūnai β -šūnu bojāejai var būt gan dažādi ģenētiskie faktori, gan ārējās vides apstākļi. T1D parasti tiek diagnosticēti pacientiem, kuri ir jaunāki par 35 gadiem (American Diabetes Association 2008, Landes Bioscience 2013).

Lielākā daļa no cukura diabēta gadījumiem jeb 90 – 95 % ir T2D. Tam ir raksturīga nepietiekama insulīna sekrēcija un insulīna rezistence. Šī cukura diabēta tipa prevalence pieaug līdz ar vecumu, parasti tas tiek diagnosticēti pacientiem vecumā virs 40 gadiem. Pacienti, kas slimo ar T2D, galvenokārt ir ar lieko svaru. Aptaukošanās un ar vecumu saistītās izmaiņas organisma metabolajos faktoros tiek uzskatīti par T2D galvenajiem cēloņiem (American Diabetes Association 2008, Chen *et al.* 1985, Landes Bioscience 2013).

Visretāk ir sastopami dažādi specifiski cukura diabēta tipi. Pie tiem pieder vairākas monogēnas formas, piemēram, MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), kas tiek saistīts ar ģenētiskiem defektiem, kas ietekmē β -šūnu attīstību un funkcijas. Tiek izšķirts arī gestācijas jeb ar grūtniecību saistītais cukura diabēts, kas izpaužas kā glikozes intolerance grūtniecības laikā. Cukura diabēts var būt kā sekundāra izpausme tādām slimībām kā cistiskā fibroze, neoplāzija, akromegālija, Dauna sindroms, inficēšanās ar citomegalovīrusu un daudzas citas

(American Diabetes Association 2008, Goldenberg and Punthakee 2013, Landes Bioscience 2013).

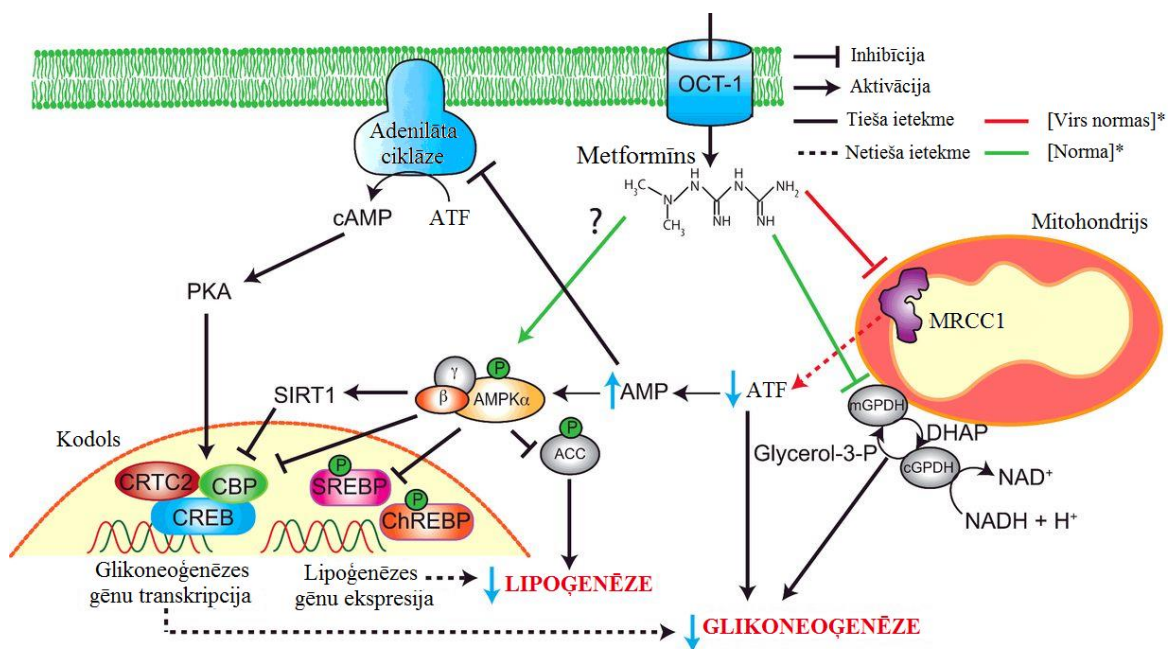
1.6. Metformīns

Metformīns (1,1-dimetilbiguanīds) ir orāli lietojams pirmās izvēles medikaments T2D ārstēšanā visās vecuma grupās, kurš nodrošina glikozes līmeņa samazināšanos asinīs, taču neizraisa izteiktu hipoglikēmiju. Tas tiek izmantots klīniskajā praksē jau kopš 20. gs. piecdesmitajiem gadiem. Metformīnu lieto gan monoterapijā, gan kopā ar citiem antidiabēta medikamentiem, piemēram, *sulfonilurea* un insulīnu (American Diabetes Association 2010, Bailey and Turner 1996, Chaudhury *et al.* 2017). Tāpat tiek pārbaudīta ideja par metformīna lietošanu pre-diabētiskās populācijas, lai aizkavētu T2D attīstību (Gui *et al.* 2013). Nesenos pētījumos metformīns pat piedāvāts kā palīglīdzeklis, lai ārstētu vēzi (Quinn *et al.* 2013). Neskatoties uz augsto efektivitāti, metformīna lietošanai ir vairāki zināmi blakusefekti. Kā visbiežākie ir caureja, vemšana, vēdera sāpes un apetītes zudums. Retāk novērojamas garšas izmaiņas, atsevišķos gadījumos var būt aknu darbības traucējumi, eritēma, kā arī acidoze – ūdeņraža jonu koncentrācijas pieaugums asinīs (Anonymous 2015, Zāļu valsts aģentūra 2017).

Metformīns iedarbojas samazinot aknās notiekošo glikoneoģenēzi (Hundal *et al.* 2000), kā arī palielinot asinīs esošās glikozes uzņemšanu muskuļu šūnās (Bailey and Turner 1996). Precīzi metformīna darbības mehānismi joprojām nav noskaidroti, tomēr ir zināms, ka tas glikozes līmeņa samazināšanu galvenokārt veic specifiski inhibējot mitohondriālās elpošanas ķēdes pirmo kompleksu (MRCC1) (4. attēls). Inhibējot MRCC1 tiek samazināta reducētā nikotīnamīda adenīndinukleotīda (NADH) oksidācija, protonu sūkņa darbības intensitāte un skābekļa patēriņš. Tādējādi samazinās protonu gradients uz mitohondriju membrānas un tā vadītā adenozīna trifosfāta (ATF) sintēze. (Owen *et al.* 2000, Viollet *et al.* 2012).

MRCC1 inhibēšanas rezultātā, samazinoties aknu ATF enerģijas rezervēm, aktivējas AMP-aktivētā proteīnkināze (AMPK). Tā pārslēdz šūnas no anaboliskā stāvokļa uz katabolisko, tādējādi tiek inhibēta glikozes, lipīdu un proteīnu sintēze, kā arī šūnu augšana, taču taukskābju oksidācija un glikozes uzņemšana tiek stimulētas (Viollet *et al.* 2009).

Pacientiem, kuri lieto metformīnu, uzlabojas lipīdu profils asins plazmā un samazinās T2D izraisīto gan mikrovaskulāro, gan makrovaskulāro komplikāciju risks. Šie pozitīvie efekti tiek saistīti ar AMPK aktivitātes izmaiņu ietekmi uz vairākiem regulatoriem faktoriem, gan tādiem, kas iesaistīti lipoģenēzē, gan glikoneoģenēzē (Giugliano *et al.* 1993, Napolitano *et al.* 2014, Zhou *et al.* 2001).



4. attēls. Metformīna darbības mehānismi T2D terapijā. Metformīns nokļūst hepatocītos caur OCT1 un uzkrājas mitohondrijos, kur tas inhibē MRCC1. AMPK inhibē glikoneoģenēzes gēnu transkripciju gan tieši, gan caur SIRT1 kavējot CREB-CBP-CRTC2 kompleksa veidošanos. Papildus AMPK caur ACC, ChREBP un SREBP forforilāciju inhibē lipogēnēzi, kas palīdz uzlabot insulīna sensitivitāti. Pastāv arī vairāki AMPK-neatkarīgi metformīna darbības mehānismi. Palielinātai AMP koncentrācijai ir inhibitors efekts uz adenilāta ciklāzi, tādējādi samazinot cAMP produkciju. Šīs izmaiņas tālāk samazina PKA un tās tālāko mērķu (ieskaitot CREB) aktivitāti. Metformīns inhibē arī mGDP. Tas kavē glicerola iesaisti glikoneoģenēzē un paaugstina citosola red-oks stāvokli, kas tālāk kavē laktāta pārvēršanu par piruātu un līdz ar to limitē laktāta izmantošanu glikoneoģenēzē (Pryor and Cabreiro 2015). * - metformīna koncentrācija.

Figure 4. Proposed mechanisms of metformin action in T2D. Metformin enters the hepatocyte through OCT1 and accumulates in the mitochondria where it inhibits complex I. AMPK inhibits gluconeogenic gene transcription by preventing formation of the CREB–CBP–CRTC2 complex, both directly and via SIRT1. Furthermore, AMPK inhibits lipogenesis through ACC, ChREBP and SREBP phosphorylation, which helps to improve insulin sensitivity. Several AMPK-independent mechanisms of metformin action also exist. Increased AMP has an inhibitory effect on adenylate cyclase leading to decreased cAMP production. This in turn reduces the activity of PKA and its downstream targets, which include CREB. Metformin also inhibits mGPD. This prevents glycerol from contributing to gluconeogenesis and increases the cytosolic redox state, which in turn makes the conversion of lactate to pyruvate unfavourable thus limiting the use of lactate as a gluconeogenic substrate (Pryor and Cabreiro 2015). * - metformin concentration.

Citos pētījumos, savukārt, parādīts, ka AMPK inaktivācija nevējina metformīna darbības efektus. Tas norāda, ka AMPK mediētie signālceļi nav vienīgie, kas ir iesaistīti metformīna darbības mehānismā. Pie tam, ievadot metformīnu intravenozi, nevis orāli, netiek uzlabots glikozes metabolisms organismā (Bonora *et al.* 1984). Jaunākie pētījumi parāda, ka medikamenta formām ar kavētu absorbciju, kas tiek atbrīvotas tikai tievo zarnu distālajā daļā, un līdz ar to ir ar zemāku biopieejamību (līdz pat 50%), glikozes pazeminošā iedarbība ir

līdzvērtīga vai pat augstāka par tūlītējas iedarbības metformīna efektu (Buse *et al.* 2016, DeFronzo *et al.* 2016). Līdz šim ir noskaidrots, ka metformīna lietošanas rezultātā pelēm, kurām ir diēta ar augstu tauku saturu (HFD), zarnu mikrobiomā būtiski paaugstinās tādu baktēriju sugu īpatsvars kā *Akkermansia muciniphila* un *Clostridium cocleatum*. Tāpat ir pierādīts, ka metformīna terapija gan pelēm ar HFD, gan kontroles grupai (pelēm bez HFD) būtiski paaugstina *Bacteroidetes* tipa daudzumu zarnu mikrobiomā (Lee and Ko 2014). *Akkermansia* ģints īpatsvara pieaugums tiek asociēts ar paaugstinātu glikozes toleranci kā arī vājinātām adipozo audu iekaisuma reakcijām (Shin *et al.* 2013). Pētījumā par cilvēku zarnu mikrobioma atbildes reakcijām uz metformīna lietošanu atklāts, ka paraugkopā ar 14 T2D pacientiem, iespējams, būtiski izmainās četru ģinšu daudzums zarnu mikrobiomā: (1) *SMB53* (tips: *Firmicutes*), (2) *Adlercreutzia* (tips: *Actinobacteria*), (3) *Eubacterium* (tips: *Firmicutes*) un (4) neklasificēta ģints no *Firmicutes* tipa. (Napolitano *et al.* 2014). Šajos pētījumos noskaidrotais liek domāt, ka zarnu traktam un tajā esošajam mikrobiomam varētu būt būtiska loma šī medikamenta darbībā (Bonora *et al.* 1984, Napolitano *et al.* 2014). Metformīna un zarnu mikrobioma metagenomikas pētījumi norāda uz terapijas laikā paaugstinātu labvēlīgās, SCFA producējošās *Akkermansia* ģints, kā arī oportūnistisko patogēnu *Escherichia-Shigella* spp. pieaugumu (Forslund *et al.* 2015, Wu *et al.* 2017). Tāpat ir zināms, ka metformīna koncentrācija visaugstākajā līmenī ir novērojama tieši zarnu gļotādā. Tas varētu izskaidrot metformīna darbības negatīvos efektus uz gastro-intestinālo traktu (Bailey *et al.* 2008).

Tomēr neskatoties uz daudziem veiktajiem pētījumiem par metformīna molekulārajiem mehānismiem, tie joprojām ir neskaidri (Viollet *et al.* 2012). Viens no vismazāk raksturotajiem aspektiem ir iespējamā metformīna ietekme uz epiģenētisko regulāciju, piemēram, DNS metilēšanu, un tās tālāko ietekmi uz metformīna terapijas iznākumu (Niu *et al.* 2016, Song *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2017).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Izmantotie laboratorijas piederumi

2. tabula

Izmantoto laboratorijas piederumu uzskaitījums

Table 2

List of the used laboratory equipment.

Nosaukums	Ražotājs
1,5 ml stobriņi	Biosigma, Itālija
1,5 ml <i>LoBind</i> ® stobriņi	Eppendorf, ASV
2 ml stobriņi	Sarstedt, Vācija
15 ml stobriņi	Sarstedt, Vācija
Stobriņi fēču paraugu ievākšanai	Sarstedt, Vācija
Laboratorijas cimdi	Top Glove, China
Magnētiskais statīvs	Life Tehcnologies, ASV
Pipetes- <i>Pipetman Ultra</i>	Gilson, ASV
Piepešu uzgaļi ar filtru - <i>Biosphere Filter tips</i> (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Vācija
Pipešu uzgaļi - <i>Biosphere tips</i> (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Vācija

2.1.2. Izmantotie reaģenti

3. tabula

Izmantoto reaģentu uzskaitījums.

Table 3

List of the used reagents.

Nosaukums	Ražotājs
5x HF buferis	Thermo Scientific, ASV
Buferis <i>Low TE</i>	Life Tehcnologies, ASV
Krāsa <i>6x Loading Dye</i>	Thermo Scientific, ASV
10 nM dNTP	Thermo Scientific, ASV
96% etanols	Jaunpagasts Plus, Latvija
100 bp DNS garuma marķieris <i>Gene Ruler</i> ™	Fermentas, Lietuva
Agarozē <i>Top Vision LE GQ #R491</i> ,	Thermo Scientific, ASV
Etīdija bromīds	SIGMA, Vācija
Reaģentu komplekts <i>FastDNA</i> ® <i>Spin Kit for Soil</i>	MP Biomedicals, LCC, ASV
NucleoMag® magnētiskās lodītes	MACHEREY-NAGEL, Vācija
Polimerāze <i>Phusion Hot-start II HF</i>	Thermo Scientific, ASV
Modificēts 50x TAE buferšķīdums	EMD Milipore, ASV
<i>Qubit</i> ® <i>dsDNA HS</i> reaģents/krāsa	Life Tehcnologies, ASV
<i>Qubit</i> ® <i>dsDNA HS</i> buferis	Life Tehcnologies, ASV

2.1.3. Izmantotā aparatūra

4. tabula

Izmantotās aparatūras uzskaitījums.

Table 4

List of the used equipment.

Nosaukums	Ražotājs
Bioanalizators (2100 <i>Bioanalyzer</i>)	Agilent Technologies, ASV
Centrifūga 5810 R	Eppendorf AG, Vācija
Centrifūga 5424	Eppendorf AG, Vācija
Ekrāns IM 2305-SQ	Pieper, Vācija
Elektroforēzes aparāts: <i>Electrophoresis Power Supply - EPS600</i>	Pharmacia, Zviedrija
Homogenizētājs <i>FastPrep</i>	MP Biomedicals, ASV
Inkubators-krafitājs VorTemp™ 56	Labnet International, Inc ASV
Sekvenators <i>Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM)</i>	Life Tehcnologies, ASV
Laboratorijas svāri BP610 (+/-0,01g)	Sartorius, Vācija,
Mikroviļņu krāsns	SCARLETT, Krievija
Ūdens attīrīšanas sistēma <i>Milli – Q</i>	Millipore, ASV
Digitālā fotokamera E.A.S.Y. 429K	Herolab, Vācija
Programmējamais termostats <i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Life Tehcnologies, ASV
Fluorometrs <i>Qubit® 2.0</i>	Life Tehcnologies, ASV
Termostats TDB-120	BioSan, Latvija
UVT - 20 M/W	Herolab, Vācija
Video grafiskais printeris UP - 890 CE	Sony, Japāna
Vorteks <i>FV-2400 Microspin</i>	BioSan, Latvija
Vorteks <i>gene 2™</i>	Scientific Industries, ASV
Elektroforēzes vanna Mini – <i>Sub Cell GT System</i>	Bio –Rad, ASV

2.1.4. Izmantotā programmatūra

- *MS Excel*
- R programma v.3.2.2 un *RStudio* v.0.98.1104
- *PuTTY* v.0.64
- *mothur* v.1.39.1

2.2. Metodes

2.2.1. Pētījuma dizains

Pētījumā tika iekļauti veseli dalībnieki vecumā no 18 līdz 64 gadiem, kuri atbilda 4. pielikumā apkopotajiem iekļaušanas/izslēgšanas kritērijiem. Pētījuma laikā dalībniekiem tika lūgts krasi nemainīt savu ierasto diētu un dzīvesveidu, kā arī reģistrēt savu uzturu un fiziskās aktivitātes diētas dienasgrāmatā (3.pielikums). Papildus, visi dalībnieki tika iesaistīti

Valsts iedzīvotāju genoma datu bāzē (VIGDB), tādējādi saņemot identifikācijas kodus un nodrošinot personas datu konfidencialitāti.

Dalībnieki septiņas dienas lietoja metformīnu divas reizes dienā pa vienai 850 mg *Metforal* (Berlin-Chemie, Vācija) apvalkotajai tabletei. Metformīns tika lietots ēšanas laikā, uzdzertot glāzi ūdens, lai samazinātu iespējamo biežo blakņu izpausmes (vēdera sāpes, vemšana, caureja, meteorisms).

Pirms dalības uzsākšanas tika nodoti asins paraugi sertificētā diagnostikas laboratorijā, lai veiktu hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes. To rezultāti tika ņemti vērā dalībnieka atbilstības novērtēšanai iekļaušanas/izslēgšanas kritērijiem un nepieciešamības gadījumā izmantoti kā kovariāti statistiskajā analīzē. Pētījuma laikā katrs dalībnieks ievāca trīs fēču paraugus (divās alikvotās) mikrobioma analīzei un tika paņemti asins paraugi trīs laika posmos balto asins šūnu metilēšanas profilu salīdzināšanai. Pētījuma dizaina un paraugu iegūšanas plāns redzams 5.attēlā.

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

5.attēls. Pētījuma dizaina shēma. MP – mikrobioma paraugs.

Figure 5. Scheme of the study design. MP – microbiome sample.

Fēču paraugu ievākšanas protokola kopsavilkums ir attēlots 6. attēlā. Pēc ievākšanas paraugi trīs dienu laikā tika nogādāti laboratorijā un uzglabāti pie -80°C līdz mikrobiālās DNS izdalīšanai.



6. attēls. Vadlīnijas fēču paraugu ievākšanai (Harrison County Health Department 2015).

Figure 6. Guidelines for stool sample collection (Harrison County Health Department 2015).

Pētījums tika veikts VPP „Biomedicīna sabiedrības veselībai” (BIOMEDICINE) projekta *apakšprojekta Nr.2.8.* ietvaros, un ir saņēmis atļaujas no Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrības Klīniskās izpētes ētikas komitejas (Nr. 2012.1212 - 10L), Centrālās Medicīnas Ētikas Komitejas (Nr. 1/16-05-12) un Zāļu valsts aģentūras (Nr. 17-1723).

2.2.2. Bakteriālās DNS izdalīšana

Ar *FastDNA® Spin Kit for Soil*

1. Stobriņam, kurš satur lizēšanas matriksu E, pievieno ~100 mg fēču parauga.
2. Pievieno 987 μl nātrija fosfāta bufera un 122 μl MT bufera.
3. Paraugu 40 sekundes homogenizē, izmantojot *FastPrep® Instrument* ierīci ar ātrumu 6.0.
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 apvēršot stobriņu.
6. Centrifugē stobriņu 5 min pie 14 000 x g. Iegūto supernatantu pārnes uz tīru 15 ml stobriņu.
7. Rūpīgi samaisa saistīšanas matriksa šķīdumu un 1 ml no tā pievieno paraugam, kas atrodas 15 ml stobriņā.
8. Paraugu 2 minūtes maisa, apvēršot stobriņu vairākas reizes, tādējādi nodrošinot DNS piesaistīšanu matriksam. Pēc tam stobriņu novieto statīvā, lai 3 minūtes ļautu matriksam nosēsties.
9. Neaizskarot saistīšanas matriksu, no stobriņa aizvāc 500 μl supernatanta.

10. Atlikušo supernatantu resuspendē kopā ar saistīšanas matriksu. Aptuveni 600 µl no maisījuma pārnes uz stobriņu ar SPINTM filtru un centrifugē 1 min pie 14 000 x g. Filtrātu izlej un SPINTM filtram pievieno atlikušo maisījumu no 15 ml stobriņa, atkārti centrifugēšanu.
11. Paraugam pievieno 500 µl SEWS-M (sajaukts ar etanolu attiecībā 1,2:1) un pipetējot samaisa virs filtra esošo saistīšanas matriksu.
12. Centrifugē stobriņu 1 min pie 14 000 x g un filtrātu izlej.
13. Centrifugē stobriņu atkārtoti 2 min pie 14 000 x g, lai izžāvētu matriksu un atbrīvotos no skalošanas šķīduma paliekām. Filtrēšanas kolonu ievieto tīrā stobriņā.
14. SPINTM filtru žāvē 5 min istabas temperatūrā.
15. Uzmanīgi resuspendē virs filtra esošo saistīšanas matriksu, pievienojot 100 µl DES (*Dnase/Pyrogen-Free Water*) šķīduma. Paraugu inkubē 5 min 55°C, lai palielinātu iegūtās DNS daudzumu.
16. Centrifugē stobriņu 1 min pie 14 000 x g. Aizvāc SPIN filtru. Iegūto filtrātu, kas satur mikrobiālo DNS, uzglabā pie -20°C.

2.2.3. DNS agarozes gēla elektroforēze

1. Sagatavo 1,2% agarozes gēlu (1,2g agarozes un 7 µl Etīdija bromīda uz 100 ml 1xTAE).
2. Atfāsē 2 µl izdalītās mikrobiālās DNS parauga un pievieno 0,5 µl. *6x Loading Dye* krāsu. Maisījumu pārnes uz gēla. Blakus bedrītē iepilda 2 µl 100 bp DNS garuma marķieri.
3. DNS elektroforēzi veic pie 150 mA strāvas ~30min.
4. Gēlu novieto uz UV starojuma avota, nofotografē un izvērtē iegūtos rezultātu.

2.2.5. Parauga DNS koncentrācijas mērīšana

Ar Qubit® dsDNA HS Assay Kit

1. Pagatavo sekojošu maisījumu (kopējais tilpums tiek aprēķināts atbilstoši paraugu skaitam (n), pieskaitot standartšķīdumus S1 un S2):
 - a. (n+2) x 199 µl buferis
 - b. (n+2) x 1 µl krāsa
2. *Qubit® Assay* stobriņos sajauc 2 µl DNS parauga un 198 µl iepriekš pagatavotā maisījuma. Papildus divos *Qubit® Assay* stobriņos sagatavo standartšķīdumus, iepildot katrā 10 µl attiecīgā standarta (S1 vai S2) un pievienojot 190 µl krāsas un bufera maisījuma.

3. Stobriņus vorteksē. Pārlicinās vai stobriņos nav izveidojušies gaisa burbuļi, un inkubē paraugus istabas temperatūrā 2 minūtes.
4. Veic paraugu koncentrācijas noteikšanu, izmantojot *Qubit® 2.0* fluorometru.

2.2.6. PCR 16S rRNS gēna V3 rajona fragmentu pavairošanai

1. Katram DNS paraugam sagatavo divus reakciju maisījumus ar kopējo tilpumu 25 μ l, kas satur (1) Fw oligonukleotīdu bez identifikācijas sekvences un Rs oligonukleotīdu ar identifikācijas sekvenci un (2) Fw oligonukleotīdu ar identifikācijas sekvenci un Rs oligonukleotīdu bez identifikācijas sekvences (izmantoto oligonukleotīdu sarakstu skatīt 2. pielikumā (Milani *et al.* 2013)). Kopējais vienas reakcijas maisījuma sastāvs ir šāds:

5x HF buferis (+MgCl₂) – 5 μ l
 10 mM dNTP – 0,5 μ l
 10 μ M Fw oligonukleotīds – 0,63 μ l
 10 μ M Rs oligonukleotīds – 0,63 μ l
Phusion HF DNS polimerāze – 0,25 μ l
 H₂O – 16,99 μ l
 DNS (10 ng) – 1 μ l

Identifikācijas sekvenci saturošie oligonukleotīdi ir nepieciešami, lai būtu iespējams izsekot paraugus un atšķirt tos pēc apvienošanas, kas notiek pirms sekvenēšanas. Izmantoto oligonukleotīdu saraksts skatām 2. pielikumā.

2. Reakcijas maisījumu inkubē programmējamā termostatā sekojošos apstākļos:

98°C – 30 s	}	35 cikli
98°C – 10 s		
67°C – 15 s		
72°C – 15 s		
72°C – 7 min		
4°C – ∞		

3. Veic PCR produktu apskati ar DNS agarozes gēla elektroforēzi (aprakstīta 2.2.4. apakšnodaļā).

2.2.7. PCR produkta attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm

1. DNS parauga abus PCR produktus apvieno jaunā 1,5 ml *LoBind* stobriņā.
2. 40 µl PCR produkta pievieno 60 µl līdz istabas temperatūrai sasildītas *NucleoMag*® magnētiskās lodītes. Samaisa pipetējot, inkubē 5 min istabas temperatūrā.
3. Stobriņu liek uz magnēta 3 – 5 min, pēc tam aizvāc supernatantu.
4. Divas reizes skalo ar 200 µl 80% etanola (zemāka koncentrācija var novest pie produkta zudumiem). Skalošanu veic pāris reizes stobriņu apgriežot ap savu asi.
5. Pārlicinās, ka viss etanols ir aizvākts. Žāvē stobriņus uz magnēta 4 min istabas temperatūrā.
6. Noņem no magnēta, pievieno 30 µl *low TE* bufera. Samaisa, inkubē 5 min istabas temperatūrā.
7. Stobriņu liek uz magnēta 3 – 5 min.
8. Iegūto supernatantu pārnes jaunā 1,5 ml stobriņā.
9. Veic gatavās bibliotēkas kvalitatīvo un kvantitatīvo novērtējumu ar bioanalizatoru.

2.2.8. Paraugu kvalitātes un kvantitātes novērtēšana

Bioanalizatora (*Agilent Bioanalyzer 2100*) darbība ir balstīta uz kapilāro elektroforēzi. Attīrīto PCR amplikonu bibliotēku kvalitātes un kvantitātes noteikšanai izmanto *High Sensitivity DNA* čipus un reaģentus, ar kuriem iespējams analizēt 50 – 7000 bp garus DNS fragmentus ar koncentrāciju 5 – 500 pg/µl. Paraugu kvalitātes un kvantitātes noteikšanu veic vadoties pēc ražotāja lietošanas instrukcijām.

2.2.9. Sekvenēšana

Ja paraugi (DNS bibliotēkas) ir atbilstoša garuma un pietiekamā koncentrācijā, tos nodod lielapjoma paralēlajai sekvenēšanai. Balstoties uz koncentrāciju, kas noteikta izmantojot bioanalizatoru, paraugi tiek atšķaidīti līdz 8 pM. Katri desmit paraugi tiek apvienoti, lai pilnībā izmantotu sekvenēšanas čipu kapacitāti (4 – 5,5 miljoni nolasījumu; 600Mb – 1Gb). Veic emulsijas PCR izmantojot *Ion OneTouch* iekārtu un *Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit* reaģentus, vadoties pēc ražotāja instrukcijām. Sekvenēšana tika veikta izmantojot *Ion Torrent PGM™ (Personal Genome Machine)* sekvenatoru, *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* reaģentus un *Ion 318™ Chip Kit v2* čipus. Prognozētais pārklājums katram paraugam – 250000 nolasījumi. Paraugi uz čipiem tika izvietoti tā, lai visi paraugi no viena pētījuma dalībnieka atrastos uz viena čipa.

2.2.10. Metilēšanas analīze un paraugu sagatavošana

Apmācīts laboratorijas speciālists izdalīja DNS no iegūto asins paraugu baltajām šūnām jeb leukocītiem. Iegūtās DNS koncentrācija tika noteikta ar *Qubit*® 2.0 fluorometru. Pēc tam DNS tika atšķaidīta līdz 100 ng/μl koncentrācijai 50 μl tilpumā un nosūtīta tālākai apstrādei sadarbības partneru institūtā Upsalas Universitātes Biomedicīnas centrā (*NGI Uppsala (SNP&Seq technology platform)*).

Sadarbības partneri veica DNS bisulfīta konversiju ar *EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research)* reaģentu komplektu atbilstoši ražotāja instrukcijām. Tai sekoja DNS hibridizāciju uz Illumina 450K metilācijas mikročipa (*Illumina iScan system*). Iegūtie hibridizācijas rezultāti tālāk tika izmantoti datu analīzei.

2.2.11. Datu analīze

16S rRNS gēna V3 reģiona amplikonu bibliotēkas sekvenču pirmāpstrāde un statistiskā analīze:

Ar *Ion Torrent PGM*™ iegūto sekvenču analīze tika veikta lietojot *mothur v1.39.1* programmatūru (Schloss *et al.* 2009). Vispirms tika veikta sekvenču filtrēšana no datiem noņemot tādas, kuras īsākas par 75 bp, saturēja neviennozīmīgi noteiktas (*ambiguos*) bāzes vai homopolimērus garākus par 8 bāzēm. No katras identisko sekvenču kopas tika izvēlēta reprezentatīvā sekvence un izmantota taksonomijas noteikšanai ar SILVA datubāzi (Quast *et al.* 2013). Tālāk tika identificētas un noņemtas himēriskās sekvenses, izmantojot UCHIME rīku (Edgar *et al.* 2011). Lai mazinātu iespējamo sekvenēšanas kļūdu skaitu, tika veikta pre-klasteru veidošana (*threshold=2*). Taksonomisko vienību (OTU) izšķiršanai tika izmantots *optiClust* algoritms ar sekvenču līdzības sliekšnis 99%. Sekvenču klasifikācija balstījās uz *naïve Bayesian* klasifikātoru. Iegūtie faili, kas satur informāciju par pētījuma dalībnieku zarnu mikrobioma kompozīcijas taksonomisko piederību un kvantitatīvo īpatsvaru, tika apkopoti izmantojot *MS Excel*.

Paraugu iekšējā (α) daudzveidība tika novērtēta pēc Šanona indeksa (Shannon 1948), bet starpparaugu (β) daudzveidības analīzei pielietoja uz *Bray-Curtis* distanču matricu balstītu neparametrisko multidimensionālo mērogošanu (NMDS). Lai novērtētu paraugu grupu atšķirību būtiskumu un mērogu, tika veikta permutācijas analīze PERMANOVA (permutāciju skaits = 9999).

Apkopotie dati tika analizēti un grafiski attēloti ar *RStudio* programmatūru izmantojot šādas datu statistiskās analīzes paketes: „*limma*”, „*edgeR*”, „*XML*”, „*lme4*”, „*lmerTest*”, „*mulcomp*”, „*ggplot2*”, „*lattice*”, „*permute*”, „*metagenomeSeq*”, „*grid*”, „*gridExtra*”,

“cowplot” un „vegan”. Statistiskajā analīzē ar “edgeR” iekļauto vispārināto lineāro modeļu (GLM) funkciju tika iekļauti tie OTU, kuri bija sastopami vismaz 50% paraugu. Mērķēta statistiskā analīze specifisku OTU izmaiņu novērtēšanai, kā arī Šanona indeksa atšķirības tika pārbaudītas ar Vilkoksona testu.

Illumina 450K metilācijas mikročipa nolasījumu pirmapstrāde un statistiskā analīze:

Mikročipa nolasījumi IDAT failu veidā tika importēti R programmā izmantojot analīzes paketi “minfi”. Pēc tam veica balto asins šūnu apakštipu skaita novērtēšanu ar Housmana algoritmu (Houseman *et al.* 2012).

Datu pirmapstrādei un normalizēšanai izmantoja paketi “Enmix”. Tās ietvaros tika aizvāktas zondes, kurām bija detekcijas līmenis <0,05 vai novērojams multimodāls sadalījums. Fona korekcijai pielietoja *preprocessENmix* funkciju ar “oob” kā parametru fona novērtēšanai. Zondu intensitātes tika normalizētas ar kvantiļu normalizāciju, un atšķirīgo zondu tipu radītā neobjektivitāte tika koriģēta ar korelēto zondu regresijas (*Regression on Correlated Probes – RCP*) metodi.

Dažādo analīzes sēriju ietekme (*batch effect*) tika noņemta, izmantojot slaidu un indivīdus kā kovariātus *ComBat* funkcijā. Diferencēti metilētas zondes tika identificētas ar *ComBat* apstrādātajos datos, izmantojot “limma” ietvertu *lmFit* funkciju un koriģējot rezultātus pēc vecuma, dzimuma, KMI, neitrofilu/leikocītu (N/L) attiecības un analīzes sākumā iegūtajiem datiem par šūnu apakštipu sadalījumu (CD8T, CD4T, NK, B-šūnas, monocīti, granulocīti).

Absolūtā metilēšanas līmeņa raksturošanai izmantoja β -vērtības (intervāls no 0 līdz 1). Statistiskā testa veikšanai tika izmantotas M-vērtības (\log_2 no metilēto zondu intensitātes attiecības pret nemetilēto zondu intensitāti), kuras ir piemērotākas statistiskās analīzes veikšanai.

REZULTĀTI

Pētījumā kopumā tika iesaistīti 18 veseli brīvprātīgie (5.tabula). Katrs dalībnieks ievāca/nodeva sekojošus paraugus: (1) trīs fēču paraugus – M0 (pirms metformīna terapijas), M24h (aptuveni 24 stundas pēc pirmās metformīna devas) un M7d (pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas), (2) trīs asins paraugus – M0 (tukšā dūšā, pirms metformīna terapijas), M10h (10 stundas pēc metformīna pirmās devas, bet pirms otrās devas), M7d (tukšā dūšā, pētījuma astotās dienas rītā).

Pēc nedēļu ilgas metformīna lietošanas visi dalībnieki aizpildīja anketu, kurā reģistrēja novērotās blaknes (1. pielikums). Ņemot vērā blakņu anketā norādīto, dalībnieki tika sadalīti trīs grupās atkarībā no blakņu pakāpes: (1) blaknes netika novērotas (n=3), (2) vieglas blaknes, kas ietvēra nelabumu, vājumu, samazinātu apetīti, meteorismu (n=6), un (3) smagas blaknes, kas ietvēra šķidru vēdera izeju vienu vai vairākas reizes dienā, caureju, vemšanu (n=9).

5. tabula.

Pētījuma paraugkopas raksturojums

Table 5.

Characterization of study group

Pazīme	Raksturojošā vērtība
Sievietes/ vīrieši, n (%)	11 (61.1%) / 7 (38.9%)
Vidējais vecums (gadi) ± SN	29 ± 6.6
Vidējais ĶMI ± SN	24.1 ± 3.5
Vidējais ALAT, U/l ± SN	23 ± 11.8
Vidējais kreatinīns ± SN, μmol/l	70 ± 12.3
Glikoze plazmā, mmol/l ± SN	5.1 ± 0.3
Visēdājs/veģetārietis, n	17/1

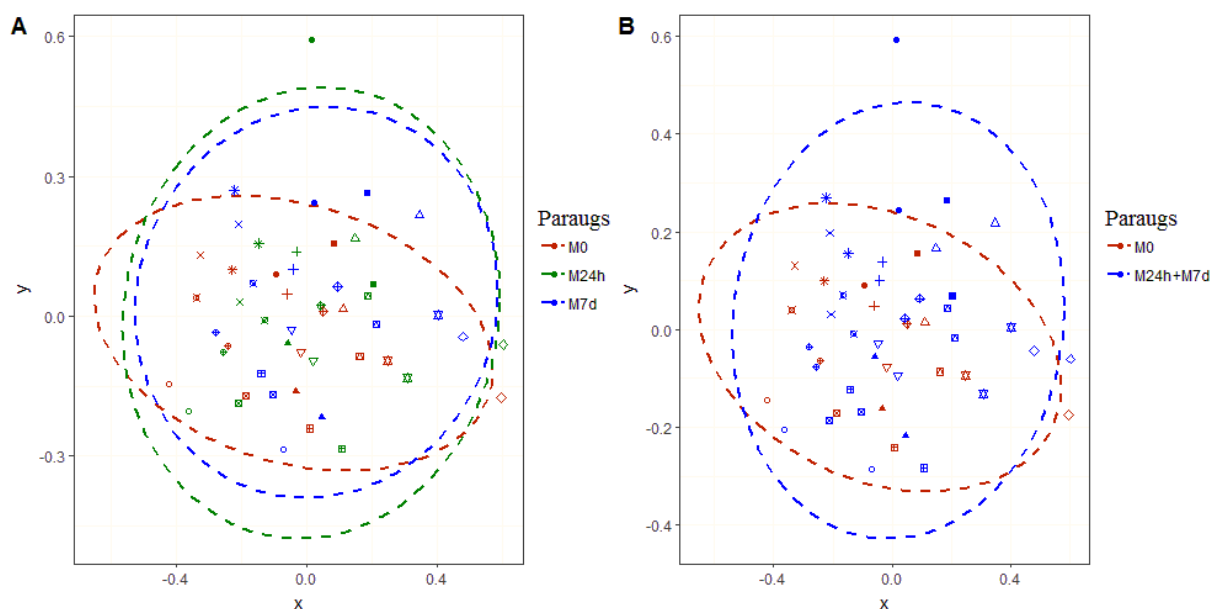
No 18 dalībniekiem tika ievākti 53 fēču paraugi, kurus izmantoja tālākajai analīzei. Visi dalībnieki, izņemot personu ar identifikācijas kodu MF7, nodeva trīs fēču paraugus atbilstošajos laika posmos. MF7 izteiktu blakņu dēļ ceturtajā dienā pārtrauca dalību pētījumā, līdz ar to no šī dalībnieka tika saņemts viens fēču paraugs pirms metformīna lietošanas uzsākšanas un otrs pēc izstāšanās no pētījuma (piektajā dienā). MF7 dalībnieka otrais paraugs statistiskajā analīzē uzrādīja augstu līdzību ar pārējiem M7d paraugiem, līdz ar to tālāk tika analizēts kopā ar šīs grupas paraugiem. Paralēli mikrobioma izmaiņu izvērtēšanai pirmajiem 12 no iesaistītajiem 18 dalībniekiem veica arī DNS metilēšanas profila analīzi baltajās asins šūnās (WBC).

No fēču paraugiem izdalītās DNS koncentrācija bija robežās no 11.3 ng/μl līdz 228.0 ng/μl. PCR reakcija tika veikta, izmantojot oligonukleotīdu pārus, kuri atzīti par piemērotiem sekvenēšanai ar *Ion Torrent PGM™* sekvenatoru (Milani *et al.* 2013). Gatavo

DNS amplikonu bibliotēku koncentrācijas bija robežās no 35 752 pmol/l līdz 134 512 pmol/l. No sekvenatora iegūtie dati saturēja vidēji $520\,480 \pm 169\,690$ nolasījumu uz katru paraugu.

Pamatojoties uz *Illumina* sekvenēšanas platformām pielāgoto datu analīzes metodiku, kas pieejama *mothur* programmai, tika izstrādāta un optimizēta bioinformātikās analīzes darba plūsma (5. pielikums), kas ņem vērā šajā pētījumā izmantoto sekvenēšanas tehnoloģiju (*Ion Torrent PGM*) un tās īpašības, kā arī atbilst longitudinālajam pētījuma dizainam. Izveidotā metodika tika pielietota iegūto 16S rRNS amplikonu bibliotēku nolasījumu pirmapstrādei. Izmantotais sekvenēšanas dziļums deva iespēju klasificēt mikroorganismus līdz ģints taksonomiskajam līmenim.

Sākotnēji tika veikta iegūto paraugu daudzveidības rādītāju raksturošana. Vispirms novērtēja paraugu savstarpējo daudzveidību jeb β -diversitāti. Lai to veiktu, tika izveidots neparametriskās multidimensiju mērogošanas, NMDS, grafiks (6.attēls).



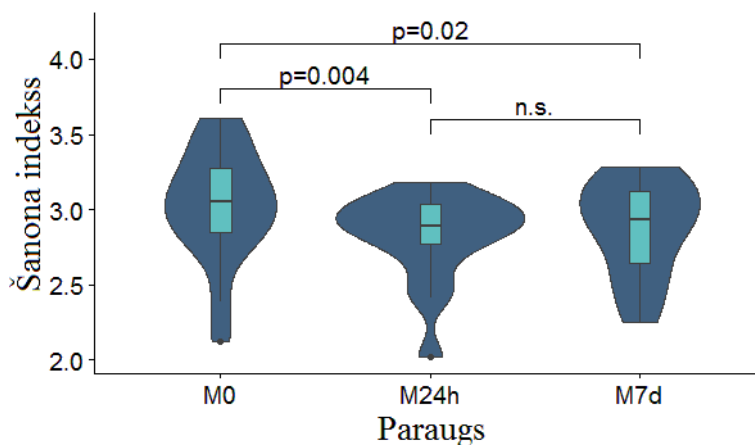
6.attēls. Starpparaugu (β) daudzveidību ģints līmenī reprezentējoši NMDS grafiki. Elipses reprezentē 95% ticamības intervālu katrā no paraugu grupām. Atšķirīgie simboli apzīmē pētījuma dalībniekus. (A) Visu trīs paraugu grupu salīdzinājums. (B) Salīdzinājums starp kontroles paraugu M0 un paraugiem, kas ievākti metformīna terapijas laikā un pēc tās (M24h + M7d).

Figure 6. NMDS plots representing diversity between samples (β) at genus level. Ellipses represent the 95% confidence interval surrounding each group of samples. Different symbols represent participants of the study. (A) Comparison between all sample groups. (B) Comparison between M0 sample and samples during metformin administration (M24h + M7d).

NMDS redzams, ka nav paraugu vai indivīdu, kas būtiski atšķirtos no pārējiem. Novērojama arī tendence, ka trešais paraugs, galvenokārt, atrodas augstāk par pirmo vai par pirmajiem diviem paraugiem, norādot, ka metformīna ietekmē radītās izmaiņas kompozīcijā ģints līmenī

starp indivīdiem ir vērtējamas kā līdzīgas. Veicot permutāciju analīzi tika apstiprināta liela starpindividuālā variācija jeb tendence uz katram indivīdam specifisku mikrobioma kompozīciju (PERMANOVA: $R^2 = 0.74$, $p = 0.001$). Tālākajā paraugu grupu salīdzināšanā šī tendence tika ņemta vērā, norādot indivīdu kā fiksēto faktoru permutācijas analīzē. Salīdzinot visas trīs paraugu grupas (M0, M24h, M7d) netika konstatētas būtiskas atšķirības (PERMANOVA: $R^2 = 0.028$, $p = 0.078$). Tomēr veicot salīdzinājumu starp kontroles paraugu M0 un abiem paraugiem, kas iegūti terapijas laikā (M24h + M7d) tika novērota statistiski būtiska atšķirība (PERMANOVA: $R^2 = 0.019$, $p = 0.036$).

Sekojoši tika aprēķināta katra parauga iekšējā daudzveidība jeb α -diversitāte. Iegūtās Šanona indeksa vērtības un to izmaiņas redzamas 7. attēlā. Tika novērota ātra reakcija uz metformīna terapiju, respektīvi būtiska iekšējās diversitātes samazināšanās jau pēc pirmajām divām līdz trīs metformīna devām, kā arī neliels, taču nebūtisks Šanona indeksa pieaugums salīdzinot M24h un M7d paraugus.

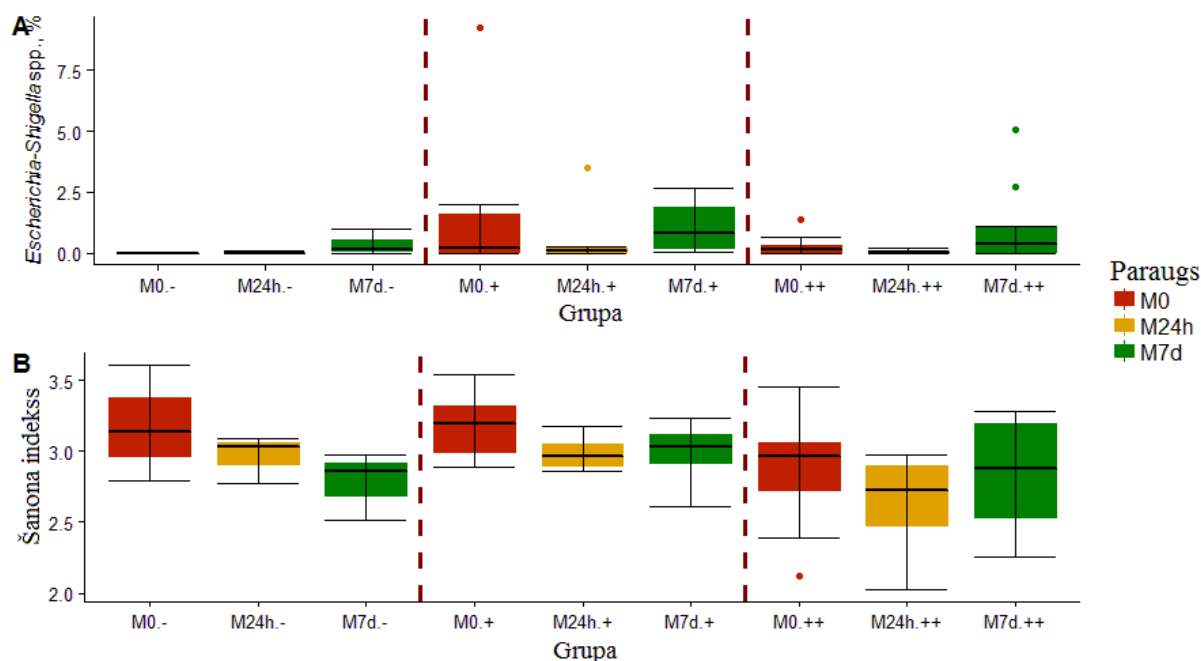


7. attēls. Paraugu iekšējās daudzveidības izmaiņas metformīna lietošanas laikā. Violīn-grafiks attēlo Šanona indeksu, kombinējot kastveida un nogriežņa procentiņu diagrammu (*boxplot*), kas parāda mediānās vērtības un iekšējo kvartiļu diapazonu, ar Kernela blīvuma grafiku.

Figure 7. Alpha diversity changes during metformin therapy, evaluated at different time points of the study. Violin plot characterizing Shannon indexes combines boxplots, representing the median value and interquartile ranges, with kernel density plots.

Lai pārbaudītu iespējamo paraugu diversitātes samazināšanās saistību ar zarnu mikrobioma disbiozi, tika analizētas plaši sastopama oportūnistiskā patogēna *Escherichia-Shigella* spp. īpatsvara izmaiņas. Tika veikta mērķēta statistiskā analīze ar Vilkoksona testu. Starp paraugu pāriem M0 un M7d, M0 un M24h netika atrastas būtiskas izmaiņas, taču statistiskais tests parādīja būtisku šīs ģints pieaugumu salīdzinot M24h un M7d paraugus ($p=0.01$). Pēc šī testa tika veikta gan *Escherichia-Shigella* spp. īpatsvara, gan Šanona indeksa izmaiņu novērtēšana un salīdzināšana katrā no trim iepriekš definētajām blakņu

grupām (8. attēls). Abās grupās, kur tika reģistrētas blaknes, M7d paraugā tika novērots iekšējās daudzveidības pieaugums salīdzinot ar M24h paraugu, tomēr tas nesasniedza kontroles parauga M0 vērtību.



8.attēls. Korelācija starp izmaiņām zarnu mikrobioma iekšējā daudzveidībā un oportūnistiskā patogēna *Escherichia-Shigella* spp. īpatsvaru dažādos pētījuma laika punktos grupās, kas izveidotas atkarībā no novērotajiem blakusefektiem. “-“ nav blakņu, “+” vidējas blaknes, “++” smagas blaknes. Kastveida un nogriežņa procentiņu diagramma attēlo mediānās vērtības un iekšējo kvartīļu diapazonu katrā grupā. Punkti ārpus nogriežņu robežām reprezentē ekstrēmas vērtības. (A) *Escherichia-Shigella* spp. relatīvā īpatsvara izmaiņas. (B) Iekšējās daudzveidības izmaiņas, raksturotas ar Šanona indeksu.

Figure 8. Correlation between changes of gut microbiome inner diversity and abundance of the opportunistic pathogen *Escherichia-Shigella* spp. at different time points of study within groups created according to severity of GI side effects. “-“ no side effects, “+” mild side effects, “++” severe side effects. Boxplots depict median value and interquartile ranges of data in each group. Dots beyond the bounds of the whiskers represent outliers. (A) Relative abundance changes of *Escherichia-Shigella* spp. (B) Inner diversity changes, characterized by Shannon index.

Veicot statistisko testu ar R programmu un tajā ietverto datu analīzes paku *edgeR* tika izvērtētas 220 taksonomiskās grupas visos pieejamos taksonomiskajos līmeņos (tips, klase, kārta, dzimta, ģints), kas bija sastopamas vismaz 50% paraugu. Kopumā visos salīdzinājumu pāros tika novērotas īpatsvara izmaiņu tendences 27 taksonomiskajās grupās dažādos līmeņos. To raksturojums redzams 6. tabulā.

Galvenās statistiski būtiskās izmaiņas taksonomisko grupu īpatsvarā visos taksonomiskajos līmeņos.

Table 6.

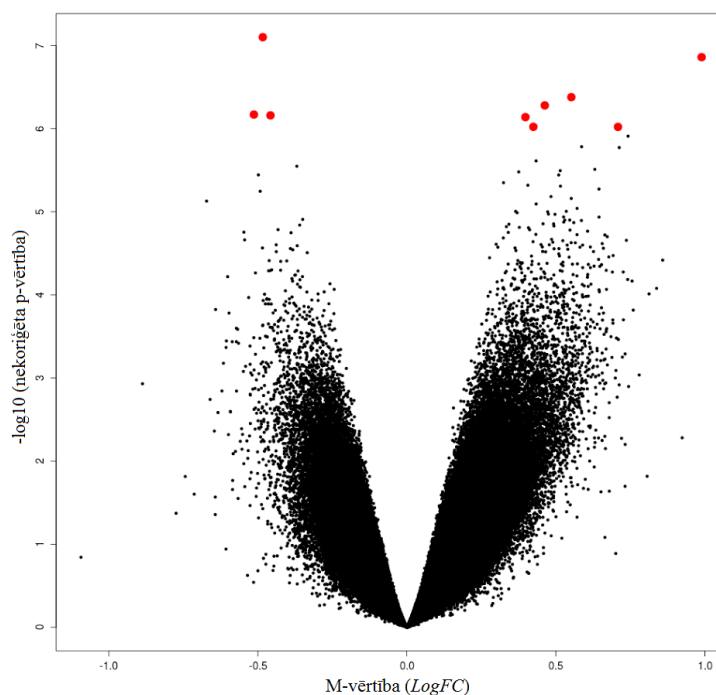
Top statistically significant changes of taxonomic units in all taxonomic levels.

Taksonomiskais līmenis	Taksonomiskā grupa	Vidējais īpatsvars paraugos, %			P – vērtība [FDR]		
		M0	M24h	M7d	M0 vs. M24h	M24h vs. M7d	M0 vs. 7d
Klase	<i>Proteobacteria_unclassified</i>	0.019	0.008	0.02	0.03 [0.62]		
	<i>Gammaproteobacteria</i>	1.16	0.50	1.71		0.002 [0.05]	0.008 [0.13]
	<i>Verrucomicrobiae</i>	0.45	0.30	1.14		0.03 [0.20]	
	<i>Bacilli</i>	1.02	0.83	1.31		0.03 [0.20]	0.04 [0.17]
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	0.003	0.007	0.01			0.01 [0.13]
	<i>Negativicutes</i>	2.38	1.90	1.34			0.02 [0.15]
Kārta	<i>Proteobacteria_unclassified</i>	0.02	0.008	0.02	0.02 [0.68]		
	<i>Enterobacteriales</i>	0.99	0.41	1.55		0.002 [0.04]	0.005 [0.12]
	<i>Verrucomicrobiales</i>	0.45	0.30	1.14		0.03 [0.26]	
	<i>Lactobacillales</i>	1.00	0.81	1.29		0.03 [0.26]	0.04 [0.36]
	<i>Selenomonadales</i>	2.38	1.90	1.34			0.02 [0.26]
Dzimta	<i>Peptostreptococcaceae</i>	1.17	0.93	0.23		0.001 [0.02]	4.24E-06 [0.0002]
	<i>Clostridiaceae_1</i>	0.70	0.51	0.13		0.008 [0.12]	3.41E-05 [0.0007]
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.99	0.41	1.55		0.001 [0.02]	0.004 [0.05]
	<i>Streptococcaceae</i>	0.58	0.41	0.68		0.01 [0.14]	
	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.45	0.30	1.13		0.03 [0.21]	
Ģints	<i>Peptostreptococcaceae_unclassified</i>	0.91	0.72	0.18	0.04 [0.97]	0.0006 [0.04]	1.86E-06 [0.0002]
	<i>Clostridiaceae_1_unclassified</i>	0.63	0.49	0.10		0.032 [0.08]	8.40E-06 [0.0005]
	<i>Asaccharospora</i>	0.17	0.15	0.03		0.003 [0.08]	1.64E-05 [0.0006]
	<i>Romboutsia</i>	0.09	0.06	0.02		0.002 [0.07]	2.92E-05 [0.0009]
	<i>Escherichia-Shigella</i>	0.80	0.27	1.00		0.0006 [0.04]	0.008 [0.14]
	<i>Streptococcus</i>	0.45	0.35	0.61		0.007 [0.16]	0.02 [0.31]
	<i>Enterobacteriaceae_unclassified</i>	0.19	0.13	0.48		0.01 [0.19]	0.004 [0.11]
	<i>Ruminiclostridium_6</i>	0.45	0.35	0.08		0.03 [0.45]	0.006 [0.13]
	<i>Akkermansia</i>	0.44	0.30	1.13		0.03 [0.48]	
	<i>Ruminococcaceae_UCG-008</i>	0.02	0.03	0.04			0.01 [0.16]
	<i>Blautia</i>	1.45	2.04	2.02			0.04 [0.52]

Tomēr, netika konstatētas statistiski būtiskas izmaiņas tipa līmenī, kā arī pēc FDR korekcijas nesaglabājās neviens būtisks rezultāts salīdzinot M0 un M24h paraugus. Pēc nedēļu

ilgas metformīna terapijas tika atklāts statistiski būtisks īpatsvara samazinājums divās dzimtās un četrās tajās ietilpstošajās ģintīs: *Peptostreptococcaceae_unclassified* (dzimta *Peptostreptococcaceae*), *Clostridiaceae_1_unclassified* (dzimta *Clostridiaceae_1*), *Asaccharospora* (dzimta *Peptostreptococcaceae*), *Romboutsia* (dzimta *Peptostreptococcaceae*). Taču salīdzinot M24h un M7d paraugus tika konstatēts būtisks pieaugums *Enterobacteriales* kārtas īpatsvarā, kas tālāk atspoguļojās arī būtiskā pieaugumā vienīgajā šajā kārtā ietilpstošajā *Enterobacteriaceae* dzimtā un tāpat arī vienā no filoģenētiski tālāk sekojošām ģintīm - *Escherichia-Shigella*.

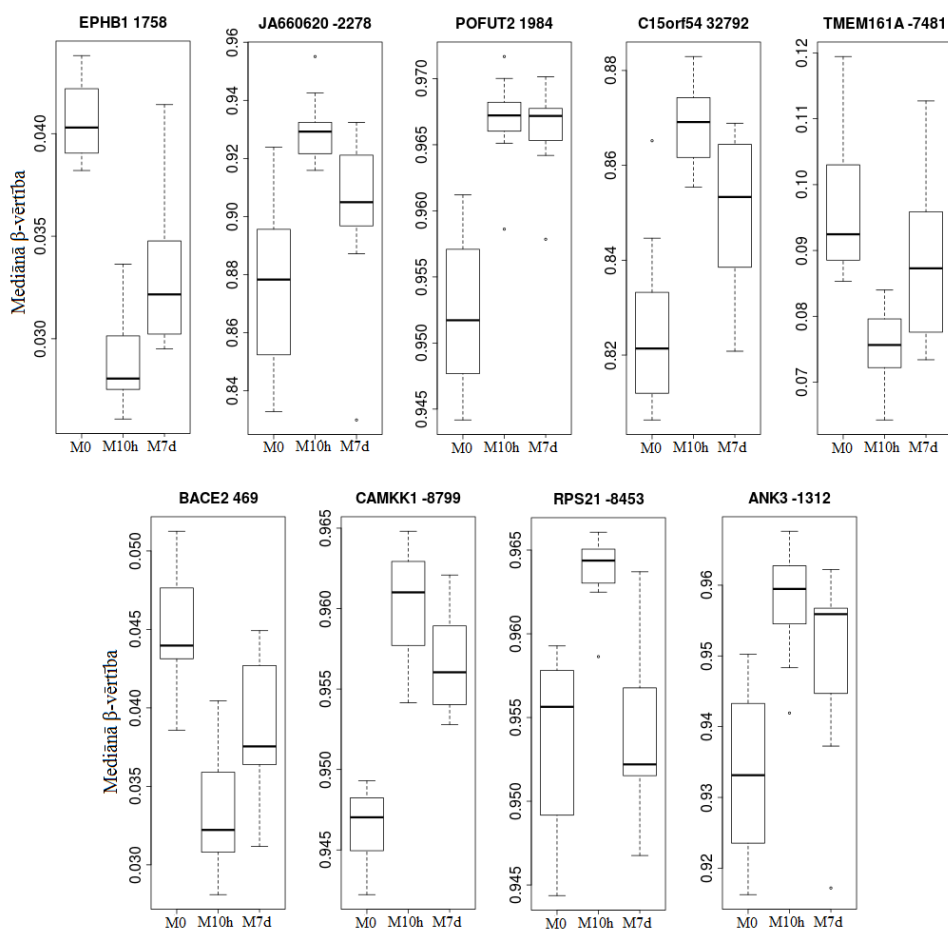
Mikrobioma kompozīcijas izvērtēšanai sekoja DNS metilēšanas profila analīze 12 no iepriekš aprakstītajiem veselajiem indivīdiem. No WBC izdalītās genomiskās DNS vidējā koncentrācija bija 699.4 ± 267.2 ng/μl. Veicot sākotnējo kvalitātes kontroli un ņemot vērā atšķirīgo terapijas ilgumu, MF7 tika izslēgts no metilēšanas analīzes. Pēc datu pirmapstrādes tika novērtētas iespējamās metformīna izraisītas globālas izmaiņas metilēšanas profilos, savstarpēji salīdzinot paraugus visos trīs laika punktos. Statistiskajai analīzei balstoties uz M-vērtību salīdzināšanu un izvēlētajiem parametriem - mediānā β -vērtības izmaiņa $\geq 3\%$ un p-vērtība pēc FDR korekcijas ir ≤ 0.05 -, tika identificētas deviņas zondes (CpG) ar statistiski būtiskām izmaiņām metilēšanā starp M0 un M10h paraugiem. Globālo metilēšanas profila izmaiņu attēlojums starp M0 un M10h paraugiem redzams 9. attēlā.



9. attēls. Nekoriģēto p-vērtību un logaritmēto M-vērtību izmaiņas starp M0 un M10h paraugiem. CpG, kuras saglabājas statistiski būtiskas arī pēc FDR korekcijas, atzīmētas sarkanas.

Figure 9. Volcano plot showing raw p-values versus log-fold change of M-values between M0 and M10h samples. The significant CpG sites (after FDR correction) are highlighted in red.

Lielākajai daļai no CpG, kuru metilēšanas intensitātes izmaiņas pirmo 10 stundu laikā tika atzītas par statistiski būtiskām, izmaiņu tendence bija novērojama arī paraugā pēc septiņu dienu ilgas metformīna lietošanas (6. pielikums). Mediāno β -vērtību izmaiņu tendences attiecīgajām zondēm attēlotas 10. attēlā.



10. attēls. Mediānā β -vērtības izmaiņa zondēm (CpG) ar vislielāko statistisko būtiskumu. Grafiku virspusē norādīta distance no CpG līdz tuvākajam TSS un ar to asociētā gēna nosaukums.

Figure 10. Median change of β -value in probes (CpGs) with highest statistical significance. In top of the graphs is shown the distance between CpG and the closest TSS and with it associated gene name.

CpG, kurās tika novērotas būtiskas metilācijas līmeņa izmaiņas, tika atbilstoši pieejamajai anotācijai asociētas ar tuvākajām gēnu TSS. Respektīvi, viena metformīna 850 mg deva var tikt saistīta ar procesiem, kuros iesaistīti sekojošie gēni: efrīna receptors B1 (*EPHB1*), proteīnu O-fukoziltransferāze 2 (*POFUT2*), 15. hromosomas atvērtais nolasīšanas rāmis 54 (*C15orf54*), transmembrānas proteīns 161A (*TMEM161A*), beta-vietā amiloīdā prekursora proteīna šķeļošais enzīms 2 (*BACE2*), kalcija/kalmodulīna atkarīgā proteīnu kināzes kināze 1 (*CAMKK1*), ribosomālais proteīns S21 (*RPS21*), ankirīns 3 (*ANK3*) un lokuss JA660620 ar vēl neidentificētām funkcijām.

DISKUSIJA

Metformīns tiek plaši lietots cukura diabēta ārstēšanā. Metformīna terapijai ir vairākas priekšrocības, tostarp zems hipoglikēmijas risks, augsta efektivitāte, neitralitāte vai pazeminoša ietekme attiecībā uz ķermeņa svaru, kardioprotektīvs efekts un tas ir ekonomiski izdevīgs (Bolen *et al.* 2007, Fung *et al.* 2015, Inzucchi *et al.* 2015). Neskatoties uz to, ir novērota liela variācija terapijas efektivitātē un blakņu attīstībā, liecinot par personalizētas pieejas nepieciešamību medikamentozās terapeitiskās stratēģijas izvēlē (Nasri and Rafieian-Kopaei 2014). Ņemot vērā nesenu parādīto saistību ar metformīna modulētu zarnu mikrobioma kompozīciju T2D pacientos, kas, visticamāk, nodrošina daļu no tā terapeitiskajiem efektiem (de la Cuesta-Zuluaga *et al.* 2016, Forslund *et al.* 2015, Wu *et al.* 2017), joprojām ir jāprecizē iespējamie šo efektu mehānismi un svarīgākās iesaistītās taksonomiskās grupas. Tāpat ir parādīta DNS metilēšanas būtiskā ietekme uz dažādu medikamentu efektivitāti un toleranci, papildinot līdz šim zināmos ģenētiskos farmakodinamiku regulējošos mehānismus (Tang *et al.* 2014). Tomēr, saistībā ar metformīna ietekmi uz DNS metilēšanu veikti trīs pētījumi (Niu *et al.* 2016, Song *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2017) sniedz tikai minimālu ieskatu šajos mehānismos. Nepilnības esošajās zināšanās norāda uz nepieciešamu turpināt pētījumus par tā darbības mehānismus ietekmējošiem sistēmiskiem faktoriem.

Maģistra darba ietvaros tika apstiprinātas dažas no līdz šim zināmajām asociācijām starp metformīna terapiju un zarnu mikrobiomu, kā arī iegūti jauni dati par metformīna ietekmētiem zarnu mikrobioma pārstāvjiem un strauji ierosināto efektu uz tiem, kas papildina esošo priekšstatu par metformīna darbības mehānismiem. Tāpat šī darba ietvaros pirmo reizi ir raksturotas metformīna terapijas ierosinātas metilēšanas profila izmaiņas cilvēkos.

Lielākā daļa no līdz šim veiktajiem pētījumiem par metformīna mijiedarbību ar zarnu mikrobiomu ir veidoti gadījumu/kontroles dizainā, kā arī bieži vien netiek kontrolēts terapijas statuss, blakusslimības kā arī nav noteikts patiesais slimības stāžs T2D pacientos pirms diagnosticēšanas un terapijas sākuma (de la Cuesta-Zuluaga *et al.* 2016, Qin *et al.* 2012). Šie faktori var radīt kļūdainas asociācijas un liegt identificēt tieši metformīna izraisītos efektus (Forslund *et al.* 2015). Tāpat jāņem vērā pēdējos gados pētītais metformīna pielietojums ārpus anti-diabētiskās terapijas, tādām slimībām kā policistisko olnīcu sindroms, Alzheimerera slimība, vēzis, kā arī T2D attīstības novēršana prediabētiskās populācijās (Abdelgadir *et al.* 2017). Mūsu izvēlētais longitudinālais pētījuma dizains, kurš iekļauj veselus indivīdus, sniedz nozīmīgu un unikālu ieskatu metformīna darbības mehānismos, kas būtu būtiski gan tā pašreizējam pielietojumam, gan arī iespējamo terapijas mērķu paplašināšanai.

Uzsākot pētījuma rezultātu interpretāciju, ir svarīgi optimizēt analīzes darba plūsmu. Šobrīd mikrobioma pētījumu datu normalizācijai (bibliotēku pārklājuma savstarpējai pielīdzināšanai) raksturīgs būtisks trūkums – šajā procesā netiek izmantota vienota metode. Jāņem vērā, ka dažādas normalizācijas metodes, izmantojot vienus un tos pašus datus, var sniegt atšķirīgus rezultātus. Piemēram, bieži tiek pielietota „izretināšanas” (*rarefying*) metode, taču tās rezultātā būtiski samazinās statistiskā jauda un tiek izmainīta analizējamo OTU savstarpējā attiecība starp paraugiem. Alternatīva pieeja ir izmantot RNS ekspresijas novērtēšanai paredzētus statistiskos rīkus, kas tika pielietoti šajā pētījumā globālai mikrobioma kompozīcijas izmaiņu datu analīzei. Tādā gadījumā OTU vai jebkura cita definētā taksonomiskā grupa tiek pielīdzināta gēnam, bet nolasījumu skaits tiek pielīdzināts vērtībām, kas raksturo gēnu ekspresiju (Fernandes *et al.* 2014, McMurdie and Holmes 2014). Šī pieeja ietver normalizāciju, kura novērš izretināšanas metodei raksturīgos trūkumus. Iegūtie rezultāti sakrīt ar vienu no klasiskajām metodēm, neparametrisko Vilkoksona testu, kas tika pielietots mērķētai grupu savstarpējai salīdzināšanai. Konsekvence rezultātos sniedz lielāku ticamību novērotajām tendencēm.

Pētījuma laikā novērotā iekšējās daudzveidības samazināšanās apstiprina iepriekš publicētos rezultātus peļu modeļos (Lee and Ko 2014). Tāpat tie saskan ar nesen publicēto metagenoma pētījumu, kas atklāja, ka metformīna lietotājiem ir augstāka zarnu mikrobioma gēnu bagātība nekā citiem T2D pacientiem, tomēr zemāka nekā veselām kontrolēm (Forslund *et al.* 2015). Jāuzsver, ka mūsu pētījumā daudzveidības samazināšanās tika novērota ļoti ātri, jau 24 stundu laikā. Protams, ņemot vērā, ka visbiežāk novērojamās blaknes metformīna terapijas laikā ir tieši gastrointestināla rakstura, varētu tikt izvirzīta hipotēze, ka tās ir iemesls samazinātajai iekšējai daudzveidībai. Tomēr, pētījuma pirmajā dienā (pirms M24h parauga nodošanas) nevienam no indivīdiem nebija caurejas, bet četri reģistrēja šķidru vēdera izeju (1 - 2 reizes dienā). Tā kā diversitātes krišanās bija konsekventi novērojama visiem pētījuma dalībniekiem, tā visticamāk varētu tikt asociēta ar vēl neskaidru nelabvēlīgu metformīna ietekmi uz zarnu mikrobioma vidi un kompozīciju. Papildus tika novērots neliels daudzveidības pieaugums starp M24h un M7 paraugiem, kas varētu norādīt uz ekoloģiskā līdzsvara atjaunošanos zarnu mikrobiomā, neskatoties uz to, ka pētījuma laikā puse no dalībniekiem reģistrēja šķidru vēdera izeju un pat caureju. Tāpat, tā kā 8.attēlā ir redzams, ka daudzveidības pieaugums notiek tikai grupās, kurās novēroja blaknes, tas varētu tikt izskaidrots ar oportūnistisko patogēnu *Escherichia-Shigella* spp. pieaugumu, kurš jau iepriekš ir novērots metformīna terapijā T2D pacientiem (Forslund *et al.* 2015, Wu *et al.* 2017). Straujais šīs ģints pieaugums un metformīna terapijas radītās nišas aizņemšana pēc diversitātes samazināšanās

varētu tikt nodrošināti ar tai piemītošo persistenci (Amato *et al.* 2013) un augstajām pielāgošanās spējām vides mainībai (Touchon *et al.* 2009).

Metformīna terapijai raksturīgajām gastrointestinālajām blaknēm parasti vērojama samazināšanās jau pirmo pāris nedēļu laikā (Haupt *et al.* 1991, Howlett and Bailey 1999). Pieņemot, ka tieši *Escherichia-Shigella* ģints īpatsvara pieaugums varētu būt viens no blakņu cēloņiem, tad vēlāk novērojamā blakņu samazināšanās varētu tikt skaidrota ar šīs taksonomiskās grupas pārstāvjiem raksturīgajiem bioenerģētikas mehānismiem, kuri gan *Escherichia*, gan *Shigella* ir līdzīgi, jo tās ir filoģenētiski tuvradnieciskas taksonomiskās grupas (Sims and Kim 2011). Ir zināms, ka *E.coli* piemīt konkurences priekšrocība, ko dod fakultatīvi anaerobā metabolisma niša, tomēr tā ir atkarīga no substrāta, ko nodrošina ar gļotādām asociētie polisaharīdus degradējošie anaerobie zarnu mikrobioma pārstāvji (Jones *et al.* 2007). Līdz ar to sākotnējais straujais īpatsvara pieaugums metformīna terapijas laikā varētu tikt ierobežots ar augšanai nepieciešamo mono- un polisaharīdu trūkumu, kas radies samazinātā anaerobo pārstāvju īpatsvara, kā arī pieaugošās konkurences pašas ģints ietvaros dēļ. Tāpat būtiska loma pieejamā substrāta limitēšanā varētu būt ar T2D terapiju saistītajai specifiskajai diētai ar samazinātu vienkāršo oglehidrātu īpatsvaru (Asif 2014). Šīs izmaiņas varētu nodrošināt mikrobiālās ekosistēmas stabilizāciju un metformīna tolerances atjaunošanos. Pētījuma rezultāti norāda uz palielinātu *Escherichia-Shigella* spp. klātbūtni paraugos pirms metformīna terapijas tiem indivīdiem, kuriem vēlāk tika novērotas blaknes. Doto sakarību varētu izmantot kā rādītāju diagnostikas testa un personalizētas terapijas izveidei (piemēram, izvēlēties specifisku metformīna formu vai papildināt terapiju ar pre- un/vai probiotikām). Tomēr, ir jāņem vērā, ka aptuveni 5% no pacientiem pārtrauc metformīna terapiju tieši nepanesamības dēļ (Kirpichnikov *et al.* 2002). Mūsu datos dažiem no indivīdiem ar blaknēm paraugā pirms metformīna lietošanas uzsākšanas nebija novērojama šīs ģints klātbūtne. Iespējams, ir nepieciešams izmantot precīzāku un jutīgāku detekcijas metodi, kas ļautu noteikt baktērijas ar zemu īpatsvaru, un pielietot citus marķierus, kas spētu izšķirt zemākus taksonomiskos līmeņus. Neskatoties uz to, ka *Escherichia-Shigella* ģints aprakstīta kā oportūnistiski patogēna, tā ietver dažādās sugas un celmus ar plašu spektru specifisko funkciju, radīto efektu un mijiedarbības veidiem (Gao *et al.* 2014), ko nav izšķirami izmantojot 16S rRNS gēna analīzi. Papildus metagenoma analīze sniegtu papildus informāciju par gēnu bagātību, sastāvu un metabolajiem signālceļiem, precizējot metformīna lietošanas asociāciju ar funkcionālām izmaiņām zarnu mikrobiomā. Protams, dotajā indivīdu grupā blakņu attīstības pamatā var būt citi, no zarnu mikrobioma neatkarīgi, mehānismi.

Novērtējot metformīna ietekmi uz zarnu mikrobioma kompozīciju, visspēcīgākā terapijas asociācija tika novērota ar *Peptostreptococcaceae* dzimtas un trīs tajā ietilpstošu ģinšu īpatsvara

samazinājumu. Šīs dzimtas pārstāvji galvenokārt tiek asociēti ar dažādām veselības problēmām. Spilgtākais piemērs ir tajā ietilpstošā *Clostridium difficile*, kas izraisa hronisku caureju ar iespējamu letālu iznākumu (Khanna and Pardi 2012). *Peptostreptococcaceae* dzimtas īpatsvara pieaugums tiek saistīts arī ar tādām slimībām kā nealkoholiskā taukaino aknu slimība (NAFLD) (Jiang *et al.* 2015), čūlainais kolīts (Lavelle *et al.* 2015) kolorektālais vēzis (Chen *et al.* 2012), kā arī tas ir asociēts ar samazinātu dzīvildzi (Zhang *et al.* 2013). Savukārt, samazināts šīs dzimtas īpatsvars ir atklāts peļu modeļos ar zemu tauku saturu diētu (Cox *et al.* 2013) un kaloriju restrikciju (Zhang *et al.* 2013). Arī vairāki pētījuma laikā samazinātās *Clostridiaceae_1* dzimtas pārstāvji ir raksturoti kā patogēnas sugas, piemēram, *C. perfringens* (Tulstrup *et al.* 2015). Šīs izmaiņas varētu norādīt uz iepriekš vēl neraksturotu pozitīvu metformīna terapijas ietekmi uz zarnu mikrobioma kompozīciju.

Pretēji tam, ka citos pētījumos metformīna terapija tiek asociēta ar labvēlīgās, SCFA producējošās *Akkermasia* ģints pieaugumu (Forslund *et al.* 2015, Lee and Ko 2014, Shin *et al.* 2013, Wu *et al.* 2017), mūsu datos tās īpatsvara izmaiņas pēc FDR korekcijas netika atzītas par būtiskām. Tas varētu tikt skaidrots ar to, ka šī ģints bija sastopama tikai 37 no 53 paraugiem un novērotās izmaiņas nebija konsekventas visos indivīdos. Iespējams, *Akkermasia* ģints sastopamība varētu variēt specifiski atkarībā no populācijas, vecuma grupas un veselības statusa.

Neskatoties uz vairākiem līdz šim veiktajiem pētījumiem, joprojām nav īsti skaidrs, vai metformīns šīs novērotās izmaiņas izraisa tieši (piemēram, ietekmējot metabolismu specifiskām baktērijām vai to grupām) vai ar sistēmiskiem efektiem (piemēram, modulējot eneterohepatisko žūltsskābju cirkulāciju) (McCreight *et al.* 2016). Ņemot vērā, ka efekts uz zarnu mikrobioma daudzveidību un taksonomisko kompozīciju ir novērojamas jau 24 stundu laikā, mūsu iegūtie rezultāti liecina par drīzāk tiešu metformīna efektu. Šo pieņēmumu apstiprina arī jaunākais pētījums par metformīna ietekmi uz zarnu mikrobiomu jaundiagnostieciem T2D pacientiem, kur papildus tika iegūti dati par tiešo metformīna ietekmi *in vitro* GI simulatorā uz tādām baktērijām kā *B. adolescentis* un *A. Muciniphila* (Wu *et al.* 2017). Tomēr nevar izslēgt, ka ilgtermiņā radītās kompozīcijas izmaiņas, kas šeit nav analizētas, tiek ietekmētas un uzturētas arī ar dažādiem metformīna ierosinātiem izraisītiem sistēmiskiem mehānismiem.

Saistībā ar metformīna sistēmisko ietekmi uz organismu, ir veikti plaši farmakodinamikas, farmakogenomikas un gēnu ekspresijas eksperimenti (Liu *et al.* 2016, Pawlyk *et al.* 2014), tomēr uz doto brīdi ir zināmi tikai trīs pētījumi par iespējamo metformīna ietekmi uz metilēšanas profilu saistībā ar gestācijas diabētu un vēža attīstību šūnu līnijās un dzīvnieku modeļos (Niu *et al.* 2016, Song *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2017). Analizējot veselu

metformīna lietotāju WBC metilēšanas profilu tika noteikti deviņi CpG ar būtiski izmainītu metilēšanas līmeni, kuri iepriekšminētajos pētījumos nav atklāti. Tas, visticamāk, ir skaidrojams ar to, ka šūnu kultūrās un dzīvnieku modeļos iegūtie rezultāti ir nepietiekami reprezentatīvi attiecībā uz cilvēka organismu (Shanks *et al.* 2009). Cilvēkos šādi pētījumi līdz šim nav veikti, kas apgrūtina iegūto rezultātu interpretāciju un salīdzināšanu ar literatūru.

Gēni, kuru TSS asociēti ar mūsu rezultātos atklātajiem CpG, ir iesaistīti dažādās organisma funkcijās. Kopumā visi šie gēni ir iedalāmi trīs grupās, kas saskan ar līdz šim aprakstītajiem iespējamajiem mērķiem metformīna terapijai: metabolie procesi, enerģijas homeostāze un svara regulācija, onkoloģija un neurodeģeneratīvās slimības (Abdelgadir *et al.* 2017).

Kā viens no interesantākajiem gēniem, ar kuru asociēts būtiski izmainīts metilēšanas līmenis ir minams *CAMKK1*. Gēns kodē kināzi, kas realizē šūnā daudzus no Ca^{2+} jonu sekundārajiem efektiem. *CAMKK1* spēj fosforilēt AMPK, kas ir būtisks šūnas enerģijas balansa sensors un plaši raksturots kā viens no metformīna darbības mehānismu centrālajiem elementiem (Pryor and Cabreiro 2015, Woods *et al.* 2005), lai gan ar zemāku efektivitāti nekā plašāk aprakstītā *CAMKK2*, kas pieder tai pašai saimei (Anderson *et al.* 1998, Fujiwara *et al.* 2016). Pie tam ir aprakstīta *CAMKK1* loma glikozes uzņemšanas regulēšanā skeleta muskuļos slodzes apstākļos, neatkarīgi no AMPK aktivācijas (Witczak *et al.* 2007), kas ir saskaņā ar metformīna glikozes līmeni pazeminošo efektu (Pryor and Cabreiro 2015).

Ņemot vērā, ka metformīna terapija pazemina ķermeņa masu, līdzīgi kontekstā ar metformīna funkcijām var minēt izmaiņas *RPS21* gēna rajona metilācijas līmenī. Līdz šim literatūrā ir minēta negatīva šī gēna ekspresijas korelācija ar KMI indivīdos pēc kuņģa apiešanas operācijas (Campbell *et al.* 2016).

Alternatīvi metformīns tiek saistīts ar audzēju attīstības inhibīciju. *EPHB1* ir tirozīnkināzes receptors, kas nodrošina divvirziena komunikāciju starp blakusesošajām šūnām. Tā ekspresijas zudums olnīcu serozās karcinomas šūnās ir asociēts ar metastāžu veidošanos un izdzīvotības samazināšanos pacientos (Wang *et al.* 2014). Savukārt, *POFUT2* gēna produkts ir enzīms, kas katalizē fukozilēšanu. Šī gēna proteīna atkarīga fukozilācija ir nepieciešama šūnu migrācijas regulācijā, tai skaitā epiteliāli-mezenhimālās tranzīcijas ierobežošanā embrionālās attīstības laikā (Du *et al.* 2010). Proteīnu fukozilācijas regulācijas traucējumi arī ir asociēti ar vēža attīstību (Baumann *et al.* 1979).

BACE2 gēna produkts funkcionē kā membrānā integrēta aspartāta proteāze, kura šķel amiloīdo priekštečproteīnu, veidojot amiloīdo beta peptīdu. Šis process ir būtisks Alzheimeras slimības un Dauna sindroma etioloģijā (Barbiero *et al.* 2003, Tanzi and Bertram 2005). Papildus amiloīdo proteīnu uzkrāšanās aizkuņģa dziedzera salīnās ir viena no T2D patofizioloģiskajām

iezīmēm, kas ir saistīta ar β -šūnu apoptozi (Butler *et al.* 2003). BACE2 gēna inhibīcija ir asociēta ar β -šūnu masas pieaugumu un tai sekojošu uzlabotu glikozes homeostāzi (Esterhazy *et al.* 2011). Tomēr informācija par BACE2 gēna nozīmi T2D patoģenēzē ir pretrunīga. Piemēram, T2D pacientiem ir konstatēta zemāka BACE2 ekspresija nekā veseliem indivīdiem (Rechsteiner *et al.* 2014).

TMEM161A ir salīdzinoši maz pētīts, bet tiek uzskatīts, ka tam ir būtiska loma oksidatīvā stresa novēršanā. Šī gēna pārekspresija samazina oksidantu ierosinātus DNS bojājumus un šūnu apoptozi (Weizmann Institute of Science 2017), kam varētu būt netieša saistība ar metformīna nozīmi pretnovecošanās procesos (Martin-Montalvo *et al.* 2013).

Pārējo trīs lokusu loma metformīna terapijas kontekstā ir neviennozīmīga. Polimorfismi ANK3 gēnā un paaugstināta tā ekspresija ir asociēta ar bipolāro slimību, šizofrēniju (Ota *et al.* 2016, Wirgenes *et al.* 2014) un to klīniskajā pazīmēm – traucējumiem kognitīvajās funkcijās un garstāvokļa regulācijā (Roussos *et al.* 2011, Roussos *et al.* 2012). C15orf54 gēnu, kurš pieder pie nekodējošo RNS saimes, un JA660620 lokusa funkcionālā nozīme līdz šim nav raksturota.

Papildus šeit aprakstītajām funkcijām un darbības mehānismiem, visticamāk, šie lokusi un to produkti ir komponenti plašākām reakciju kaskādēm. Bez papildus pētījumiem ir grūti spriest, kā ar metformīnu asociētas metilēšanas profilu izmaiņas varētu ietekmēt to aktivitāti un kaskāžu tālākajos posmos esošos elementus.

Protams, ir jāņem vērā faktors, ka šajā pētījumā tiek analizēts metilēšanas profils WBC, kas var atšķirties no metformīna ietekmes tā darbības mērķaudos, piemēram, aknās, muskuļos un enterocītos. Tāpat būtu jāizvērtē asociācija starp metilētā CpG atrašanās vietu (promoteris vai gēna reģions) un prognozējamo ietekmi uz gēna ekspresijas līmeni, kas var noteikt funkcionālo ietekmi (Hellman and Chess 2007, Suzuki and Bird 2008, Zilberman *et al.* 2007). Līdz ar to, adekvātai rezultātu interpretācijai būtu nepieciešama integratīvā analīze ar RNS ekspresijas datiem gan WBC, gan metformīna mērķaudos.

Nav pilnībā skaidrs, vai metformīnam ir tieša vai netieša ietekme uz epiģenētisko regulāciju. Vēža šūnās ir parādīta tieša saistība ar metformīnu un izmaiņām metilēšanas profilā caur H19/SAHH asi, kura rezultējas ar DNMT B3 aktivitātes palielināšanos (H19 – garā nekodējošā RNS, SAHH – S-adenozilhomocisteīna hidrolāze) (Zhong *et al.* 2017). Netieša ietekme uz DNS metilāciju varētu tikt realizēta metformīnam mijiedarbojoties ar zarnu mikrobiomu. Zarnu mikrobioma pārstāvji sekretē vielas ar zemu molekulāro masu (LMW), kuras, iespējams, mijiedarbojas ar cilvēka organisma šūnām, modulējot signālceļus un regulējot gēnu ekspresiju. Tādas LMW kā SCFA ietekmē epiģenētiskās modifikācijas, hromatīna remodelēšanu un citas signālvielas, tādējādi regulējot, piemēram, apoptozi, iekaisuma reakcijas

un šūnu diferenciāciju (Paul *et al.* 2015). Līdz ar to izmaiņas metilācijas profilos varētu būt kā atbildes reakcija uz izmaiņām mikrobioma kompozīcijā, īpaši ņemot vērā faktu, ka metformīna paaugstina SCFA producētājbaktēriju īpatsvaru (de la Cuesta-Zuluaga *et al.* 2016).

Mūsu pētījumā iegūtie dati sniedz informāciju par līdz šim neraksturotām sakarībām, kuras varētu tikt izmantotas metformīna terapijas plānošanas algoritmu pilnveidošanai un efektivitātes paredzēšanai. Precīzāka saistības definēšana starp metformīna ierosinātām izmaiņām mikrobiomā ar specifisku profilu un indivīda atbildes reakciju uz terapiju nodrošinātu pamatu klīnisko pētījumu plānošanai nākotnē, lai izveidotu probiotiskus un prebiotiskus ar mērķi uzlabot metformīna panesamību un vēlamā terapijas efekta sasniegšanu.

Tālākai rezultātu papildināšanai un jauno izvirzīto mērķu sasniegšanai ir plānots veikt metagenoma analīzi zarnu mikrobioma paraugiem, kā arī papildināt metilēšanas datus ar RNS ekspresijas līmeņa izmaiņu novērtēšanu. Tāpat sekos kopumā iegūto rezultātu validācija T2D pacientos, gan longitudinālā jaundiagnosticētu pacientu grupā, gan arī šķērseniskā pētījumā pacientiem ar vismaz 3 gadu slimības un terapijas stāžu. Rezultātu verificācijai mērķaudos plānots izmantot peļu modeļus. Visu augstākminēto faktoru integrētās analīzes rezultāts varētu papildināt zināšanas par metformīna darbību molekulārā līmenī, kā arī veicināt neinvazīvu marķieru attīstību klīniskajā praksē.

SECINĀJUMI

1. Metformīna terapija rada visaptverošas izmaiņas cilvēka zarnu mikrobioma kompozīcijā ģints līmenī.
2. Metformīns jau 24 stundu laika periodā būtiski samazina zarnu mikrobioma iekšējo daudzveidību.
3. Iekšējās daudzveidības samazināšanās rezultātā atbrīvotā niša nodrošina iespēju savairoties oportūnistiskajiem patogēniem, tādiem kā *Escherichia-Shigella* spp., kas varētu būt viens no metformīna terapijas laikā novēroto gastrointestinālo blakņu cēloņiem.
4. Ar dažādiem veselības traucējumiem asociētās dzimtas *Peptostreptococcaceae* īpatsvara samazinājums metformīna terapijas laikā, domājams, ir viens no faktoriem, kas nodrošina medikamenta pozitīvos efektus.
5. Metformīna lietošanas asociācija ar izmaiņām DNS metilēšanas profilā liecina par tiešu ietekmi uz gēnu ekspresiju caur epiģenētiskajiem mehānismiem.
6. Gēni, kuriem metformīna ietekmē izmainīts metilēšanas līmenis, ir saistīti ar līdz šim aprakstītiem iespējamajiem metformīna terapijas mērķiem: (1) ar enerģijas homeostāzes regulāciju saistītie metabolie procesi, (2) onkoloģija un (3) neurodeģeneratīvās slimības.

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Maģistra darba izstrādes laikā sagatavotas sekojošas publikācijas:

1. Ilze Elbere, Ineta Kalnina, Ivars Silamikelis, Ilze Konrade, Linda Zaharenko, Ilze Radovica, Davids Fridmanis, Dita Gudra, Valdis Pirags, Janis Klovinis. *Association of metformin treatment with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers*. (Manuskripts)

KONFERENČU TĒZES

Maģistra darba rezultāti ziņoti sekojošās konferencēs

1. Janis Klovinis, Ilze Elbere*, Raitis Peculis, Ineta Kalnina, Linda Zaharenko, Ilze Konrade & Valdis Pirags. *Alterations in DNA methylation from peripheral blood cells in humans threated with metformin*. 19th European Congress of Endocrinology. Lisbon, Portugal, 20.-23.05.2017., abstract book (oral communications).
2. Ilze Elbere*, Ineta Kalnina, Ivars Silamikelis, Ilze Konrade, Linda Zaharenko, Ilze Radovica, Davids Fridmanis, Dita Gudra, Valdis Pirags, Janis Klovinis. *Changes induced by a weeklong metformin treatment in the human gut microbiome*. AZ Nordic Baltic Diabetes Science Forum. Gothenburg, Sweden, 19.-20.01.2017., abstract book.
3. Ilze Elbere*, Ineta Kalnina, Ivars Silamikelis, Ilze Konrade, Linda Zaharenko, Ilze Radovica, Davids Fridmanis, Dita Gudra, Valdis Pirags, Janis Klovinis. *Association of metformin treatment with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers*. 2nd annual European Microbiome Congress. London, UK, 30.11-01.12.2016., abstract book.

* prezentējošais autors

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam assoc. prof. Dr.biol. Jānim Kloviņam par iespēju izstrādāt maģistra darbu LV BMC un konsultēšanu darba tapšanā. Īpašs paldies darba līdzvadītājam Dr. biol. Inetai Kalniņai. Vēlos pateikties MSc. biol. Ivaram Silamiķelim par konsultēšanu un palīdzību datu analīzes procesā. Paldies arī Dr. biol. Dāvidam Fridmanim, MSc. biol. Raitim Pečulim un MSc. biol. Ditai Gudrajai par dotajiem padomiem. Pateicība Dr.med. Ģirtam Šķesterim par maģistra darba recenziju.

Paldies sadarbības partneriem, Helgi B. Schiöth un pārējiem zinātniskās grupas pārstāvjiem Upsalas Universitātē, Funkcionālās farmakoloģijas nodaļā, Upsalā, Zviedrijā.

Pētījuma finansējums:

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

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdelgadir, E., Ali, R., Rashid, F. and Bashier, A. 2017. Effect of Metformin on Different Non-Diabetes Related Conditions, a Special Focus on Malignant Conditions: Review of Literature. - *J Clin Med Res*, 9 (5): 388-395.
2. Amato, S. M., Orman, M. A. and Brynildsen, M. P. 2013. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. - *Mol Cell*, 50 (4): 475-87.
3. American Diabetes Association 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. - *Diabetes Care*, 31 Suppl 1 S55-60.
4. American Diabetes Association 2010. Standards of medical care in diabetes--2010. - *Diabetes Care*, 33 Suppl 1 S11-61.
5. Anderson, K. A., Means, R. L., Huang, Q. H., Kemp, B. E., Goldstein, E. G., Selbert, M. A., Edelman, A. M., Fremeau, R. T. and Means, A. R. 1998. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. - *J Biol Chem*, 273 (48): 31880-9.
6. Anonymous 2014. Human microbiome. http://en.wikipedia.org/wiki/Human_microbiome.
7. Anonymous 2015. Metformin (Metformin 850mg tablets). <http://www.nhs.uk/conditions/diabetes-type2/pages/medicinesideeffects.aspx?condition=diabetes&medicine=metformin&preparation=Metformin%20850mg%20tablets>.
8. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Bork, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. - *Nature*, 473 (7346): 174-80.
9. Asif, M. 2014. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. - *J Educ Health Promot*, 3 1.
10. Backhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V. and Finlay, B. B. 2012. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. - *Cell Host Microbe*, 12 (5): 611-22.
11. Bailey, C. J. and Turner, R. C. 1996. Metformin. - *N Engl J Med*, 334 (9): 574-9.
12. Bailey, C. J., Wilcock, C. and Scarpello, J. H. 2008. Metformin and the intestine. - *Diabetologia*, 51 (8): 1552-3.
13. Bannister, A. J. and Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. - *Cell Res*, 21 (3): 381-95.

14. Barbiero, L., Benussi, L., Ghidoni, R., Alberici, A., Russo, C., Schettini, G., Pagano, S. F., Parati, E. A., Mazzoli, F., Nicosia, F., Signorini, S., Feudatari, E. and Binetti, G. 2003. BACE-2 is overexpressed in Down's syndrome. - *Exp Neurol*, 182 (2): 335-45.
15. Bassis, C. M., Tang, A. L., Young, V. B. and Pynnonen, M. A. 2014. The nasal cavity microbiota of healthy adults. - *Microbiome*, 2 27.
16. Baumann, H., Nudelman, E., Watanabe, K. and Hakomori, S. 1979. Neutral fucolipids and fucogangliosides of rat hepatoma HTC and H35 cells, rat liver, and hepatocytes. - *Cancer Res*, 39 (7 Pt 1): 2637-43.
17. Bergstrom, A., Skov, T. H., Bahl, M. I., Roager, H. M., Christensen, L. B., Ejlerskov, K. T., Molgaard, C., Michaelsen, K. F. and Licht, T. R. 2014. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. - *Appl Environ Microbiol*, 80 (9): 2889-900.
18. Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., Brigidi, P. and De Vos, W. 2010. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. - *PLoS One*, 5 (5): e10667.
19. Bird, A. P. 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. - *Nucleic Acids Res*, 8 (7): 1499-504.
20. Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H. C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E. B. and Brancati, F. L. 2007. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. - *Ann Intern Med*, 147 (6): 386-99.
21. Bonora, E., Cigolini, M., Bosello, O., Zancanaro, C., Capretti, L., Zavaroni, I., Coscelli, C. and Butturini, U. 1984. Lack of effect of intravenous metformin on plasma concentrations of glucose, insulin, C-peptide, glucagon and growth hormone in non-diabetic subjects. - *Curr Med Res Opin*, 9 (1): 47-51.
22. Buse, J. B., DeFronzo, R. A., Rosenstock, J., Kim, T., Burns, C., Skare, S., Baron, A. and Fineman, M. 2016. The Primary Glucose-Lowering Effect of Metformin Resides in the Gut, Not the Circulation: Results From Short-term Pharmacokinetic and 12-Week Dose-Ranging Studies. - *Diabetes Care*, 39 (2): 198-205.
23. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A. and Butler, P. C. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. - *Diabetes*, 52 (1): 102-10.
24. Campbell, L. E., Langlais, P. R., Day, S. E., Coletta, R. L., Benjamin, T. R., De Filippis, E. A., Madura, J. A., 2nd, Mandarino, L. J., Roust, L. R. and Coletta, D. K. 2016. Identification of Novel Changes in Human Skeletal Muscle Proteome After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. - *Diabetes*, 65 (9): 2724-31.
25. Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A. and Severi, C. 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. - *Ann Gastroenterol*, 28 (2): 203-209.
26. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. and Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. - *J Microbiol Methods*, 69 (2): 330-9.
27. Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K.,

- Lohani, G. P. and Mirza, W. 2017. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. - *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8 6.
28. Chen, M., Bergman, R. N., Pacini, G. and Porte, D., Jr. 1985. Pathogenesis of age-related glucose intolerance in man: insulin resistance and decreased beta-cell function. - *J Clin Endocrinol Metab*, 60 (1): 13-20.
29. Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X. and Xiang, C. 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. - *PLoS One*, 7 (6): e39743.
30. 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., Twomey, C., Hill, C., Ross, R. P. and O'Toole, P. W. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1 4586-91.
31. Cleveland Clinic 2014. Blood Glucose Test. <http://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/hic-blood-glucose-test>.
32. Cox, L. M., Cho, I., Young, S. A., Anderson, W. H., Waters, B. J., Hung, S. C., Gao, Z., Mahana, D., Bihan, M., Alekseyenko, A. V., Methe, B. A. and Blaser, M. J. 2013. The nonfermentable dietary fiber hydroxypropyl methylcellulose modulates intestinal microbiota. - *FASEB J*, 27 (2): 692-702.
33. Cox, M. J., Cookson, W. O. and Moffatt, M. F. 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. - *Hum Mol Genet*, 22 (R1): R88-94.
34. David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., Erdman, S. E. and Alm, E. J. 2014. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. - *Genome Biol*, 15 (7): R89.
35. David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. and Turnbaugh, P. J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. - *Nature*, 505 (7484): 559-63.
36. de la Cuesta-Zuluaga, J., Mueller, N. T., Corrales-Agudelo, V., Velásquez-Mejía, E. P., Carmona, J. A., Abad, J. M. and Escobar, J. S. 2016. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. - *Diabetes Care*,
37. DeFronzo, R. A., Buse, J. B., Kim, T., Burns, C., Skare, S., Baron, A. and Fineman, M. 2016. Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. - *Diabetologia*, 59 (8): 1645-54.
38. Dollive, S., Peterfreund, G. L., Sherrill-Mix, S., Bittinger, K., Sinha, R., Hoffmann, C., Nabel, C. S., Hill, D. A., Artis, D., Bachman, M. A., Custers-Allen, R., Grunberg, S., Wu, G. D., Lewis, J. D. and Bushman, F. D. 2012. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. - *Genome Biol*, 13 (7): R60.
39. Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. and Knight, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (26): 11971-5.
40. Donaldson, G. P., Lee, S. M. and Mazmanian, S. K. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. - *Nat Rev Microbiol*, 14 (1): 20-32.

41. Du, J., Takeuchi, H., Leonhard-Melief, C., Shroyer, K. R., Dlugosz, M., Haltiwanger, R. S. and Holdener, B. C. 2010. O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats restricts epithelial to mesenchymal transition (EMT) and maintains epiblast pluripotency during mouse gastrulation. - *Dev Biol*, 346 (1): 25-38.
42. Dupont, C., Armant, D. R. and Brenner, C. A. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. - *Semin Reprod Med*, 27 (5): 351-7.
43. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. and Relman, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. - *Science*, 308 (5728): 1635-8.
44. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. and Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. - *Bioinformatics*, 27 (16): 2194-200.
45. Enright, E. F., Gahan, C. G., Joyce, S. A. and Griffin, B. T. 2016. The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome. - *Yale J Biol Med*, 89 (3): 375-382.
46. Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. - *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1 R50-9.
47. Esterhazy, D., Stutzer, I., Wang, H., Rechsteiner, M. P., Beauchamp, J., Dobeli, H., Hilpert, H., Matile, H., Prummer, M., Schmidt, A., Lieske, N., Boehm, B., Marselli, L., Bosco, D., Kerr-Conte, J., Aebersold, R., Spinaz, G. A., Moch, H., Migliorini, C. and Stoffel, M. 2011. Bace2 is a beta cell-enriched protease that regulates pancreatic beta cell function and mass. - *Cell Metab*, 14 (3): 365-77.
48. Fan, P., Liu, P., Song, P., Chen, X. and Ma, X. 2017. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. - *Sci Rep*, 7 43412.
49. Fernandes, A. D., Reid, J. N., Macklaim, J. M., McMurrough, T. A., Edgell, D. R. and Gloor, G. B. 2014. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. - *Microbiome*, 2 15.
50. Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Krogh Pedersen, H., Arumugam, M., Kristiansen, K., Voigt, A. Y., Vestergaard, H., Hercog, R., Igor Costea, P., Kultima, J. R., Li, J., Jorgensen, T., Levenez, F., Dore, J., Meta, H. I. T. c., Nielsen, H. B., Brunak, S., Raes, J., Hansen, T., Wang, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. and Pedersen, O. 2015. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. - *Nature*, 528 (7581): 262-6.
51. Fujiwara, Y., Kawaguchi, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M. and Tokumitsu, H. 2016. Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms. - *J Biol Chem*, 291 (26): 13802-8.
52. Fung, C. S., Wan, E. Y., Wong, C. K., Jiao, F. and Chan, A. K. 2015. Effect of metformin monotherapy on cardiovascular diseases and mortality: a retrospective cohort study on Chinese type 2 diabetes mellitus patients. - *Cardiovasc Diabetol*, 14 137.
53. Gao, Y. D., Zhao, Y. and Huang, J. 2014. Metabolic modeling of common *Escherichia coli* strains in human gut microbiome. - *Biomed Res Int*, 2014 694967.
54. Gilbert, J. A. and Dupont, C. L. 2011. Microbial metagenomics: beyond the genome. - *Ann Rev Mar Sci*, 3 347-71.

55. Giugliano, D., De Rosa, N., Di Maro, G., Marfella, R., Acampora, R., Buoninconti, R. and D'Onofrio, F. 1993. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. - *Diabetes Care*, 16 (10): 1387-90.
56. Goldenberg, R. and Punthakee, Z. 2013. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. - *Can J Diabetes*, 37 Suppl 1 S8-11.
57. Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P. and Huse, S. M. 2016. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. - *Microbiome*, 4 15.
58. Grice, E. A. and Segre, J. A. 2013. The skin microbiome. - *Nat Rev Microbiol*, 9 (4): 244-53.
59. Guarino, A., Quigley, E. M. M. and W.A., W. 2013. Probiotic Bacteria and Their Effect on Human Health and Well-Being. Ettlingen, Karger Medical and Scientific Publishers,
60. Guarner, F. and Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. - *Lancet*, 361 (9356): 512-9.
61. Gui, J., Liu, Q. and Feng, L. 2013. Metformin vs insulin in the management of gestational diabetes: a meta-analysis. - *PLoS One*, 8 (5): e64585.
62. Hamilton, J. P. 2011. Epigenetics: principles and practice. - *Dig Dis*, 29 (2): 130-5.
63. Harrison County Health Department 2015. Collecting a Stool Specimen. http://www.harrisoncountyhealth.com/food_poisoning.htm.
64. Haupt, E., Knick, B., Koschinsky, T., Liebermeister, H., Schneider, J. and Hirche, H. 1991. Oral antidiabetic combination therapy with sulphonylureas and metformin. - *Diabete Metab*, 17 (1 Pt 2): 224-31.
65. Hawkins, A. K. and O'Doherty, K. C. 2011. "Who owns your poop?": insights regarding the intersection of human microbiome research and the ELSI aspects of biobanking and related studies. - *BMC Med Genomics*, 4 72.
66. Hellman, A. and Chess, A. 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. - *Science*, 315 (5815): 1141-3.
67. Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., Christensen, B. C., Marsit, C. J., Nelson, H. H., Wiencke, J. K. and Kelsey, K. T. 2012. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. - *BMC Bioinformatics*, 13 86.
68. Howlett, H. C. and Bailey, C. J. 1999. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. - *Drug Saf*, 20 (6): 489-503.
69. Huertas, D., Sendra, R. and Munoz, P. 2009. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. - *Epigenetics*, 4 (1): 31-42.
70. Hundal, R. S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S. E., Schumann, W. C., Petersen, K. F., Landau, B. R. and Shulman, G. I. 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. - *Diabetes*, 49 (12): 2063-9.
71. Hunt, D. E., Klepac-Ceraj, V., Acinas, S. G., Gautier, C., Bertilsson, S. and Polz, M. F. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. - *Appl Environ Microbiol*, 72 (3): 2221-5.
72. International Diabetes Federation 2017. Diabetes: facts and figures. <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>.

73. Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A. L., Tsapas, A., Wender, R. and Matthews, D. R. 2015. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. - *Diabetes Care*, 38 (1): 140-9.
74. Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R. and Gordon, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. - *Nature*, 486 (7402): 222-7.
75. Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Hu, Y., Li, J. and Liu, Y. 2015. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. - *Sci Rep*, 5 8096.
76. Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Fabich, A. J., Anderson, A., Schreiner, D. M., House, A. L., Autieri, S. M., Leatham, M. P., Lins, J. J., Jorgensen, M., Cohen, P. S. and Conway, T. 2007. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. - *Infect Immun*, 75 (10): 4891-9.
77. Kacem, S. and Feil, R. 2009. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. - *Mamm Genome*, 20 (9-10): 544-56.
78. Khachatryan, Z. A., Ktsoyan, Z. A., Manukyan, G. P., Kelly, D., Ghazaryan, K. A. and Aminov, R. I. 2008. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. - *PLoS One*, 3 (8): e3064.
79. Khanna, S. and Pardi, D. S. 2012. *Clostridium difficile* infection: new insights into management. - *Mayo Clin Proc*, 87 (11): 1106-17.
80. Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I. and Sowers, J. R. 2002. Metformin: an update. - *Ann Intern Med*, 137 (1): 25-33.
81. Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. - *Cell*, 128 (4): 693-705.
82. Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D. and Knight, R. 2011. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. - *Nat Rev Genet*, 13 (1): 47-58.
83. Landes Bioscience 2013. *Diabetes: An Old Disease, a New Insight*. New York, Springer Science & Business Media,
84. Lavelle, A., Lennon, G., O'Sullivan, O., Docherty, N., Balfe, A., Maguire, A., Mulcahy, H. E., Doherty, G., O'Donoghue, D., Hyland, J., Ross, R. P., Coffey, J. C., Sheahan, K., Cotter, P. D., Shanahan, F., Winter, D. C. and O'Connell, P. R. 2015. Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. - *Gut*, 64 (10): 1553-61.
85. Lee, H. and Ko, G. 2014. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. - *Appl Environ Microbiol*, 80 (19): 5935-43.
86. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. and Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. - *Nature*, 444 (7122): 1022-3.
87. Liang, C., Tseng, H. C., Chen, H. M., Wang, W. C., Chiu, C. M., Chang, J. Y., Lu, K. Y., Weng, S. L., Chang, T. H., Chang, C. H., Weng, C. T., Wang, H. M. and Huang, H. D. 2017. Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. - *BMC Genomics*, 18 (Suppl 1): 932.
88. Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson,

- J. A., Ren, B. and Ecker, J. R. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. - *Nature*, 462 (7271): 315-22.
89. Liu, Z. Q., Song, X. M., Chen, Q. T., Liu, T., Teng, J. T., Zhou, K. and Luo, D. Q. 2016. Effect of metformin on global gene expression in liver of KKAy mice. - *Pharmacol Rep*, 68 (6): 1332-1338.
90. Lopez-Serra, L. and Esteller, M. 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. - *Br J Cancer*, 98 (12): 1881-5.
91. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. and Knight, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. - *Nature*, 489 (7415): 220-30.
92. Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M. and Misteli, T. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. - *Science*, 327 (5968): 996-1000.
93. Lunn, J. C., Kuhnle, G., Mai, V., Frankenfeld, C., Shuker, D. E., Glen, R. C., Goodman, J. M., Pollock, J. R. and Bingham, S. A. 2007. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. - *Carcinogenesis*, 28 (3): 685-90.
94. Mayer, E. A., Padua, D. and Tillisch, K. 2014. Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? - *Bioessays*, 36 (10): 933-9.
95. Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., Scheibye-Knudsen, M., Gomes, A. P., Ward, T. M., Minor, R. K., Blouin, M. J., Schwab, M., Pollak, M., Zhang, Y., Yu, Y., Becker, K. G., Bohr, V. A., Ingram, D. K., Sinclair, D. A., Wolf, N. S., Spindler, S. R., Bernier, M. and de Cabo, R. 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. - *Nat Commun*, 4 2192.
96. McCreight, L. J., Bailey, C. J. and Pearson, E. R. 2016. Metformin and the gastrointestinal tract. - *Diabetologia*, 59 (3): 426-35.
97. McMurdie, P. J. and Holmes, S. 2014. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. - *PLoS Comput Biol*, 10 (4): e1003531.
98. Milani, C., Hevia, A., Feroni, E., Duranti, S., Turrone, F., Lugli, G. A., Sanchez, B., Martin, R., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Margolles, A. and Ventura, M. 2013. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. - *PLoS One*, 8 (7): e68739.
99. Miller B. F. and Keane C. B 2005. *Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*. Saunders,
100. Mollet, C., Drancourt, M. and Raoult, D. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. - *Mol Microbiol*, 26 (5): 1005-11.
101. Morgan, X. C. and Huttenhower, C. 2012. Chapter 12: Human microbiome analysis. - *PLoS Comput Biol*, 8 (12): e1002808.
102. Napolitano, A., Miller, S., Nicholls, A. W., Baker, D., Van Horn, S., Thomas, E., Rajpal, D., Spivak, A., Brown, J. R. and Nunez, D. J. 2014. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. - *PLoS One*, 9 (7): e100778.
103. Nasri, H. and Rafieian-Kopaei, M. 2014. Metformin: Current knowledge. - *J Res Med Sci*, 19 (7): 658-64.
104. Niu, N., Liu, T., Cairns, J., Ly, R. C., Tan, X., Deng, M., Fridley, B. L., Kalari, K. R., Abo, R. P., Jenkins, G., Batzler, A., Carlson, E. E., Barman, P., Moran, S., Heyn, H., Esteller, M. and Wang, L. 2016. Metformin pharmacogenomics: a genome-wide association study to identify genetic and

epigenetic biomarkers involved in metformin anticancer response using human lymphoblastoid cell lines. - *Hum Mol Genet*,

105. Ota, M., Hori, H., Sato, N., Yoshida, F., Hattori, K., Teraishi, T. and Kunugi, H. 2016. Effects of ankyrin 3 gene risk variants on brain structures in patients with bipolar disorder and healthy subjects. - *Psychiatry Clin Neurosci*, 70 (11): 498-506.
106. Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. and Belzer, C. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? - *Front Cell Infect Microbiol*, 2 104.
107. Owen, M. R., Doran, E. and Halestrap, A. P. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. - *Biochem J*, 348 Pt 3 607-14.
108. Oxford University Press 2014. Microbiome. <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/microbiome>.
109. Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. and Olsen, G. J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. - *Advances in Microbial Ecology*, 9 1-55.
110. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. and Brown, P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. - *PLoS Biol*, 5 (7): e177.
111. Paul, B., Barnes, S., Demark-Wahnefried, W., Morrow, C., Salvador, C., Skibola, C. and Tollefsbol, T. O. 2015. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. - *Clin Epigenetics*, 7 112.
112. Pawlyk, A. C., Giacomini, K. M., McKeon, C., Shuldiner, A. R. and Florez, J. C. 2014. Metformin pharmacogenomics: current status and future directions. - *Diabetes*, 63 (8): 2590-9.
113. Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S. M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K. and Pei, Z. 2010. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. - *Appl Environ Microbiol*, 76 (12): 3886-97.
114. Pollastro, C., Ziviello, C., Costa, V. and Ciccodicola, A. 2015. Pharmacogenomics of Drug Response in Type 2 Diabetes: Toward the Definition of Tailored Therapies? - *PPAR Res*, 2015 415149.
115. Pryor, R. and Cabreiro, F. 2015. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. - *Biochem J*, 471 (3): 307-22.
116. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J. M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S. D., Nielsen, R., Pedersen, O. and Kristiansen, K. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. - *Nature*, 490 (7418): 55-60.
117. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J. M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S. D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K. and Wang, J. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. - *Nature*, 490 (7418): 55-60.

118. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glockner, F. O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. - *Nucleic Acids Res*, 41 (Database issue): D590-6.
119. Quinn, B. J., Kitagawa, H., Memmott, R. M., Gills, J. J. and Dennis, P. A. 2013. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. - *Trends Endocrinol Metab*, 24 (9): 469-80.
120. Rechsteiner, M. P., Floros, X., Boehm, B. O., Marselli, L., Marchetti, P., Stoffel, M., Moch, H. and Spinaz, G. A. 2014. Automated assessment of beta-cell area and density per islet and patient using TMEM27 and BACE2 immunofluorescence staining in human pancreatic beta-cells. - *PLoS One*, 9 (6): e98932.
121. Reik, W. and Lewis, A. 2005. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. - *Nat Rev Genet*, 6 (5): 403-10.
122. Roager, H. M., Licht, T. R., Poulsen, S. K., Larsen, T. M. and Bahl, M. I. 2014. Microbial enterotypes, inferred by the prevotella-to-bacteroides ratio, remained stable during a 6-month randomized controlled diet intervention with the new nordic diet. - *Appl Environ Microbiol*, 80 (3): 1142-9.
123. Roussos, P., Giakoumaki, S. G., Georgakopoulos, A., Robakis, N. K. and Bitsios, P. 2011. The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males. - *Bipolar Disord*, 13 (3): 250-9.
124. Roussos, P., Katsel, P., Davis, K. L., Bitsios, P., Giakoumaki, S. G., Jogia, J., Rozsnyai, K., Collier, D., Frangou, S., Siever, L. J. and Haroutunian, V. 2012. Molecular and genetic evidence for abnormalities in the nodes of Ranvier in schizophrenia. - *Arch Gen Psychiatry*, 69 (1): 7-15.
125. Saad, R., Rizkallah, M. R. and Aziz, R. K. 2012. Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. - *Gut Pathog*, 4 (1): 16.
126. Schellenberg, J., Links, M. G., Hill, J. E., Dumonceaux, T. J., Peters, G. A., Tyler, S., Ball, T. B., Severini, A. and Plummer, F. A. 2009. Pyrosequencing of the chaperonin-60 universal target as a tool for determining microbial community composition. - *Appl Environ Microbiol*, 75 (9): 2889-98.
127. Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. and Weber, C. F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. - *Appl Environ Microbiol*, 75 (23): 7537-41.
128. Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T. Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. and Zhao, K. 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. - *Cell*, 132 (5): 887-98.
129. Schuebel, K., Gitik, M., Domschke, K. and Goldman, D. 2016. Making Sense of Epigenetics. - *Int J Neuropsychopharmacol*, 19 (11):
130. Shanks, N., Greek, R. and Greek, J. 2009. Are animal models predictive for humans? - *Philos Ethics Humanit Med*, 4 2.
131. Shannon, C. E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. - *Bell System Technical Journal*, 27 (3): 379-423.
132. Shin, N. R., Lee, J. C., Lee, H. Y., Kim, M. S., Whon, T. W., Lee, M. S. and Bae, J. W. 2013. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. - *Gut*, 63 (5): 727-35.

133. Shreiner, A. B., Kao, J. Y. and Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. - *Curr Opin Gastroenterol*, 31 (1): 69-75.
134. Sims, G. E. and Kim, S. H. 2011. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/Shigella group by feature frequency profiles (FFPs). - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (20): 8329-34.
135. Slimību profilakses un kontroles centrs 2016. Statistikas dati par 2015.gadu. <http://www.spkc.gov.lv/veselibas-aprupes-statistika/>.
136. Smith, M. I., Turpin, W., Tyler, A. D., Silverberg, M. S. and Croitoru, K. 2014. Microbiome analysis - from technical advances to biological relevance. - *F1000Prime Rep*, 6 51.
137. Song, A. Q., Sun, L. R., Zhao, Y. X., Gao, Y. H. and Chen, L. 2016. Effect of insulin and metformin on methylation and glycolipid metabolism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1A of rat offspring with gestational diabetes mellitus. - *Asian Pac J Trop Med*, 9 (1): 91-5.
138. Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N. and Sonnenburg, J. L. 2010. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. - *Cell*, 141 (7): 1241-52.
139. Spor, A., Koren, O. and Ley, R. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. - *Nat Rev Microbiol*, 9 (4): 279-90.
140. Strahl, B. D. and Allis, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. - *Nature*, 403 (6765): 41-5.
141. Suzuki, M. M. and Bird, A. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. - *Nat Rev Genet*, 9 (6): 465-76.
142. Tang, J., Xiong, Y., Zhou, H. H. and Chen, X. P. 2014. DNA methylation and personalized medicine. - *J Clin Pharm Ther*, 39 (6): 621-7.
143. Tanzi, R. E. and Bertram, L. 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. - *Cell*, 120 (4): 545-55.
144. Teeling, H. and Glockner, F. O. 2012. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis--a bioinformatic perspective. - *Brief Bioinform*, 13 (6): 728-42.
145. The Human Microbiome Project Consortium 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. - *Nature*, 486 (7402): 207-14.
146. Tyler, A. D., Smith, M. I. and Silverberg, M. S. 2014. Analyzing the human microbiome: a "how to" guide for physicians. - *Am J Gastroenterol*, 109 (7): 983-93.
147. Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiappello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J. M., Gilles, A. M., Johnson, J., Le Bouguenec, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jehanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M. A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C. S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Medigue, C., Rocha, E. P. and Denamur, E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. - *PLoS Genet*, 5 (1): e1000344.
148. Tralau, T., Sowada, J. and Luch, A. 2014. Insights on the human microbiome and its xenobiotic metabolism: what is known about its effects on human physiology? - *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1-15.

149. Tulstrup, M. V., Christensen, E. G., Carvalho, V., Linnings, C., Ahrne, S., Hojberg, O., Licht, T. R. and Bahl, M. I. 2015. Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. - PLoS One, 10 (12): e0144854.
150. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R. and Gordon, J. I. 2007. The human microbiome project. - Nature, 449 (7164): 804-10.
151. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W. and Knight, R. 2012. Defining the human microbiome. - Nutr Rev, 70 Suppl 1 S38-44.
152. Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hebrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F. and Foretz, M. 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. - Acta Physiol (Oxf), 196 (1): 81-98.
153. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M. and Andreelli, F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. - Clin Sci (Lond), 122 (6): 253-70.
154. Waddington, C. H. 1942. The epigenotype. - Endeavour, 1 18 - 20.
155. Wade, W. 2017. "Development and Evaluation of Probiotics for Oral Disease" - In: book, 2nd annual European Microbiome Congress, London, UK, 30.11-01.12.2016.
156. Wang, H., Wen, J., Wang, H., Guo, Q., Shi, S., Shi, Q., Zhou, X., Liu, Q., Lu, G. and Wang, J. 2014. Loss of expression of EphB1 protein in serous carcinoma of ovary associated with metastasis and poor survival. - Int J Clin Exp Pathol, 7 (1): 313-21.
157. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. - J Bacteriol, 173 (2): 697-703.
158. Weizmann Institute of Science 2017. TMEM161A Gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMEM161A>.
159. Wirgenes, K. V., Tesli, M., Inderhaug, E., Athanasiu, L., Agartz, I., Melle, I., Hughes, T., Andreassen, O. A. and Djurovic, S. 2014. ANK3 gene expression in bipolar disorder and schizophrenia. - Br J Psychiatry, 205 (3): 244-5.
160. Witczak, C. A., Fujii, N., Hirshman, M. F. and Goodyear, L. J. 2007. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- α regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. - Diabetes, 56 (5): 1403-9.
161. Woese, C. R. and Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. - Proc Natl Acad Sci U S A, 74 (11): 5088-90.
162. Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. - Cell Metab, 2 (1): 21-33.
163. World Health Organization 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneva, WHO Press,
164. Wu, C. and Morris, J. R. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. - Science, 293 (5532): 1103-5.
165. Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D. and Lewis, J. D. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. - Science, 334 (6052): 105-8.

166. Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M. T., Caesar, R., Manneras-Holm, L., Stahlman, M., Olsson, L. M., Serino, M., Planas-Felix, M., Xifra, G., Mercader, J. M., Torrents, D., Burcelin, R., Ricart, W., Perkins, R., Fernandez-Real, J. M. and Backhed, F. 2017. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. - *Nat Med*,
167. Zapata, H. J. and Quagliarello, V. J. 2015. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. - *J Am Geriatr Soc*, 63 (4): 776-81.
168. Zaratiegui, M., Irvine, D. V. and Martienssen, R. A. 2007. Noncoding RNAs and gene silencing. - *Cell*, 128 (4): 763-76.
169. Zāļu valsts aģentūra 2017. Zāļu apraksts. <https://www.zva.gov.lv/zalu-registrs/?iss=1&lang=lv&q=&ON=Metforal&SN=&NAC=on&RN=&ESC=on&AK=&SAT=on&RA=&DEC=on&LB=&PIM=on&MFR=&MDO=&IK=>.
170. Zhang, C., Li, S., Yang, L., Huang, P., Li, W., Wang, S., Zhao, G., Zhang, M., Pang, X., Yan, Z., Liu, Y. and Zhao, L. 2013. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. - *Nat Commun*, 4 2163.
171. Zhong, T., Men, Y., Lu, L., Geng, T., Zhou, J., Mitsuhashi, A., Shozu, M., Maihle, N. J., Carmichael, G. G., Taylor, H. S. and Huang, Y. 2017. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. - *Oncogene*, 36 (17): 2345-2354.
172. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Moller, D. E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. - *J Clin Invest*, 108 (8): 1167-74.
173. Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T. and Henikoff, S. 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. - *Nat Genet*, 39 (1): 61-9.

Pielikumi

Anketa par metformīna
nepanesamību/novērotajām blaknēm

KODS:

1. Vai pētījuma laikā izmainījāt savu ierasto diētu?

- JĀ NĒ

2. Vai vienmēr lietojāt metformīnu ēšanas laikā/neilgi pēc tās?

- JĀ NĒ

3. Vai novērojāt blaknes metformīna lietošanas laikā?

- JĀ NĒ

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

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

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

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

- JĀ NĒ

Ja atbildējāt JĀ, tad kurā pētījuma dienā? _____

Cik ilgi pēc metformīna lietošanas pārtraukšanas vēl bija novērojamas blaknes?

Paldies par atbildēm!

2. pielikums
Izmantoto oligonukleotīdu saraksts

Nosaukums	Sekvence	Nukleotīdu skaits
Probio_Uni-F	5'- [CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT] CCTACGGGRSGCAGCAG-3'	40
Probio_Uni-R	5'- [CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT] ATTACCGCGGCTGCT-3'	38
Probio_Uni-F-096	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TTAAGCGGTC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	60
Probio_Uni-F-095	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CGGACAGATC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	60
Probio_Uni-F-094	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TCCGACAAGC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	60
Probio_Uni-F-092	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTAGGAACCGC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-F-091	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CGGAAGGATGC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-F-090	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTAACCACGGC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-F-089	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TCCTGAATCTC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-F-088	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CCGAACACTTC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-F-087	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TTGGCTGGAC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	60
Probio_Uni-F-086	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTTGGTTATTC) GATCCTACGGGRSGCAGCAG-3'	61
Probio_Uni-R-096	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TTAAGCGGTC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	58
Probio_Uni-R-095	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CGGACAGATC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	58
Probio_Uni-R-094	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TCCGACAAGC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	58
Probio_Uni-R-092	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTAGGAACCGC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59
Probio_Uni-R-091	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CGGAAGGATGC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59
Probio_Uni-R-090	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTAACCACGGC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59
Probio_Uni-R-089	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TCCTGAATCTC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59
Probio_Uni-R-088	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CCGAACACTTC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59
Probio_Uni-R-087	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (TTGGCTGGAC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	58
Probio_Uni-R-086	5'- [CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC] TCAG (CTTGGTTATTC) GATATTACCGCGGCTGCT-3'	59

Adaptera sekvence – []; Identifikācijas sekvence – ()

Diētas un fizisko aktivitāšu reģistrēšanas anketa un tās aizpildīšanas kritēriji

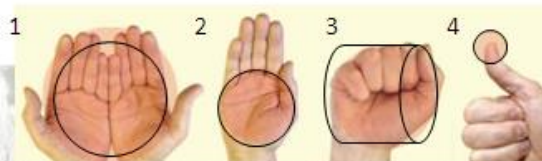
Datums _____

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

Lūdzu, atzīmējiet savu fiziskās aktivitātes līmeni:

Mazaktīvs Vidēji aktīvs Ļoti aktīvs

Ēdiena/dzēriena porcijas lieluma/tilpuma noteikšana



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



Glāze ≈ 200ml

Mazaktīvs	Vidēji aktīvs	Ļoti aktīvs
<ul style="list-style-type: none"> • Lēna pastaiga • Sēdēšana, piemēram, izmantojot datoru, makšķerējot; • Stāvēšana—“viegls” fiziskais darbs (ēst gatavošana, trauku mazgāšana); • Mūzikas instrumentu spēlēšana. 	<ul style="list-style-type: none"> • Iešana – ātri (≈5-6 km/h); • Uzkopšana - (logu mazgāšana, putekļu sūkšana, slaucīšana; mazgāšana); • Zāles pļaušana, izmantojot pļaujmašīnu; • Braukšana ar riteni (≈16 - 20km/h); • Badmintona spēlēšana (kā izklaide). 	<ul style="list-style-type: none"> • Pārgājiens; • Skriešana (≈10km/h); • Rakšana, sniega tīrīšana; • Smagumu nešana; • Braukšana ar riteni ātri(≈22- 25 km/h); • Basketbola vai futbola spēlēšana.

4.1.Dalībnieka iekļaušanas kritēriji

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

4.2.Dalībnieka izslēgšanas kritēriji

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

n) Paralēli pētījumam ir paredzēti izmeklējumi, intravaskulāri ievadot jodu saturošas kontrastvielas.

** Vecums 18 - 64 - zarnu mikrobioma pētījumos 64 gadi tiek pieņemti par robežas vecumu, no kura sākot tiek definēta senjoru grupa. Senioriem, salīdzinot ar gados jaunāku populāciju, ir novērotas atšķirības zarnu mikrobioma kompozīcijā (Claesson *et al.* 2011, Zapata and Quagliarello 2015). Šajā pētījumā tiks iesaistīti tie cilvēki vecumā līdz 64 gadiem, kuriem nav noteikta kāda no izslēgšanas kritērijos minētajām pazīmēm, citas pazīmes tiks iekļautas aprēķinos kofaktoru formā.

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

**** Pētījuma dalībnieces ar reprodukcijas potenciālu parakstot informētas piekrišanas formu papildus tiks lūgtas ar parakstu apliecināt grūtniecības neesamību.

4.3.Kontracepcijas prasības pētījuma dalībniekiem

Ņemot vērā, ka metformīns raksturojams kā medikaments ar maz ticamu teratogenitāti/fetotoksicitāti agrīnajā grūtniecībā, pētījumā iesaistītajiem vīriešiem, kuriem ir partneres ar reprodukcijas potenciālu, nav noteiktas kontracepcijas prasības.

Sievietēm ar reprodukcijas potenciālu ir jāuzsāk vai jāturpina lietot piemērota kontracepcijas metode:

1. Kombinētā (progestogēnu un estrogēnu saturoša) hormonālā kontracepcija;
2. Progestogēna hormonālā kontracepcija;
3. Intrauterīnā spirāle;
4. Hormonus atbrīvojoša intrauterīnā spirāle;
5. Partneris, kuram veikta vazektomija;
6. Pilnīga atturēšanās no dzimumdzīves;
7. Barjeras metodes (vīriešu vai sieviešu prezervatīvs ar vai bez spermicīda).

Līdz šim nav ziņoti dati par metformīna ierosinātu kontraceptīvās efektivitātes samazināšanās risku, lietojot hormononālās kontracepcijas metodes. Atbilstošā kontracepcijas metode ir jāievēro visu pētījuma periodu un jāturpina 3 dienas pēc pēdējās metformīna devas lietošanas, līdz medikaments izvadīties no organisma. Papildus grūtniecības testu veikšana pētījuma laikā nav nepieciešama.

4.4.Mijiedarbība ar citām zālēm un citi mijiedarbības veidi

Balstoties uz *Metforal* 850mg zāļu aprakstā norādīto informāciju, medikamenta vienlaicīga lietošana nav ieteicama:

- Alkohols. Akūta alkohola intoksikācija saistīta ar palielinātu laktacidozes risku, īpaši:

- badošanās vai nepietiekamas uztura uzņemšanas,
- aknu mazspējas gadījumā.

Jāizvairās no alkohola vai etilspirtu saturošu zāļu lietošanas.

- Jodu saturošas kontrastvielas. Intravaskulāra jodu saturošu kontrastvielu ievadīšana var izraisīt nieru mazspēju, kas rada metformīna uzkrāšanos un palielinātu laktacidozes risku. Metformīna lietošana jāpārtrauc pirms izmeklējuma vai tā laikā un to drīkst atsākt ne ātrāk kā pēc 48 stundām un tikai pēc atkārtotas nieru darbības novērtēšanas, konstatējot, ka tā ir normāla.

Kombinēta lietošana, kad jāievēro piesardzība:

- Zāles ar iekšēju hiperglikemizējošu darbību (piemēram, glikokortikoīdi (sistēmiski un vietēji lietoti) un simpatomimētiskie līdzekļi). Var būt nepieciešama biežāka glikozes līmeņa kontrole asinīs, īpaši ārstēšanas sākumā. Nepieciešamības gadījumā terapijas laikā ar attiecīgajām zālēm un pēc to lietošanas pārtraukšanas jāpielāgo metformīna deva.
- Diurētiskie līdzekļi, īpaši cilpas diurētiskie līdzekļi iespējamās nieru darbības pavājināšanas dēļ var palielināt laktacidozes risku.
- AKE inhibitori var pazemināt glikozes līmeni asinīs. Nepieciešamības gadījumā pret diabēta zāļu deva jāpielāgo terapijas laikā ar citām zālēm un pēc to lietošanas pārtraukšanas.
- Organisko katjonu transportmolekulu-2 (OCT2) transportētas zāles, piemēram, ranolazīns un cimetidīns.

4.5.Slimības/stāvokļi, kuru dēļ nevar lietot metformīnu jeb kontrindikācijas

Metformal 850mg zāļu aprakstā minētās kontrindikācijas:

1. Paaugstināta jutība pret aktīvo vielu vai jebkuru no metformīna sastāvā esošajām palīgvielām (Hipromeloze, Povidons K 25, Magnija stearāts (Ph. Eur.), Hipromeloze, Makrogols 6000, Titāna dioksīds (E 171)).
2. Diabētiskā ketoacidoze, diabētiskā prekoma.
3. Nieru mazspēja vai nieru darbības traucējumi (kreatinīna klīrenss < 60 ml/min).
4. Akūti stāvokļi ar potenciālu ietekmi uz nieru darbību, piemēram,
 - a. dehidratācija,
 - b. smaga infekcija,
 - c. šoks.
5. Intravaskulāra jodu saturošu kontrastvielu ievadīšana.
6. Akūta vai hroniska slimība, kas var izraisīt audu hipoksiju, piemēram,
 - a. sirds vai elpošanas mazspēja,
 - b. nesēn pārciests miokarda infarkts,
 - c. šoks.
7. Aknu mazspēja, akūta saindēšanās ar alkoholu, alkoholisms.

Bioinformātiskās darba plūsmas optimizācijas raksturojums

Parametrs <i>mothur Miseq SOP</i> darba plūsmā	Parametrs pētījumam specifiskajā optimizētajā darba plūsmā
<i>screen.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>maxlength=275</i> 	<i>screen.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>milenght=75</i> • <i>maxhomop=8</i>
<i>align.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>flip=F</i> 	<i>align.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>flip=T</i>
<i>classify.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=80</i> • <i>iters=100</i> 	<i>classify.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=60</i> • <i>iters=1000</i>
<i>dist.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=0.03</i> 	<i>dist.seqs</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=0.05</i>
<i>cluster</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=0.03</i> 	<i>cluster</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cutoff=0.01</i>
<i>classify.otu</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>label=0.03</i> 	<i>classify.otu</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>label=0.01</i>

6.pielikums.
Galvenās statistiski būtiskās izmaiņas CpG metilācijas līmeņos

Zondes ID	TSS tuvākais gēns	P – vērtība [FDR]		
		M0 vs. M10h	M10h vs. M7d	M0 vs. M7d
cg13316587	EPHB1	7.92E-08 [0.03]	0.0067 [0.76]	0.00015 [0.42]
cg24752836	JA660620	1.38E-07 [0.032]	1.63E-05 [0.39]	0.13 [0.88]
cg03515060	POFUT2	4.17E-07 [0.048]	0.56 [0.98]	5.62692E-07 [0.26]
cg22708897	C15orf54	5.26E-07 [0.048]	0.00033 [0.67]	0.031 [0.78]
cg11385013	TMEM161A	6.76E-07 [0.048]	3.89E-05 [0.54]	0.21 [0.91]
cg04931063	BACE2	6.91E-07 [0.048]	0.00025 [0.67]	0.051 [0.81]
cg18394557	CAMKK1	7.26E-07 [0.048]	0.31 [0.96]	4.18E-06 [0.28]
cg04146405	RPS21	9.49E-07 [0.049]	3.39E-07 [0.16]	0.40 [0.95]
cg16915506	ANK3	9.51E-07 [0.049]	0.0010 [0.68]	0.017 [0.73]

Maģistra darbs “Ar metformīna lietošanu asociētas izmaiņas cilvēka zarnu mikrobioma sastāvā un DNS metilēšanas profilos” tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

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

Autors: Ilze Elbere _____ 05.06.2017.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Jānis Kloviņš _____ 05.06.2017.

Recenzents: Dr. med. Ģirts Šķenders _____

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 06.06.2015.

Lietvede: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē
13.06.2017. prot. Nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs: _____