

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

Sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība un dinamika antidiabētiskās
terapijas laikā

Bakalaura darbs

Autors: Mišela Sivaka

Stud. apl.nr. ms19037

Darba vadītājas:

Dr.biol. Monta Brīvība

Dr.biol. Ilze Elbere

Recenzents: Dr.biol. Ineta Kalniņa

RĪGA 2022

Saturs

Kopsavilkums	3
Abstract	5
Lietotie saīsinājumi	6
Ievads	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Cilvēka zarnu mikrobioms	9
1.1.1. Cilvēka mikrobioms	9
1.1.2. Zarnu mikrobioma raksturojums	9
1.1.3. Zarnu mikrobioma paraugu ievākšana	11
1.2. Cukura diabēts	11
1.2.1. Pirmā tipa cukura diabēts	12
1.2.2. Otrā tipa cukura diabēts	12
1.2.3. Gestācijas cukura diabēts	13
1.3. Metformīns	14
1.4. Imūnglobulīni	15
1.4.1. Imūnglobulīns A	17
1.4.2. Imūnglobulīna A loma zarnu mikrobiomā	19
2. MATERIĀLI UN METODEDES	21
2.1. Materiāli	21
2.1.1. Izmantotās iekārtas un materiāli	21
2.2. Metodes	26
2.2.1. Pētījuma dizains	26
2.2.2. Ar sIgA pārklāto baktēriju šķirošana, izmantojot magnētiskās lodītes	27
2.2.3. DNS izolēšana ar automatizēto platformu MGISP-960 (MGI Tech)	28
2.2.4. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana	29
2.2.5. DNS paraugu fragmentācija, izmantojot Covaris sistēmu	30
2.2.6. DNS fragmentu galu apstrāde - End repair un A-tailing	30
2.2.7. Attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm	30
2.2.8. Adapteru ligēšana	31
2.2.9. Attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm	32
2.2.10. Amplifikācija	32
2.2.11. DNS kvalitātes noteikšana	33
2.2.12. Darbu drošība	34
2.2.13. Sekvenēšana ar MGIEasy sekvenatoru	34

2.2.14. Datu analīze	35
3. REZULTĀTI	36
4. DISKUSIJA	42
Secinājumi	46
Pateicības	47
Izmantotās literatūras avotu saraksts	48
Pielikumi	58

Kopsavilkums

Metformīns ir viens no visplašāk izmantotajiem medikamentiem 2.tipa cukura diabēta (T2D) ārstēšanā. Papildus glikozes izdales samazināšanai aknās un glikozes uzņemšanas palielināšanai muskuļos, arvien vairāk pierādījumu liecina, ka zarnu mikrobioms ir metformīna galvenā darbības vieta. Jaunākie pētījumi liecina, ka metformīns būtiski maina zarnu mikrobiomu T2D pacientiem. Sekretorajam IgA ir svarīga loma zarnu, elpceļu un uroģenitālās gļotādas epitēlija aizsardzībā un homeostatiskā regulēšanā, kā arī mijiedarbībā ar mikrobiomu. Metformīna terapijas laikā tika ievākti fēču paraugi no 19 jaundiagnostieciem T2D pacientiem (trīs laika punktos) un astoņām veselām kontrolēm (divos laika punktos), kurus raksturoja, izmantojot visa metagenoma sekvenēšanu. Iegūtie rezultāti liecina, ka metformīna lietošana pēc trīs mēnešu metformīna terapijas T2D pacientiem novērojams *Roseburia*, *Alistipes* un *Rikenellaceae* lielāks baktēriju īpatsvars (*Presort* paraugos) un *Proteobacteria* sIgA+ frakcijās. Veseliem indivīdiem ir novērojams *Enterobacterales*, *Proteobacteria* un *Gammaproteobacteria* lielāks baktēriju īpatsvars IgA+ frakcijās.

Darbs tika izstrādāts no 09.2021 līdz 30.05.2022 Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Atslēgas vārdi: metformīns, zarnu mikrobioms, cukura diabēts, sekretorais IgA.

Abstract

Metformin is one of the most commonly used drugs for the treatment of type 2 diabetes. In addition to reducing hepatic glucose output and increasing muscle glucose uptake, there is increasing evidence that the intestinal microbiome is the major site of action of metformin. Recent studies suggest that metformin significantly alters intestinal microbiome in patients with T2D and scientists have identified the gut as a potential target of metformin. The secretory immunoglobulin A (sIgA) plays an important role in the protection and homeostatic regulation of the intestinal, respiratory, and urogenital mucosal epithelium. During metformin therapy, fecal samples were collected from 19 newly diagnosed T2D patients (three time points) and eight healthy controls (two time points), which were characterized using whole metagenoma sequencing. Metformin administration in the T2D cohort induced an increase in abundance of *Roseburia*, *Alistipes* and *Rikenellaceae* (Presort samples) and increase of *Proteobacteria* in sIgA+ fraction. In healthy controls, we observed an increase in abundance of *Enterobacterales*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria* in IgA+ fraction.

The work was developed at Latvian Biomedical Research and Study Centre from 09.2021 to 30.05.2022

Keywords: metformin, gut microbiome, diabetes mellitus, secretory IgA

Lietotie saīsinājumi

ASV - amplikonu sekvenču variants
DM - cukura diabēts
DNS - dezoksiribonukleīnskābe
GDM - gestācijas diabēts
HbA1c - glikētais hemoglobīns
IgA - imūnglobulīns A
IgD - imūnglobulīns D
IgE - imūnglobulīns E
IgG - imūnglobulīns G
IgM - imūnglobulīns M
M0 - mikrobioma paraugi pirms metformīna lietošanas
M3m - mikrobioma paraugi pēc 3 mēnešu metformīnu lietošanas
M7 - mikrobioma paraugi pēc 7 dienu metformīnu lietošanas
NK - negatīvā kontrole
PBS - fosfātu buferšķīdums
PCR - polimerāzes ķēdes reakcija
PERMANOVA - permutāciju analīze
pIg - polimēru polimēru imūnglobulīna receptors
pIgR - polimēru imūnglobulīna receptors
Presort - nesortēti paraugi
RT - istabas temperatūra
SC - sekrēcijas komponents
sIgA - sekretorā imūnglobulīns A
T1D - 1.tipa cukura diabēts
T2D - 2.tipa cukura diabēts
UV - ultravioletais starojums
VIGDB - Valsts iedzīvotāju genoma datu bāze

Ievads

Cukura diabēts (latīniski *diabetes mellitus*, turpmāk DM) ir hroniska vielmaiņas slimība, kurai ir raksturīgs paaugstināts glikozes līmenis asinīs, kas laika gaitā rada nopietnas komplikācijas, piemēram, sirds un asinsvadu, acu un nervu bojājumus (pēc *World Health Organization*, 2022). Zinātnieki uzskata, ka diabēta attīstībai ir vairāki cēloņi, kas savukārt var būt vielmaiņas un hormonālā līdzsvara traucējumi (Reed et al. 2021). Pasaules Veselības Organizācija ziņo, ka 2021. gadā aptuveni 422 miljonu cilvēkiem ir diagnosticēts cukura diabēts. (pēc *World Health Organization* 2022).

Zarnu mikrobioms tiek uzskatīts par vienu no svarīgākajiem elementiem, kas veicina saimniekorganisma veselības regulēšanu. Mūsdienās izmaiņas zarnu mikrobiomā ir saistītas ar dažādām slimībām, tostarp, aptaukošanos, otrā tipa cukura diabētu un zarnu traktu slimībām (Willem M et al. 2022). Viens no visplašāk izmantotajiem medikamentiem T2D (otrā tipa cukura diabēts) ārstēšanā ir metformīns (Sanchez-Rangel, 2017). Papildus glikozes izdales samazināšanai aknās un glikozes uzņemšanas palielināšanai muskuļos, arvien vairāk pierādījumu liecina, ka zarnu mikrobioms ir metformīna galvenā darbības vieta (Wu et al. 2017). Jaunākie pētījumi ir parādījuši, ka metformīna terapija var būt saistīta ar sIgA līmeņa izmaiņām zarnās, tādējādi norādot uz iespējamu jaunu darbības mehānismu novērotajām mikrobioma izmaiņām un mikrobiomu mediētajiem terapeitiskajiem efektiem. Sekretorajam imūnglobulīnam A (sIgA) ir svarīga loma zarnu mikrobioma sastāva veidošanā un regulācijā (Wells et al. 2015). IgA ir pirmā aizsardzības līnija rezistencei pret infekcijām, inhibējot baktēriju un vīrusu adhēziju pie epitēlija šūnām un neitralizējot baktēriju toksīnus un vīrusus gan ārpusšūnu, gan intracelulāri (Pabst et al 2020). Līdz šim ir maz pētīta sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība antidiabētiskās terapijas kontekstā.

Darba mērķis: Novērtēt metformīna terapijas ietekmi uz zarnu mikrobiomu un sIgA⁺ baktēriju frakciju jaundiagnosticētiem 2. tipa cukura diabēta pacientiem un veseliem indivīdiem.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

- 1) Raksturot pētījuma dalībnieku zarnu mikrobioma daudzveidību un sastāvu;
- 2) Salīdzināt vispārīgo zarnu mikrobioma sastāvu un sIgA⁺ baktēriju frakcijas kompozīciju dažādos metformīna terapijas laika punktos;

- 3) Novērtēt vispārīgas un ar sIgA+ frakciju specifiskas zarnu mikrobioma izmaiņas metformīna lietošanas ietekmē.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cilvēka zarnu mikrobioms

1.1.1. Cilvēka mikrobioms

Cilvēka organismā ir sastopama mikroorganismu kopiena, kas būtiski ietekmē cilvēka veselības stāvokli (Ogunrinola et al. 2020). Visā pasaulē ir uzsākti mikrobiomu projekti, kuru mērķis ir izprast mikrobioma lomu un to ietekmi uz cilvēku veselību. Pirms vairāk nekā desmit gadiem par mikrobiomu bija zināms salīdzinoši maz (Davenport et al. 2017). Zināšanas par cilvēka mikrobiomu ievērojami pieauga, kad Nacionālā Veselības dienesta (*National Institute of Health*) fonds 2007. gadā izveidoja cilvēka mikrobioma pētniecības projektu (*Human Microbiome Project*) specifisku slimību un populāciju pētījumiem (Turnbaugh et al. 2007). Cilvēka mikrobioms ir būtisks cilvēka attīstībai, imunitātei un metabolismam (Mohajeri et al. 2018). Mikrobioms ir visu mikroorganismu kopums - baktērijas, sēnītes, protozoji un vīrusi, kā arī to ģenētiskais materiāls, kas mīt uz cilvēka ķermeņa un tā iekšienē konkrētā lokalizācijā, piemēram, uz ādas, mutes dobumā, elpošanas traktā, gastrointestinālajā traktā, urīnceļos un dzimumceļos (Rogers et al. 2022). Katram indivīdam ir citādāks mikrobioms, tādējādi veidojot savu unikālo mikrobiālo "pirkstu nospiedumu" (Franzosa et al. 2015). Mūsu ķermenī esošo mikroorganismu skaits ir gandrīz tāds pats vai pat lielāks, salīdzinot ar mūsu šūnu skaitu (Zhu et al. 2010). Baktērijas regulē imūnsistēmu un ražo vitamīnus, tostarp B grupas vitamīnus B12, tiamīnu un riboflavīnu, kā arī K vitamīnu, kas nepieciešams asins koagulācijai, kā arī pilda aizsargfunkciju pret citām baktērijām, kuras izraisa slimības (*Center for ecogenetics & Environmental*, 2014).

1.1.2. Zarnu mikrobioma raksturojums

Pēdējo desmit gadu laikā cilvēka zarnu mikrobioms ir plaši pētīts, jo arvien vairāk zinātnieki uzskata, ka cilvēka veselība, izņemot mūsu pašu genomu, lielā mērā ir atkarīga no mikroorganismiem, kas mīt mūsu organismā vai uz tā (Jandhyala et al. 2015). Zarnu mikrobioma sastāvā ir dažādi mikroorganismi - baktērijas, vīrusi, mikroskopiskās sēnes un arhaji (De Vos et

al. 2022). Zarnu mikrobioms ir mikroorganismu daudzveidības ziņā bagātākais un blīvākais uz tilpuma vienību (Dekaboruah et al. 2020). Dominējošie baktēriju tipi cilvēka zarnās ir *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* un *Proteobacteria* (Eckburg et al. 2005). Taču dažādās gremošanas trakta daļās atšķiras mikrobiālā kompozīcija. Kuņģī ir vismazākā iekšējā mikroorganismu daudzveidība (10^3 - 10^4 baktērijas), vislielākais baktēriju šūnu skaits ir resnajā zarnā (10^{11} - 10^{12} uz gramu zarnu satura), no kurām lielākā daļa ir anaerobas. Baktēriju skaits un iekšējā daudzveidība mainās atkarībā no fizikāliem un ķīmiskajiem apstākļiem. Mikroorganismu skaits viena cilvēka zarnu traktā var būt pat 100 triljonu šūnu, kas sver aptuveni 2-3 kilogramus. Mikrobioma sastāvā ir apmēram 100 reizes vairāk gēnu nekā cilvēka genomā, tapēc to pat mēdz dēvēt par “otro genomu” (Dekaboruah et al. 2020). Zarnu mikrobioms kodē vairāk nekā trīs miljonus gēnu, kas ražo tūkstošiem metabolītu, savukārt cilvēka genoms sastāv no aptuveni 23 000 gēniem (Zhu et al. 2010).

Jaunākie liela mēroga metagenoma pētījumi ir snieguši ieskatu tā struktūrā un funkcionālajā potenciālā. Zinātnieki ir pierādījuši, ka veselīgs zarnu mikrobioms lielā mērā ir atbildīgs par cilvēka vispārējo veselību (Jandhyala et al. 2015). Zarnu mikrobioms veic daudz nozīmīgu funkciju - piedalās gremošanas procesu regulācijā, nodrošina aizsardzību pret dažādām patogēnām baktērijām, regulē imūnas sistēmas darbību, novērš dažādu slimību patoģenēzi, producē organismam vajadzīgus vitamīnus, piemēram, K un B12, aminoskābes, īso ķēžu taukskābes (*Center for ecogenetics & Environmental*, 2014). Zarnu baktērijas ir galvenie gremošanas regulatori visā kuņģa-zarnu traktā. Komensālajām baktērijām ir svarīga loma vairāku uzturvielu un metabolītu, tostarp žultsskābju, lipīdu, aminoskābju, vitamīnu un īso ķēžu taukskābju, ekstrakcijā, sintēzē un uzsūkšanā. Vēl viena nozīmīga zarnu mikrobioma funkcija - tiek inducēts insulīnam līdzīgā augšanas faktora 1 (*IGF-1*) hormons, kā rezultātā tiek iesaistīts zarnu mikrobioms kaulu veidošanās un skeleta augšanas un attīstības procesos (Yan et al. 2016).

Zarnu mikrobioma kompozīciju un funkcijas ietekmē dažādi faktori - dzimšanas veids, ģenētika, vecums, dzimums, diēta, smēķēšana, stress, fiziskās aktivitātes, medikamenti, antibiotiku lietošana un ģeogrāfiskā atrašanās vieta (Su et al. 2021). Izjaukts zarnu mikrobioma līdzsvars jeb disbakterioze ir saistīta ar tādām slimībām kā aptaukošanos, cukura diabētu, iekaisīgo zarnu slimību, taukaino hepatozi, alcheimera slimību, autoimūnajām un metabolajām saslimšanām (Martinez et al. 2021).

1.1.3. Zarnu mikrobioma paraugu ievākšana

Fēču ievākšana ir neinvazīva metode, kura tiek viegli veikta mājas apstākļos bez jebkādas citu personu iesaistes. Zarnu mikrobioma analīzei ir nepieciešams ievākt atbilstošus paraugus - fēču paraugus vai zarnu biopsijas. Paraugus ir iespējams ievākt dažādos veidos, piemēram, ar uztriepēm un noskalojumiem (Vogtmann et al. 2017). Fēču paraugu ievieto sterilā stobriņā vai trauciņā, kas tiek iegūts no trīs dažādām vietām. Paraugus līdz nodošanai uzglabā vēsā vietā. Pētījumiem ir derīgi tikai svaigi fēču paraugi, līdz ar ko indivīdiem lūdz 12-24 stundu laikā tos nogādāt laboratorijā. Nododot paraugus, tiek lūgts ievērot prasības. Četras dienas pirms paraugu nodošanas neveikt izmaiņas ikdienas uzturā, kā arī nelietot medikamentus, kuri var saturēt dzelzi un caurejas līdzekļus (Jones et al. 2021).

1.2. Cukura diabēts

Cukura diabēts ir multifaktoriāla, hroniska slimība, ko izraisa sarežģīta ģenētisko un vides faktoru mijiedarbība (Sapra et al. 2021). DM (*Diabetes mellitus*) rodas, ja aizkuņģa dziedzeris neproducē pietiekami daudz insulīna vai arī organisms nespēj efektīvi izmantot insulīnu, ko tas producē (Cole & Florez, 2020). Ar uzturu uzņemtie oglehidrāti organismā tiek pārveidoti par glikozi, ko šūnas izmanto enerģijas iegūšanai. Aizkuņģa dziedzeris ražo hormonu insulīnu, kas palīdz glikozei iekļūt ķermeņa šūnās. Ja insulīna nav, glikoze paliek asinīs un tas izraisa cukura līmeņa paaugstināšanos (*American Diabetes Association, 2009*).

Lai samazinātu komplikāciju attīstības risku, svarīga ir cukura diabēta agrīna diagnostika un ārstēšanas uzsākšana. DM gadījumā ir nepieciešama regulāra ārsta uzraudzība (Sapra et al. 2021). Cukura līmeni asinīs var izteikt šādās mērvienībās – mg% (miligrami procentos), mg/dl (miligrami uz decilitru), mmol/L (milimoli uz litru) (Rushakoff et al. 2019). Latvijā visbiežāk cukura līmeni izsaka milimolos uz litru. Veseliem indivīdiem cukura līmenis asinīs tukšā dūšā ir no 3,3 līdz 6,1 mmol/l, savukārt pēc pārtikas uzņemšanas cukura līmenis asinīs var paaugstināties līdz 7,8 mmol/l. DM cukura līmenis asinīs tukšā dūšā pārsniedz 7 mmol/l (Bansal et al. 2020). Ja cukura līmenis asinīs ir zemāks par normas robežām, tas ir pazemināts jeb hipoglikēmija (Mathew et al. 2022).

1.2.1. Pirmā tipa cukura diabēts

Pirmā tipa cukura diabēts (T1D) lielākoties attīstās agrīnā vecumā. T1D parasti attīstās jauniem cilvēkiem, kam organisms neizstrādā insulīnu, bojātu aizkuņģa dziedzera beta šūnu dēļ (Primavera et al. 2020). Šī iemesla dēļ organisms nespēj pilnvērtīgi izmantot glikozi. Nieres sāk izvadīt lieko glikozi caur urīnizvadkanāliem. Kad organisms nonāk līdž stadijai, ka nespēj vairāk izmantot glikozi, lai saražotu tam enerģiju, no muskuļiem tiek izmantoti uzkrātie tauki un olbaltumvielas (Paschou et al. 2018). Organisma pārslodzes dēļ veidojas ketonvielas jeb acetons. Ketonvielām nonākot asinīs, cilvēkam rodas dažādas komplikācijas, piemēram, sirds un asinsvadu slimības, nieru mazspēja, čūlas uz kājām un pat aklums. Savukārt uzkrājoties ketonvielām asinīs, veidojas ketoacidoze. Slikta dūša, vemšana, sāpes vēderā, ātra un apgrūtināta elpošana, paātrināta sirdsdarbība, samaņas traucējumi, svara zudums un nogurums liecina par ketoacidozi (*Centers for Disease Control and Prevention, 2021*). T1D simptomi ir bieža urinēšana jeb poliūrija, kura procesa laikā organisms izskalo lieko glikozes daudzumu, slāpes, svara zudums un ilglaicīgs nogurums (Lucier et al. 2022). Ārstēšanas pamatā ir regulāras ikdienas insulīna injekcijas, veselīgs un sabalansēts uzturs, kā arī fiziskās aktivitātes (pēc *World Health Organisation, 2022*).

T1D tiek uzskatīts par autoimūnu slimību, kurā veidojas autoantvielas, kurā autoagresīvās T šūnas iefiltrējas aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņā un rada beta šūnām bojājumus (Lucier et al. 2022). Aizkuņģa dziedzera bojājuma dēļ organismā pazūd spēja izstrādāt tam nepieciešamo insulīnu (Paschou et al. 2018).

1.2.2. Otrā tipa cukura diabēts

Otrais tipa cukura diabēts (T2D) ir hroniska slimība, kas ir izplatīta ievērojami biežāk (Reed et al. 2021). T2D veido aptuveni 90% no visiem diabētu veidiem. Parasti tas attīstās cilvēkiem pēc 40 gadu vecuma, kuriem ir konstatēts liekais svars. Taču ir varbūtība saslimt arī jauniem cilvēkiem, kuriem ir novērojama aptaukošanās (Goyal et al. 2021). Ja sākuma stadija ir asimptomātiska vai simptomi ir viegli un tie netiek ņemti vērā laicīgi, slimību var tikt diagnosticēta novēloti. T2D ilgstoši var būt asimptomātisks, tā rezultātā slimība var būt sajaukta ar citu slimību (Gupta et al. 2013). Liekais svars un mazkustīgs dzīvesveids ir būtiskākie faktori, kas veicina T2D sākšanos. Faktori, kas arī būtiski ietekmē T2D - vecums, apkārtējā vide,

smēķēšana, hipertensija un augsts triglicerīdu līmenis (Fletcher et al. 2002). Simptomi ir līdzīgi kā T1D gadījumā, bet bieži vien mazāk izteikti, tāpēc var gadīties, ka diagnoze tiek noteikta vairākus gadus pēc saslimšanas, kad jau radušās komplikācijas. Ārstēšanas pamatā ir sabalansēts un atbilstošs uzturs, aktīvs dzīvesveids, glikozes līmeņa regulāra kontrole un atbilstošo medikamentu lietošana (Galicia-Garcia et al. 2020).

Taukaudi ir endokrīnais orgāns, kas var izdalīt vairākus hormonus un citokīnus, proti, TNF- α , IL-6, rezistīnu, kas spēj izraisīt hronisku iekaisuma stāvokli un insulīna rezistenci. T2D cilvēkiem ar aptaukošanos biežāk tiek novērots zems adiponektīna līmenis un leptīna rezistences stāvoklis. Leptīns ir būtisks hormons, kuram piemīt oreksigēnu aktivitāte, kas palīdz regulēt enerģijas bilanci, kavējot izsalkumu (Goyal et al. 2021). Adiponektīns ir adipocītu sintezēts peptīds, kam piemīt pretiekaisuma un antiaterogēna iedarbība. Šī vielmaiņas disfunkcija izraisa insulīna rezistenci, kas galvenokārt ietekmē taukaudus, muskuļus un aknu audus. Šādā situācijā insulīnam nav antilipolītiskas iedarbības, līdz ar to cirkulācijā palielinās brīvo taukskābju ražošana un sekrēcija, kas arī ir atbildīgs par insulīna rezistences stāvokli. Paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija plazmā ir saistīta ar palielinātu aknu ražošanu un glikozes sekrēciju. Turklāt palielinās arī holesterīna un triglicerīdu koncentrācija, kas negatīvi ietekmē sirds un asinsvadu sistēmu (Galicia-Garcia et al. 2020).

1.2.3. Gestācijas cukura diabēts

Gestācijas cukura diabēts jeb grūtnieču cukura diabēts (GDM) ir ogļhidrātu vielmaiņas slimība, kas rada paaugstinātu cukura līmeni asinīs un ko pirmo reizi atklāj grūtniecības laikā. GDM var klasificēt kā A1GDM un A2GDM. Gestācijas cukura diabēts, kas tiek ārstēts bez medikamentiem ir ar diētu kontrolēts gestācijas diabēts jeb A1GDM. Gestācijas diabēts, kas tiek ārstēts ar medikamentiem, lai panāktu normālu pieņemamu glikēmijas kontroli ir A2GDM (Quintanilla Rodriguez et al. 2022). Grūtnieču cukura diabēts ir īpašs cukura diabēta veids, kas neatbilst ne T1D, ne T2D, ne citiem cukura diabēta tipiem, un visbiežāk pāriet pēc bērna nākšanas pasaulē (Lende et al. 2020). Ja netiek ārstēts, tas izraisa nopietnas komplikācijas gan mātei, gan auglim. Kaut arī parasti sievietei pēc bērna piedzimšanas glikozes līmenis normalizējas, tomēr mātei un bērnam pastāv paaugstināts risks saslimt ar T2D turpmākās dzīves laikā (Cleary et al. 2021). Gestācijas cukura diabēta komplikāciju pamatā ir fakts, ka mātes glikoze spēj šķērsot placentu, bet insulīns - nē (Quintanilla Rodriguez et al. 2022). Lai izmantotu

no mātes saņemto glikozi, auglis jau agrīni izdala lielu daudzumu insulīna, bet insulīns veicina taukaudu veidošanos, radot raksturīgo augļa izmēru palielināšanos jeb makrosomiju (Plows et al. 2018).

1.3. Metformīns

Metformīns ir pirmās izvēles medikaments T2D ārstēšanā. Tas ne tikai samazina glikozes līmeni asinīs, bet arī spēj samazināt sirds un asinsvadu saslimšanas diabēta slimniekiem, kā arī mazina vēža risku (Ruisheng et al. 2016). Tā atklāšana aizsākās ar galeģīnam līdzīgo vielu sintēzi, kas tika iegūta no *Gallega officinalis* – augs, kurš Eiropā tika izmantots kā zāles diabēta ārstēšanai gadsimtu garumā (Aroda et al. 2015). Guanidīns ir *Gallega officinalis* aktīvā sastāvdaļa, savienojums, ko izmanto biguanīdu sintezēšanai. Tika apskatīti trīs galvenie biguanīdu veidi, kuri tika ieviesti diabēta terapijā 1950. gadu beigās. Zāļu efektivitāte tika pārbaudīta un apstiprināta monoterapijā, kā arī kombinācijā ar citām glikozes līmeni pazeminošām zālēm T2D ārstēšanai. Metformīnam ir augstāks drošības profils un pacienti labi panes medikamentu. Pārējie divi biguanīdi, fenformīns un buformīns, tika izņemti no tirgus 1970. gadu sākumā, jo pastāvēja laktacidozes risks un palielināta ar sirds komplikācijām saistīta mirstība. Laktācidozes sastopamība, lietojot metformīnu terapeitiskās devās, ir reta (mazāk nekā trīs gadījumi uz 100 000 pacientiem) un nav lielāka nekā metformīna terapijas nelietošanas gadījumā (Bailey et al. 2017). Galvenās metformīna priekšrocības ietver specifisku aknu glikozes izdalīšanās samazināšanos ar sekojošu perifērās insulīna jutības uzlabošanos un ievērojamu kardiovaskulāro drošību, bet nepalielinot salīņu insulīna sekrēciju, neizraisot svara pieaugumu vai neradot hipoglikēmijas risku. Vel viena šī medikamenta priekšrocība ir zemas izmaksas (Lv & Guo et al. 2020). Pamatojoties uz metformīna svarīgajām īpašībām, joprojām pastāv liela interese par šo savienojumu pat tagad, daudzus gadus pēc tā iekļaušanas farmakoloģijā (Nasri et al. 2014). Aptuveni 5% cilvēku nepanes metformīnu pat mazās devās un šī iemesla dēļ pātrauc terapiju. Simptomus var mazināt, pakāpeniski titrējot vai samazinot devu. Šīs blakusparādības var būt saistītas ar zāļu uzkrāšanos tievās zarnas enterocītos (Irons et al. 2014).

Metformīnam piemīt glikozes līmeni pazeminoša iedarbība. Tas ietekmē insulīna rezistenci ar insulīna atkarīgām un insulīna neatkarīgām reakcijām, kas aknās samazina glikozes līmeni, kā arī uzlabo perifēro glikozes patēriņu (Ruisheng et al. 2016). Zīdītājiem metformīna

biopieejamība sasniedz 50% un visvairāk uzsūcas tievajā zarnā, kas pēc tam nokļūst aknās un tiek izfiltrēts caur nierēm (Schnee et al. 1996). Metformīns netiek metabolizēts un līdz ar to tā struktūra nemainās no uzņemšanas līdz izvadīšanas brīdim. Atlikušie metformīna 50%, kuri netika absorbēti, uzkrājas tievās zarnas distālās daļas zarnu gļotādā, kura koncentrācijas var būt no 30 līdz 300 reizes lielākas nekā plazmā, kas beigās no organisma tiek izvadīts ar fēcēm. Tomēr cilvēkiem metformīna iedarbība uz zarnām joprojām nav pietiekami skaidra, lai gan eksperimentos ar dzīvniekiem ir ierosināti vairāki priekšlikumi, tostarp aizkavēta glikozes uzsūkšanās zarnās, enterocītu pastiprināta laktāta ražošana, palielināta kuņģa-zarnu trakta hormonu vai glikagonu saturošu peptīdu sekrēcija. (McCreight et al. 2016). Metformīns maina zarnu mikrobioma taksanomisko sastāvu, pastiprinot dažādu baktēriju augšanu, piemēram, *E.coli*, *Akkermansia muciniphila*, vai *Lactobacillus* (Rodriguez et al. 2018).

1.4. Imūnglobulīni

Imūnglobulīni jeb antivielas ir šķīstošu olbaltumvielu molekulas, ko sintezē B limfocītu rindas šūnas. Imūnglobulīni sastopami uz šūnu virsmas un organisma šķidrumsos kā receptori, kas izraisa specifisko humorālo imūnreaktivitāti (Angel et al. 2022). Šie glikoproteīni sastāv no vienas vai vairākām vienībām, no kurām katrs imūnglobulīns satur četras polipeptīdu ķēdes, divas identiskas smagās ķēdes (H-ķēde) un divas identiskas vieglās ķēdes (L-ķēde). Katra L ķēde sastāv no viena mainīga domēna VL un viena konstanta domēna CL. Ķēdes H sastāv no mainīga domēna VH un trīs nemainīgiem domēniem CH1, CH2 un CH3. Katrā smagajā ķēdē ir aptuveni divreiz vairāk aminoskābju un molekulmasu (~ 50 000) nekā katrai vieglajai ķēdei (~ 25 000), kā rezultātā kopējā imūnglobulīna monomēra molekulmasa ir aptuveni 150 000 (Schoeder et al. 2010). Imūnglobulīnus var iedalīt piecās kategorijās, proti, imūnglobulīns G (IgG), imūnglobulīnu (IgA), imūnglobulīna M (IgM), imūnglobulīnu D (IgD) un imūnglobulīnu E (IgE) (Angel et al. 2022). Parasti infekciju gadījumā serumā paaugstinās visu imūnglobulīna klašu koncentrācija (Gonzalez-Quintela et al. 2008). Katra klase reprezentē antivielu grupu un katrai ir mazliet atšķirīga loma. Imūnglobulīni savā starpā atšķiras pēc molekulā atrodamās smagās ķēdes. IgG molekulām ir smagās ķēdes, kas pazīstamas kā gamma ķēdes, savukārt IgM ir mu-ķēdes, IgA ir alfa ķēdes, IgE ir epsilon-ķēdes un IgD ir delta ķēdes (Angel et al. 2022). Polipeptīdu ķēžu aminoterminālu galos ir ievērojamas aminoskābju sastāva atšķirības, tos sauc par mainīgajiem C reģioniem (angliski. - *variable region*), kurus var viegli atšķirt no

nemainīgajiem V reģioniem (angliski. - *relatively constant region*). Smagās ķēdes polipeptīdu atšķirības ļauj šiem imūnglobulīniem darboties dažāda veida imūnās atbildes reakcijās un noteiktos imūnās atbildes posmos. Par šīm atšķirībām atbildīgās polipeptīdu proteīnu sekvences galvenokārt atrodamas Fc fragmentā (Schroeder et al. 2010). Imūnglobulīniem ir pieci dažādi smago ķēžu veidi, taču galvenie vieglo ķēžu veidi ir tikai divi - kappa (κ) un lambda (λ). Antiviēlu klases atšķiras pēc valences dažādu Y līdzīgu vienību (monomēru) skaita dēļ, kas savienojas, veidojot pilnīgu proteīnu. Piemēram, cilvēkiem funkcionējošām IgM antiviēlām ir piecas Y formas vienības (pentamērs), kas kopā satur 10 vieglās ķēdes, 10 smagās ķēdes un 10 antigēnu saistošas (Janeway et al. 2001).

Polimēra Ig (pIg) transportēšana gļotādas sekrēcijās ir polimēra Ig receptora (pIgR) funkcija. Receptors atrodas uz epitēlija šūnu bazolaterālās virsmas, kas klāj gļotādas virsmu. Ar membrānu saistītais pIgR sastāv no pieciem Ig līdzīgiem domēniem (kas ir sastopama ārpusšūnu daļa) ar transmembrānu un citoplazmas domēnu. Epitēlija šūnā polimēriskais IgA (ar J-ķēdi) saistās ar pIgR, tad tas tiek internalizēts un transcitēts uz apikālās šūnas membrānu. pIgR ekstracelulārā daļa tiek sadalīta, veidojot sekrēcijas komponentu (SC) un kovalenti asociējas ar polimēru IgA (pIgA). pIgA komplekss ar sekrēcijas komponentu veido sekretoro IgA (sIgA). SC veido disulfīda saiti ar Cys311 Ca² vienā no pIgA monomēriem. Šajā gadījumā J ķēde ir nepieciešama, lai sekrēcijas komponents asociētos ar pIgA (Schroeder et al. 2010).

IgG monomērs ir dominējošā Ig klase, kas atrodas cilvēka serumā. Šī imūnglobulīna klase, kas ražota kā daļa no sekundārās imūnās atbildes reakcijas pret antigēnu, veido aptuveni 75% no kopējā Ig līmeņa serumā. IgG ir vienīgā Ig klase, kas cilvēkiem var šķērsot placentu, un tā ir lielā mērā atbildīga par jaundzimušā aizsardzību pirmajos dzīves mēnešos (Angel et al. 2022). Tā relatīvā daudzuma un lieliskās specifiskuma pret antigēniem dēļ, IgG ir galvenā antiviēla, ko izmanto imunoloģiskajos pētījumos un klīniskajā diagnostikā. Galvenā atšķirība starp IgA un IgG ir sekrēcijas polipeptīda klātbūtne un trūkums. IgA ir sekrēcijas polipeptīds, kas atvieglo sekrēciju caur gļotādas virsmām, taču IgG nav sekrēcijas funkcijas, tātad nav J ķēdes (*ThermoFisher Scientific*, 2020).

IgM ir trešais visizplatītākais seruma imūnglobulīns. Seruma IgM pastāv kā pentamērs zīdītājiem un satur aptuveni 10% no normāla cilvēka seruma Ig satura. Tas dominē primārajā imūnreakcijā pret lielāko daļu antigēnu un ir visefektīvākais komplementu fiksējošais imūnglobulīns. IgM tiek ekspresēts arī uz B limfocītu plazmas membrānas kā monomērs. Šajā

formā tas ir B šūnu antigēna receptors un katra H ķēde satur papildus hidrofobu domēnu, lai nostiprinātos membrānā (*ThermoFisher Scientific, 2020*). IgM ir pirmā antivielas, kas veidojas imūnās atbildes laikā. Tas ir atbildīgs par aglutināciju un citolītiskām reakcijām. IgM galvenokārt atrodams limfas šķidrums un asinīs. Paaugstināts IgM līmenis var liecināt par nesenu infekciju vai antigēna iedarbību (Wei et al.2021).






IgE un IgD serumā ir sastopami daudz retāk un mazāk nekā citi imūnglobulīni. IgE galvenokārt aizsargā pret parazītu invāziju un ir atbildīgs par alerģiskām reakcijām. Membrānas IgD ir receptors antigēnam, kas galvenokārt atrodams uz nobriedušiem B-limfocītiem (*ThermoFisher Scientific, 2020*).

Tabula1.

Imūnglobulīnu struktūras

Table 1

Structure of immunoglobulin

IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
				

1.4.1. Imūnglobulīns A

Imūnglobulīns A veido 10–15 % no kopējā imūnglobulīnu daudzuma. IgA pastāv serumā gan monomēra, gan dimēra formā. Imūnglobulīnu A veido 2 vieglās κ vai λ ķēdes un 2 smagās $\alpha 1$ un $\alpha 2$ ķēdes (Kerr et al. 1990). IgA serumā galvenokārt ir monomērs, bet izdalījumos, piemēram, siekalās, asarās, pienā, gļotās, sviedros un kuņģa šķidrums tas ir atrodams kā dimērs, ko savieno savienojošs peptīds, izmantojot Fc daļas terminālā Ig domēna paplašinājumus, un proteīnu, ko sauc par savienojošo J ķēdi. Tā ir saistīta ar dimēra struktūru, izmantojot disulfīdu saites (Patel et al. 2022). Polipeptīds ir saistīts ar dimēra struktūru, kas darbojas kā IgA sekrēcijas polipeptīda sastāvdaļa. Sekretorais IgA nodrošina aizsardzību pret lokālām infekcijām - pret elpošanas ceļu, kuņģa zarnu trakta, urīnceļu infekcijām. IgA nešķērso transplacentāro barjeru, jo tam ir liela molekulasmasa. Ja auglim konstatē augstu IgA koncentrāciju, tas liecina par kontaktu ar mātes asinīm (Bakema et al. 2011).

Imūnglobulīns A (IgA) ir būtisks gļotādas imūnaizsardzības faktors, tādēļ to var atrast siekalās, deguna gļotās, bronhos, gremošanas sistēmas gļotās un ģenitāliju apvidū. Imūnglobulīns A ir pirmā aizsardzības līnija rezistencei pret infekcijām, inhibējot baktēriju un vīrusu adhēziju pie epitēlija šūnām un neitralizējot baktēriju toksīnus un vīrusus gan ārpusšūnu, gan intracelulāri. Selektīvs IgA deficīts sastopams apmēram 0,7 % indivīdiem. Lielākai daļai pacientu ar selektīvu IgA deficītu B šūnas ir normālā daudzumā. IgA deficīta klīniskās izpausmes var būt no pilnīga simptomu trūkuma līdz smagai klīniskai ainai. Izteiktas klīniskas ainas pacientiem ir recidivējošas infekcijas, alerģiskas un autoimūnas slimības (Woof et al. 2006).

IgA iedalās apakšklasēs IgA1 un IgA2, savukārt pelēm ir tikai viena apakšklase. Tās atšķiras pēc smago ķēžu molekulmasas un koncentrācijas serumā. IgA1 veido aptuveni 85% no kopējās IgA koncentrācijas serumā. IgA1 uzrāda labu imūnreakciju pret proteīnu antigēniem un mazākā mērā polisaharīdiem un lipopolisaharīdiem. IgA1 pamatā ir vairāki O-saistīti glikāni un divas N-saistītas glikozilācijas vietas - katrā samagajā ķēdē. IgA1 piemīt garāks viras reģions, un tā struktūrā ir papildus dublēts aminoskābju komplekts. Šis iegarenais eņģu reģions palielina IgA1 jutīgumu pret baktēriju proteāzēm, kā rezultātā tas galvenokārt tiek atrodams serumā (Patel et al. 2022).

Savukārt IgA2 veido tikai līdz 15% no kopējā IgA serumā, kam ir izšķiroša loma elpceļu, acu un kuņģa-zarnu trakta gļotādās, kas cīnās pret polisaharīdu un lipopolisaharīdu antigēniem. Tas arī parāda labu izturību pret proteolīzi un daudzām baktēriju proteāzēm, apliecinot IgA2 nozīmi cīņā pret bakteriālām infekcijām (Bakema et al. 2011). IgA2 ir saīsināts pamata reģionā ar četrām N-saistītām glikozilācijas vietām - katrā smagajā ķēdē un bez O-saistītiem glikāniem. IgA2 sastāv no īsāka reģiona, un tam trūkst aminoskābju dublikātu struktūras. Tāpēc tam nav paaugstināta jutība pret proteāzi. IgA2 galvenokārt atrodas gļotādas sekrēcijas membrānās (de Sousa-Pereira et al. 2019).

Polimēra IgA ekspresija, kas saistīta ar J ķēdi, ir gļotādas plazmas šūnu atšķirīgā iezīme un atšķir tās no plazmas šūnām daudzos citos nodalījumos, piemēram, liesā un kaulu smadzenēs. Tādējādi zarnu pIgA struktūra būtiski atšķiras no dominējošās IgA monomēra formas, kas atrodas cilvēka plazmā (de Sousa-Pereira et al. 2019). IgA polimēru struktūra ir priekšnoteikums tā aktīvai transportēšanai pa gļotādas virsmām un sekrēcijai. Šo procesu veic polimēru Ig receptors (pIgR). Tomēr pIgR ne tikai transportē multimēru IgA, bet arī veicina sekrēcijas komponentu, kas ir kovalenti saistīts ar antivielas daļu un ir neatņemama SIgA kompleksa

sastāvdaļa. Tādējādi SIgA ir himēriska molekula, ko rada gan plazmas šūnu, gan pIgR ekspresējošo (galvenokārt epitēlija) šūnu kopējā aktivitāte. Konsekventi sIgA ražošanu un sekrēciju nosaka ne tikai antivielu ražošanas ātrums plazmas šūnās, bet arī to ietekmē pIgR ekspresija un aktivitāte. Cilvēka pIgR ir glikozilēts transmembrānas proteīns, kas sastāv no pieciem Ig domēniem, kas veido pIgR ektodomēnu, ko dēvē arī par sekrēcijas komponentu (SC), īsu transmembrānu domēnu un intracelulāru domēnu. Biosintēzes laikā pIgR tiek nogādāts epitēlija šūnu bazolaterālajā pusē, kur tas saistās ar pIgA (Patel et al. 2022). Sākotnējo saistīšanos nodrošina pirmais Ig domēns, kam seko konformācijas izmaiņas molekulā, kas vēl vairāk uzlabo kompleksa stabilitāti un pirms kovalentās saites veidošanās starp pIgA un pIgR. Spēcīgi N-glikozilētā SIgA SC daļa aizsargā kompleksu no proteolīzes: tas ir būtisks ieguldījums tā funkcijās gremošanas traktā. Tomēr ir zināms, ka brīvais SC arī tieši mijiedarbojas ar zarnu baktērijām, un varētu domāt, ka SC kā daļa no SIgA kompleksa var arī piešķirt mikrobioma saistīšanās spējas. Tādējādi, apspriežot SIgA funkcijas, papildus plazmas šūnu ražotajai Fab / Fc daļai un J ķēdei ir jāņem vērā epitēlija šūnu veicinātās SC daļas īpašības. pIgR ekspresē dažādas sekrēcijas epitēlija šūnas, tostarp tās, kas klāj kuņģa-zarnu traktu un pIgA ražošana ar zarnu plazmas šūnām un transportēšana caur zarnu epitēliju visvairāk veicina kopējo zarnu SIgA sekrēciju. Tomēr interesants papildinājums zarnu sIgA ražošanai rodas no pIgR ekspresijas piena dziedzeros, kas nodrošina SIgA transportēšanu pienā, un ekspresiju aknās, kas nodrošina SIgA transportēšanu žultī (Leong et al. 2014).

1.4.2. Imūnglobulīna A loma zarnu mikrobiomā

Zarnās ir lielākais gļotādas audu skaits visā cilvēka organismā, kas sastāv no tievās zarnas, aklās zarnas un resnās zarnas. Visas uzņemtās uztura sastāvdaļas uzsūcas un sagremojas zarnu gļotādā, kuras virsmas laukums sastāda aptuveni 400 m². Šajos audos ir vislielākais imūnšūnu skaits un mikroorganismu daudzveidības ziņā bagātākais un blīvākais uz tilpuma vienību (Stecher et al. 2015).

IgA ir otrs svarīgākais izotips serumā. Sekrēcijas IgA lielākoties dominē zarnu lūmenā (Sterlin et al. 2020). Sekretorais IgA (SIgA) nodrošina aizsardzību pret patogēniem un toksīniem, bet var arī tieši saistīties ar komensālajām baktērijām zarnās un saistīt tās. Komensālā sIgA mērķēšana veido zarnu mikrobioma sastāvu, modulē baktēriju uzvedību un pastiprina saimniekorganisma un mikrobioma homeostāzi gan pelēm, gan cilvēkiem (Yang et al. 2020).

Homeostatiskā gļotādas aizsardzība sastāv no vismaz diviem atšķirīgiem šķēršļiem - epitēlija un imunoloģiskiem barjērām. Epitēlija barjera novērš mikroorganismu sistēmisku invāziju ar ciešiem savienojumiem, gļotu pārklājumu, ko veic zarnu epitēlija šūnas. Imunoloģisko barjeru var panākt IgA, kas neļauj mikroorganismiem saistīties ar zarnu epitēlija šūnām, tas nomāc mikroorganismu augšanu un virulenci, kā arī neitralizē to toksīnus. Homeostatiskos apstākļos IgA ir galvenā imūnglobulīna antivielu zarnu gļotādā. Mikroorganismi stimulē IgA veidošanos, kas kontrolē baktēriju pārvietošanos un neitralizē baktēriju toksīnus uz zarnu gļotādas virsmas (Stecher et al. 2015). Cilvēkiem un pelēm ~80% no kopējā plazmas šūnām organismā atrodas zarnu gļotādā, kur līdzsvara apstākļos (40–60 mg/kg/dienā vai 3–5 g/dienā) tās izdala dimēru IgA. Homeostatiskais IgA (kas darbojas arī kā dabiska antivielu) tiek inducēts zarnu gļotādā, nepārtraukti stimulējot ar komensālajām baktērijām. Jaunākie pētījumi liecina, ka komensālās baktērijas izraisa gļotādas imūnsistēmas attīstību. Homeostatiskais IgA ir polireaktīvs ar salīdzinoši zemu afinitāti, kas var saistīties ar citiem antigēniem uz mikroorganismiem, kā arī ar lipopolisaharīdiem un flagelīnu (Pabst et al. 2020).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Izmantotās iekārtas un materiāli

Pētījuma izpildei izmantoja Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā pieejamos materiālus un aparāturu.

1.Tabula.

Izmantotā aparātūra.

Table 1.

Used equipment.

Aparātūra	Modelis	Ražotājs
Homogenizators	FastPrep®-24	MP Biomedicals, ASV
Vortekss	Microspin FV-2400	Biosan, Latvija
Termobloks	TDB-120	Biosan, Latvija
Ledusskapis/saldētava	Active Soft	Snaige, Lietuva
Mikroviļņu krāsns	-	SCARLETT, Krievija

Laminārs	KR-130 BW	Kojair, Somija
Centrifūga	5417R	Eppendorf, Vācija
UV lampa	UVT-20 M/W	Herolab, Vācija
Qubit fluorometrs	Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, ASV
Sonifikators	<i>Covaris S220</i>	Covaris, ASV
Ūdens attīrīšanas sistēma	<i>Milli-Q Advantage A10</i>	Millipore Merck, ASV
PĶR aparāts	<i>GeneAmp®PCR System 9700</i>	Life Technologies, ASV
Autoklāvs	<i>"Olympatic"</i>	International PBI, Itālija
Laboratorijas svāri	<i>BP610 (+/-0,01g)</i>	Sartorius, Vācija
Magnētiskais statīvs	DynaMag TM -2 Magnet	Thermo Scientific, ASV

2.Tabula.

Vienreizējās lietošanas materiāli.

Table 2.

Disposable materials.

Materiāls	Metodes	Ražotājs
Lateksa cimdi	MyClean ni-foud PF, blue	Vācija
Qubit stobriņi	Qubit® 2.0	Thermo ASV
PCR 0,2 ml stripi	Multiply® -μStrip Pro	Sarstedt, Vācija
1,5 ml stobriņi	Biosphere® Plus SafeSeal	
5 ml stobriņi	Tube 5ml, 57x15.3mm, PP	
15 ml stobriņi	Tube 5ml, 57x15.3mm, PP	
50 ml stobriņi	Tube 5ml, 57x15.3mm, PP	
Uzgaļi ar filtru (0,5-10μl)	Biosphere® Plus	Sarstedt, Vācija
Uzgaļi ar filtru (2-20μl)	Biosphere® Plus	

Uzgaļi ar filtru (2-200 µl)	Biosphere® Plus	
Uzgaļi ar filtru (100-1000 µl)	Biosphere® Plus	
Uzgaļi (0,1-5 ml)	Biosphere® Plus	Thermo Fisher Scientific, ASV

3.Tabula.

Reaģenti un izejvielas.

Table 3.

Reactives and materials.

Reaktīvs	Ražotājs
Biotin-conjugated anti-human IgA	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ASV
Biotin-conjugated anti-human IgG	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ASV
Dynabeads MyOne Streptavidin C1	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ASV
96% etanols	Jaunpagasts PLUS, Latvija
Normal mouse serum	SaunthernBiotech, ASV
D biotīns	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ASV

Adapteru komplekts: <i>MGIEasy DNA Adapters- 96 Kit V1.0</i>	MGI Tech Co, Ķīna
Magnētiskās lodītes: <i>MGIEasy DNA Clean Beads</i>	MGI Tech Co, Ķīna
Reāģentu komplekts <i>Qubit sistēmai</i> <i>Qubit dsDNA HS Assay Kit</i>	Life Technologies, ASV
Mikrobiālās DNS izdalīšanas reāģentu komplekts: <i>MagPure Stool DNA LQ Kit</i>	Angen Biotech, Ķīna
Reāģentu komplekts paraugu cirkularizācijai: <i>MGIEasy Circularization Module V2.0</i>	MGI Tech Co, Ķīna

4. Tabula.

Izmantotās datorprogrammas

Table 4.

Used computer programs.

Datorprogrammas nosaukums	Versija
<i>Microsoft Office</i>	Microsoft 365
<i>Galaxy Huttenhower - LEfSE</i>	Galaxy version 1.0
<i>Rstudio</i>	1.4.1106

2.2. Metodes

2.2.1. Pētījuma dizains

Pētījumā tika iekļauti 19 T2D pacienti un astoņi veseli indivīdi, kuri nav iepriekš lietojuši medikamentus T2D ārstēšanai.

Šī darba ietvaros T2D pacienti tika atlasīti no OPTIMED kohortas. OPTIMED ietvaros tiek veikta jaundiagnostiķu un antidiabētiskās terapijas naivu T2D pacientu iesaiste, sadarbojoties ar endokrinologiem un ģimenes ārstiem no veselības aprūpes centriem Latvijā. No visiem iesaistītajiem pētījuma dalībniekiem tika iegūta informētā piekrišana, pētījuma protokolam piešķirta Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja Nr.: 1/19-10-22. Metformīna devu izrakstīja ārsts atbilstoši pacienta klīniskajām vajadzībām. No T2D pacientiem tika ievākti fēču paraugi trīs dažādos laika posmos un kodēti šādi: (1) pirms metformīna terapijas - M0, (2) pēc septiņu dienu metformīna terapijas - M7d, (3) pēc trīs mēnešu metformīna terapijas - M3m. Lai nodrošinātu homogēnāku pacientu paraugkopu, bakalaura darba izstrādei tika atlasīti pētījuma dalībnieki, kuriem glikētais hemoglobīns pārsniedz septiņus procentus.

Kā kontroles šajā darbā tika atlasīti astoņu veselo indivīdu paraugi, kuru dati tika iegūti klīniskā pētījuma ietvaros Nr. 2016-001092-74. Veselie indivīdi saņēma 850 mg metformīna divas reizes dienā nedēļas garumā. No šī pētījuma bakalaura darba ietvaros tika analizēti paraugi divos laika punktos: (1) pirms metformīna terapijas - M0, (2) pēc septiņu dienu metformīna terapijas - M7d.

Pētījuma dalībniekiem fēču paraugus ievāca mājas apstākļos sterilos stobriņos bez buferšķīduma. Dalībniekiem abās grupās bija lūgums nogādāt paraugus tuvākajā laboratorijā 24 stundu laikā, kur paraugi tika glabāti -20 °C temperatūrā, bet pēc nosūtīšanas uz zinātnisko institūtu tie tika uzglabāti -80 °C temperatūrā līdz tālākai analīzei. Par dalībniekiem abās grupās tika ievākti dati par dažādiem antropometriskajiem mērījumiem, kā arī bioķīmisko un hematoloģisko analīžu rezultātiem pirms metformīna lietošanas uzsākšanas.

2.2.2. Ar sIgA pārklāto baktēriju šķirošana, izmantojot magnētiskās lodītes

Šķīdumu sagatavošana

1. *PBS* (fosfātu buferšķīdums)- Fosfātu buferšķīduma pulveri izšķīdina vienu l dejonizēta ūdens, izfiltrē, autoklavē un uzglabā istabas temperatūrā. Uz vienu paraugu 1,1 mL *PBS*.
2. *Staining Buffer* - Vajadzīgajam *PBS* daudzumam iesver klāt 1% BSA, izšķīdina lēni invertējot un izmanto. Uz vienu paraugu 7,08 mL.
3. *Blocking Buffer* - Uz vienu paraugu pievieno 80 μ L *Staining Buffer*, 20 μ L normal mouse serum un 0,5 mg/mL D-biotīnu.
4. *Staining Buffer* papildināts ar 0,5 mg/ml D-biotīnu - Uz vienu paraugu pievieno 1 mL *staining buffer* un 10 μ L 0,5 mg/ml D-biotīnu.
5. IgA - Uz vienu paraugu pievieno 20 μ L sagatavoto *PBS* un 0,5 μ L *Biotin-conjugated anti-human IgA*

Magnētisko lodīšu sagatavošana

1. Pirms protokola sākšanas, sagatavo biofīna konjugētos bīdus. 10 μ L *Biotin-conjugated anti-human IgA* sajauc ar 10 μ L *Dynabeads MyOne Streptavidin C1* uz vienu paraugu.
2. Inkubē 15 min uz ledus, magnētiskās lodītesregulāri apmaisot.
3. Stobriņu liek uz magnēta un noņem supernatantu. Pievieno 1 mL *Staining Buffer* papildinātu ar 0,5 mg/ml D-biotīna, lai bloķētu brīvo streptavidīnu.
4. Inkubē 15 min uz ledus, magnētiskās lodītes regulāri apmaisot.
5. Mazgā divas reizes ar 1 mL *Staining Buffer*, izmantojot magnētu.
6. Bīdus resuspendē 20 μ L *Staining buffer* uz katru paraugu.

Paraugu apstrāde

1. Pārnes 0,10 g (vai nedaudz vairāk) fēču materiāla uz *Fast Prep Lysing Matrix D* stobriņu. Pievieno 1 mL ledus auksta *PBS* (w/v).
2. Stobriņu liek homogenizatorā uz 7 sec lenākā ātrumā (4 m/s).
3. Paraugus pārnes centrifugē (500 xg, 15 min, 4 C), lai atdalītu lielākās daļiņas.

4. Atdala supernatantu, kas satur baktērijas (apmēram 100 µL) un pārnes uz jauno stobriņu. Pievieno 1 mL *Staining Buffer* (PBS + 1% BSA) un saglabā 2x50 µL šī parauga kā *Pre-sort* paraugu. Glabā pie -80 C.
5. Nomazgā nepiesaistīto IgA, centrifugējot paraugu (8000 xg, 5 min, 4 C).
6. Resuspendē nosēdušās daļiņas ar 1 mL *Staining Buffer*.
7. Atkārtoti centrifugē paraugu (8000 xg, 5 min, 4 C).
8. Resuspendē nosēdušās daļiņas ar 100 µL *Blocking Buffer* (*Staining Buffer* + 20% *normal mouse serum* un 0,5 mg/ml D-biotīna) un inkubē 20 min uz ledus.
9. Pievieno 20 µL sagatavotoās magnētiskās lodītes un inkubē 30 min tumsā uz ledus.
10. Magnētiskās lodītes ar piesaistītām baktērijām mazgā piecas reizes ar 1 mL *Staining Buffer*, izmantojot magnētu.
11. Beidzamās nosēdušās daļiņas resuspendē ar 100 µL PBS.
12. Paraugus sadala pa diviem stobriņiem (2x50) un glabā pie - 80 C.

2.2.3. DNS izolēšana ar automatizēto platformu *MGISP-960* (MGI Tech)

1. Pirms paraugu pārņemšanas paraugus vorteksē un centrifugē.
2. Pārnes 150 µL parauga 2mL *Bead Tubes* stobriņā un centrifugē.
3. Stobriņā ar paraugu pievieno 600 µL *Buffer ATL/PV-10* un 600 µL *Buffer PCL*.
4. Paraugus homogenizē, izmantojot *FastPrep®* Instrument ierīci ar ātrumu 6,0 m/s 40 sekundes.
5. Paraugus inkubē 20 min 65°C temperatūrā.
6. Pēc inkubēšanas paraugus centrifugē 5 minūtes pie 13,000 x g.
7. Sagatavo un iepilda plates robotam.
8. Kopā jāiepilda 6 *U-bottom deep well* plates un platēs iepilda 1,3 mL *U-bottom deep well* platēs 650 µL *GWI*, 340 µL paraugus, 640 µL *Binding Reagent*, 1,1 mL 75% etanolu, 10 µL *Rnase A* un 100 µL *Elution buffer*.
9. Sagatavo *Binding* reaģentu. Tilpumi uz vienu paraugu– 30 µL *MagPure*, 20 µL *Proteinase K* un 600 µL *Buffer MLE*. *Binding* reaģents nedrīkst stāvēt istabas temperatūrā vairāk par 30 min, lai neaktivizētos proteināze.
10. Pirms sāk darbu ar *MGISP-960*, virsmu notīra ar 70% etanolu, tad programmā spiež “*Clean*” un “*Start*”. Datorā iestāda nepieciešamo programmu.

11. Spiež “*Home panelis*”, pēc tam izvēlās “*Initialise*”. Šajā punktā tiek testēta, vai iekārta ir darba kārtībā.
12. Iekārtu tīrīšanas programmas laikā 20 min dezinficē ar UV lampu.
13. Kad tīrīšana ir beigusies, programmā spiež “*Run Wizard*”, tad “*Solution*”, tiek izvēlēts “*Mag Pure stool LQ kit for MGI (D6364)RV1.0_SV1.0*”, spiež “*Script*” un izvēlās “*Stool DNA Extraction.py*”
14. Sagatavo uzgaļus un plates. Tos izkārto nepieciešamā izkārtojumā, kas norāda programma.

2.2.4. Paraugu DNS koncentrācijas noteikšana

1. Sagatavo reakcijas maisījumu, atbilstoši nepieciešamajam reakciju skaitam (n), ņemot vērā arī standartu nolaišanai nepieciešamās divas reakcijas (+2).
 - a. Pievieno 199 μL *Qubit*® *dsDNA HS* bufera atbilstoši paraugu skaitam (n+2)
 - b. Pievieno 1 μL gaismjūtīga *Qubit*® *dsDNA HS* reaģenta atbilstoši paraugu skaitam (n+2). Novorteksē, lai buferis tiek sajaukts ar reaģentu (Gaismjūtīgo *Qubit*® *dsDNA HS* reaģentu slēpj no gaismas).
2. Sagatavo un nomarkē 0,5 mL stobriņus (sarakstīt virspusē). Divos standartu stobriņos pievieno 190 μL sagatavoto reakcijas maisījumu, taču pārējos stobriņos – 198 μL .
3. Pirmajā standartu stobriņā pievieno 10 μL *Qubit*® *dsDNA HS* standarta #1, bet otrajā – *Qubit*® *dsDNA HS* standarta #2
4. Paraugiem paredzētajā stobriņā pievieno 2 μL attiecīgās DNS.
5. Pipetē un īsi centrifugē, lai maisījums tiek sajaukts.
6. Koncentrācijas mērīšanai izmantot *Qubit* 2.0 fluometru.
7. Iekārtā izvēlas “*dsDNA High Sensitivity*” režīmu.
8. Fluometrā ievieto pirmo standarta stobriņu, aizver fluometra vāku, spiež “*Read*” režīmu un nolasa.
9. Pēc kalibrācijas fluometrā ievieto paraugu saturošu stobriņu, aizver vāku, spiež “*Read tube*” un nolasa koncentrāciju.
10. Izmanto funkciju “*Calculate Stock Conc*”, šādi norādot stobriņos pievienoto DNS parauga tilpumu – 2 μL .
11. Koncentrāciju mēra šādās vienībās “ng/ μL ”.

2.2.5. DNS paraugu fragmentācija, izmantojot Covaris sistēmu

1. Paraugus atšķaida līdz 300 ng koncentrācijai 55 µL tilpumā.
2. Sonificē 400 bp:
 - Sagatavo atšķaidītos paraugus un ievieto to *covaris* stobriņos.
 - Ieslēdz dzesēšanas sistēmu un uzstāda temperatūru +4C.
 - Piepilda sonifikatora vannīti ar dejonizētu ūdeni līdz 12,5 atzīmei (“*Fill*”).
 - Ieslēdz *Covaris S220* aparatūru un datoru.
 - Atver *sonolab* programmu un izvēlas atbilstošo sonifikācijas programmu, kas šajā protokolā ir 400 bp *base pair fragmentation*.
 - Katru paraugu secīgi ievieto sonifikatora mazajā nodaļumā.
 - Sonificē paraugus, palaižot programmu “*Run*” kas ilgst 55 sekundes.

2.2.6. DNS fragmentu galu apstrāde - *End repair* un *A-tailing*

1. Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

ERAT buferšķīdums	7,1 µL
ERAT enzīmu maisījums	2,9 µL

Kopējais tilpums: 10 µL
2. Pievieno 40 µL sonificētu paraugu (50ng).
3. Pievieno DNS paraugam sagatavoto maisījumu.
4. Veic reakciju pie sekojošiem apstākļiem:
 - 37 C - 30 min
 - 65 C - 15 min
 - 4 C - ∞

2.2.7. Attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm

1. Izņem no ledusskapja magnētiskās lodītes un ļaut uzsilt 30 minūtes istabas temperatūrā.
2. Sagatavo un atšķaidīt atšķaidītu etanolu 80%.
3. Nomarķē 1,5 mL eppendorf stobriņus. Tajos stobriņos pārnes 50 µL sonificētos paraugus.
4. Pievieno 50 µL magnētiskās lodītes 1,5 mL eppendorf stobriņos.
5. Pievieno 50 µL TE Buferi.

6. Vorteksē un centrifugē.
7. Inkubē 5 min istabas temperatūrā.
8. Īsi centrifugē un novieto statīvu ar stobriņiem uz magnēta un turēt 2-5 minūtes, līdz šķidrums kļūst caurspīdīgs.
9. Uzmanīgi noņemt supernatantu un to izliet (magnētiskās lodītes paliek).
10. Turpina turēt stobriņus uz magnētiskā statīva un magnētiskajām lodītēm pievienot 200 μ L svaigi sagatavotu 80% etanolu. Rūpīgi izņem supernatantu un tad izmet (magnētiskās lodītes paliek).
11. Atkārti 8.punktu un izmet visu šķidrumu/supernatantu no stobriņiem.
12. Turpināt turēt uz magnētiskā statīva ar atvērtiem vāciņiem un ~4 min žāvē magnētiskās lodītes līdz tās vairs nav spīdīgas un sāk parādīties plaisas..
13. Noņem statīvu ar stobriņiem no magnēta, pievieno 32 μ L TE Buferi.
14. Pipetē un īsi centrifugē, lai maisījums tiek sajaukts.
15. Inkubē 5 minūtes.
16. Novieto statīvu ar stobriņiem uz magnēta, atstāj 2-5 minūtes līdz šķidrums kļūst caurspīdīgs.
17. Uzmanīgi, neievelkot uzgalī lodītes, pārnes attīrīto 30 μ L DNS paraugu uz jaunu 1,5 mL stobriņu.

2.2.8. Adapteru ligēšana

1. Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

Ligēšanas buferis	23,4 μ L
DNS ligāze	1,6 μ L
Kopējais tilpums:	25 μ L
2. Pievieno DNS paraugam sagatavoto maisījumu;
3. Pievieno DNS paraugam 5 μ L *MGIEasy DNA* adapter;
4. Veic reakciju pie sekojošiem apstākļiem:

23 C - 30 min
4 C - ∞
5. Veic attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm;

2.2.9. Attīrīšana ar magnētiskajām lodītēm

1. Izņem no ledusskapja magnētiskās lodītes un ļaut uzsilt 30 minūtes istabas temperatūrā.
2. Sagatavo un atšķaida etanolu 80%.
3. Nomarķē 1,5 mL eppendorf stobriņus. Tajos stobriņos pārnes 80 µL paraugus.
4. Pievieno 50 µL magnētiskās lodītes 1,5 mL eppendorf stobriņos.
5. Pievieno 20 µL TE Buferi.
6. Vorteksē un centrifugē.
7. Inkubē 5 min istabas temperatūrā.
8. Īsi centrifugē un novieto statīvu ar stobriņiem uz magnēta un atstāj uz 2-5 minūtēm, līdz šķidrums kļūst caurspīdīgs.
9. Uzmanīgi noņem supernatantu un to izliet (magnētiskās lodītes paliek).
10. Turpina turēt stobriņus uz magnētiskā statīva un magnētiskajām lodītēm pievieno 200 µL svaigi sagatavotu 80% etanolu. Rūpīgi izņem supernatantu un tad izmet (magnētiskās lodītes paliek).
11. Turpināt turēt uz magnētiskā statīva ar atvērtiem vāciņiem un ~4 min žāvē magnētiskās lodītes līdz tās vairs nav spīdīgas un sāk plaisīties.
12. Noņem statīvu ar stobriņiem no magnēta, pievienot 21 µL TE Buferi.
13. Pipetē un īsi centrifugē, lai maisījums tiek sajaukts.
14. Inkubē 5 minūtes.
15. Novieto statīvu ar stobriņiem uz magnēta, atstāj uz 2-5 minūtēm līdz šķidrums kļūst caurspīdīgs.
16. Uzmanīgi, neievelkot uzgalī lodītes, pārnes 19 µL attīrīto DNS paraugu uz jaunu 1,5 mL stobriņu.

2.2.10. Amplifikācija

1. Pārnes 19 µL DNS maisījuma uz jaunu 0,2 mL PCR stobriņu.
2. Sagatavo sekojošu reakcijas maisījumu:

PCR enzīmu maisījums	25 µL
PCR praimeru maisījums	6 µL
Kopējais tilpums:	31 µL

3. Pievieno 31 μL maisījuma DNS parauga maisījumam;
4. Veic PCR reakciju pie sekojošiem apstākļiem:
 - 98 C - 20 sek
 - 60 C - 15 sek x cikli
 - 72 C - 30 min

 - 72 C - 10 min
 - 4 C - ∞
5. Veic attīrīšanu ar magnētiskajām lodītēm;
6. Eluē 32 μL TE buferšķīdumā.
7. Pārnes 38 μL uz jaunu 1.5 mL stobriņu.

2.2.11. DNS kvalitātes noteikšana

1. Atstāj reaģentu komplektu istabas temperatūrā apmēram 30 min.
2. Sagatavo gēla – krāsvielas maisījumu. Pievieno 15 μL *High Sensitivity DNA* krāsvielu *High Sensitivity DNA* gēla matricam.
3. Maisījumu vorteksē, centrifugē 2200x 10 minūtes un pārnes stobriņu ar ievietotu filtra kolonnu.
4. Sagatavo čipa uzpildes staciju. Pieliek šļirci. Pamatni nostāda C pozīcijā.
5. *AGILENT 2100 Bioanalyzer* iekārtā ieliek čipu, kas ir uzpildīta ar 360 μL distilēto ūdeni.
6. Uzpildes stacijā ievieto *High Sensitivity DNA* čipu.
7. Iepilina 9,2 μL gēla krāsvielas maisījumu [G] bedrītē.
8. Aizver čipa uzpildes staciju. Šļirci virzuli novieto 1mL pozīcijā. Nospiež šļirci līdz tas tiek nofiksēts ar klipši. Paralēli uzņem laiku – 60s. Pēc 60 s atbrīvo šļirci, ļaujot tam brīvi iestāties sākotnējā stāvoklī. Pēc 5 s, tam apstājoties, ar lēnām kustībām piepalīdz tam atgriezties sākotnējā stāvoklī.
9. Atver uzpildes staciju. Iepilina 9 μL gēla – krāsvielas maisījumu pārējās G bedrītēs.
10. Iepilina 5 μL *High Sensitivity DNA* standartmarķieri visas atlikušajās 12 bedrītēs, ieskaitot bedrīti, kas ir apzīmēta ar trepītēm.
11. Atlikušajās 11 bedrītēs iepilina 1 μL parauga, izņemot bedrīti, kas ir apzīmēta ar trepītēm.
12. Iepilda 1 μL *High Sensitivity DNA* garuma marķieri bedrītē, kas apzīmēta ar trepītēm.

13. Čipu ievieto vorteksā un vorteksē 1 minūti 2400 rpm.
14. Izņem ūdens čipu. Atstāj atvērtu iekārtu dažas minūtes.
15. Ievieto čipu bioanalizatora iekārtā.
16. Atver 2100 Expert programmu. Programmā izvēlās *dsDNA High Sensitivity DNA* sadaļā Assays.
17. Aizpilda SAMPLE tabulu, ieraksta paraugu nosaukumus.
18. Uzspiež “run”, lai sāktu darbību.
19. Pēc čipa nolasīšanas, ieliek mazgāšanas čipu.

2.2.12. Darbu drošība

Izstrādājot pētījumu laboratorijā, tika ievērota vispārēja darba drošība. Izvairījās no reaģentu ieelpošanas vai nokļūšanas uz ādas un apģērba, tika vilkts laboratorijas halāts un cimdi. Pirms un pēc darba laboratorijā, galda virsmu un pipetes apstrādāja ar 70% etanolu, lai izvairītos no reaģentu un paraugu piesārņošanas. Lielākā daļa pētījuma tika veikta īpaši sterilā vidē - DNS “boksā” un Infekciozajā “boksā”. Telpa tiek saglabāta sterila, to reizi nedēļā tīrot, 30 minūtes sterilizējot ar UV gaismu un velkot speciālus, šai telpai paredzētus halātus un maiņas apavus. Vairākus paraugus un reaģentus vienlaicīgi neatstāja vaļā. Lai nerastos kontaminācijas risks, tika izmantoti pipetes uzgaļi ar filtru. Paraugus apstrādā rūpīgi apmācīti personāli un tiek nodrošināti visi nepieciešamie personālās aizsardzības līdzekļi. Paraugi tiek apstrādāti Biomedicīnas centrā esošā BSL2 telpā. Paraugi tiek apstrādāti tikai un vienīgi tajos gadījumos, ja pacients ir devis rakstisku atļauju.

2.2.13. Sekvenēšana ar *MGIEasy* sekvenatoru

Sekojošā sekvenēšana tika veikta ar DNBSEQ-G400RS sekvenēšanas platformu, izmantojot DNBSEQ-G400RS augstas caurlaidības sekvenēšanas komplektu (FCL PE 150), iegūstot vismaz 20 miljonus nolasījumu uz parauga. Sekvenēšanu veica apmācīts laboratorijas speciālists.

2.2.14. Datu analīze

Sekvenēšanas datu apstrādi veica apmācīts bioinformātikas speciālists Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra IT un Bioinformātikas servisa centrā. Statistisko analīzi un datu vizualizāciju veica R programmā un *Galaxy* rīkā. Datu filtrēšanu veica Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra apmācīts personāls. Nolasījumu kvalitātes novērtēšana tika veikta, izmantojot *FastQC* programmatūrai. *MetaPhlAn* skaitļošanas rīks (metagenomiskā filoģenētiskā analīze) izmantots mikrobioma sastāva profilēšanai, izmantojot metagenomisko sekvenču datus. No rīka rezultātiem tika iegūti dati par paraugu taksonomisko sastāvu, iekšējo (alfa) daudzveidību pēc Šanona indeksa. Iegūtie dati un aktuālā informācija par par pētījumu dalībniekiem tika apkopota *MS Excel* platformā.

Atšķirības starp Šanona indeksa vērtībām vai citiem analizētajiem parametriem tika novērtētas ar neparametrisko Vilkoksona testu R programmā, saistītajiem paraugiem tika izmantots parametrs “paired=TRUE”. Lai izvērtētu būtiski atšķirīgas taksonomiskās vienības starp analizētajiem T2D pacientu un veselo indivīdu paraugiem, tika izmantots lineārās diferencētās analīzes efekta izmēra (LEfSe) algoritms *Galaxy* tiešsaistes rīkā, ar LDA vērtības sliekšni = 2.

3. REZULTĀTI

Bakalaura darba ietvaros no 19 jaundiagnosticētajiem T2D pacientiem un astoņiem veselajiem pētījuma dalībniekiem tika iegūti zarnu mikrobioma paraugi. Pacienti atkārtoti ievāca paraugus trīs laika punktos: (1) pirms metformīna terapijas - M0, (2) pēc septiņu dienu metformīna terapijas - M7d, (3) pēc trīs mēnešu metformīna terapijas - M3m. Savukārt veselajiem pētījuma dalībniekiem paraugi tika ievākti divos laika punktos: (1) pirms metformīna terapijas - M0, (2) pēc septiņu dienu metformīna terapijas - M7d. Visu iesaistīto dalībnieku raksturojums apkopots 5. tabulā.

Katram pētījuma dalībniekam tika analizēts mikrobioma sastāvs pirms šķirošanas (*Presort* paraugs) un iegūtā sIgA+ baktēriju frakcija. Šī darba ietvaros no tālākās analīzes tika izslēgti pieci paraugi no T2D pacientiem, kuriem nākamās paaudzes sekvenēšanas rezultātā tika iegūts nepietiekams nolasījumu skaits mikrobioma taksonomiskā sastāva analīzei. Tālākai analīzei tika iekļautas tās mikroorganismu taksonomiskās grupas, kurām 25% analizēto paraugu bija vismaz 1% īpatsvars. Šāda datu filtrēšana tika veikta, lai novērstu potenciālo kontaminantu ietekmi uz rezultātiem un uzlabotu datu novērtējuma kvalitāti.

5. tabula.

Pētījuma paraugkopas raksturojums

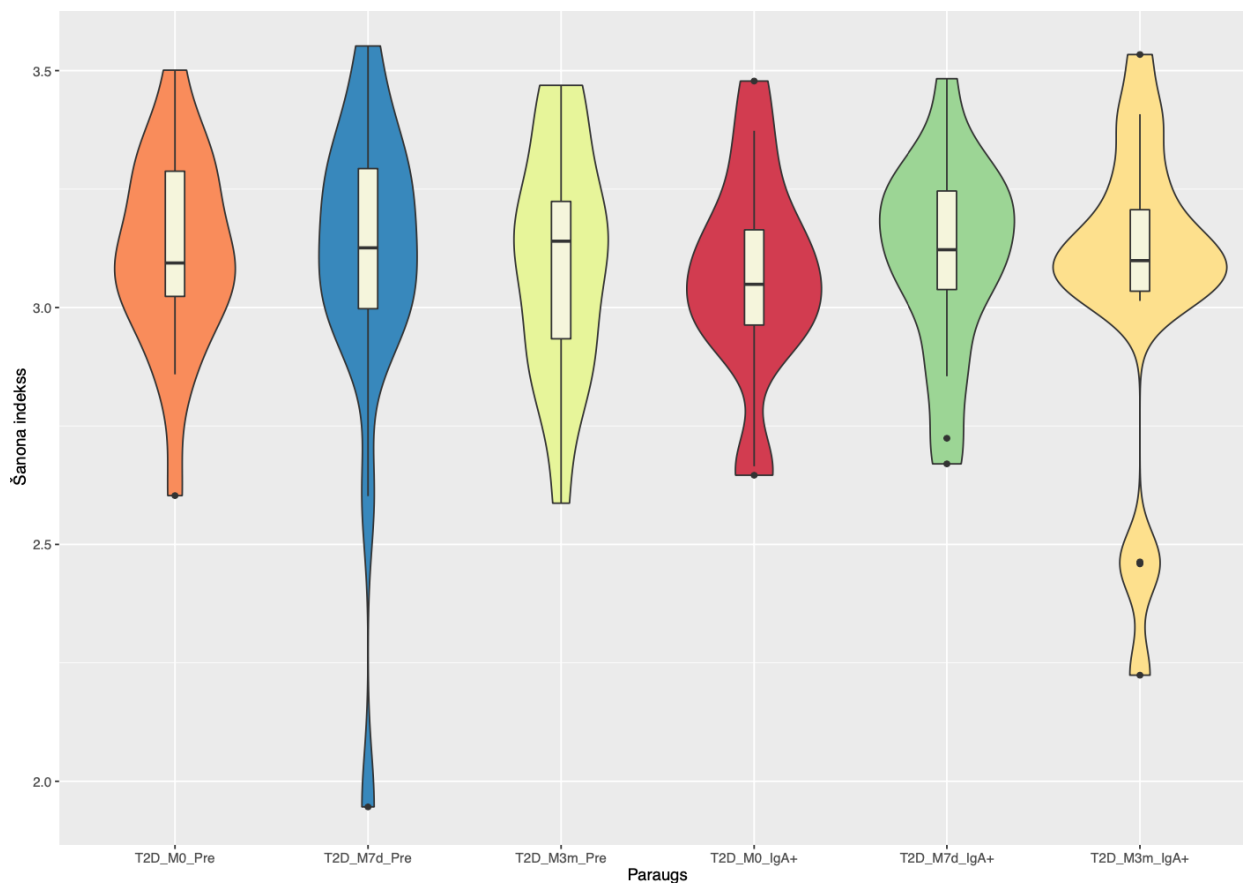
Table 5.

Characterization of study group

Raksturojums	T2D pacienti (N=19)	Veselie indivīdi (N=8)
Vīrieši/Sievietes, n (%)	6(31,6%) / 13(68,4%)	3(37,5%) / 5(62,5%)
Vecums (gadi), mediāna ± IQR	57±15	25±11,25
ĶMI, mediāna ± IQR	33,41±3,79	23,5±5,43
HbA1c (%), mediāna ± IQR	8,2±2,5	-
Metformīna deva (mg/dienā), mediāna ± IQR	1000±150	17000±0

IQR - starpkvartīļu diapazons (angliski - *interquartile range*), HbA1c - glikētais hemoglobīns, ĶMI - ķermeņa masas indekss.

T2D pacientiem zarnu mikrobioma vispārīgai raksturošanai, tika veikta paraugu iekšējās daudzveidības noteikšana, kas aprēķināta pēc Šanona indeksa (skatīt 2.attēlu). Tika veikts neparametriskais Vilksona tests, gan savstarpēji salīdzinot *Presort* paraugus un IgA+ frakciju katrā laika punktā, gan arī novērtējot izmaiņas laikā abos paraugu veidos, kā rezultātā netika novērotas statistiski būtiskas atšķirības.

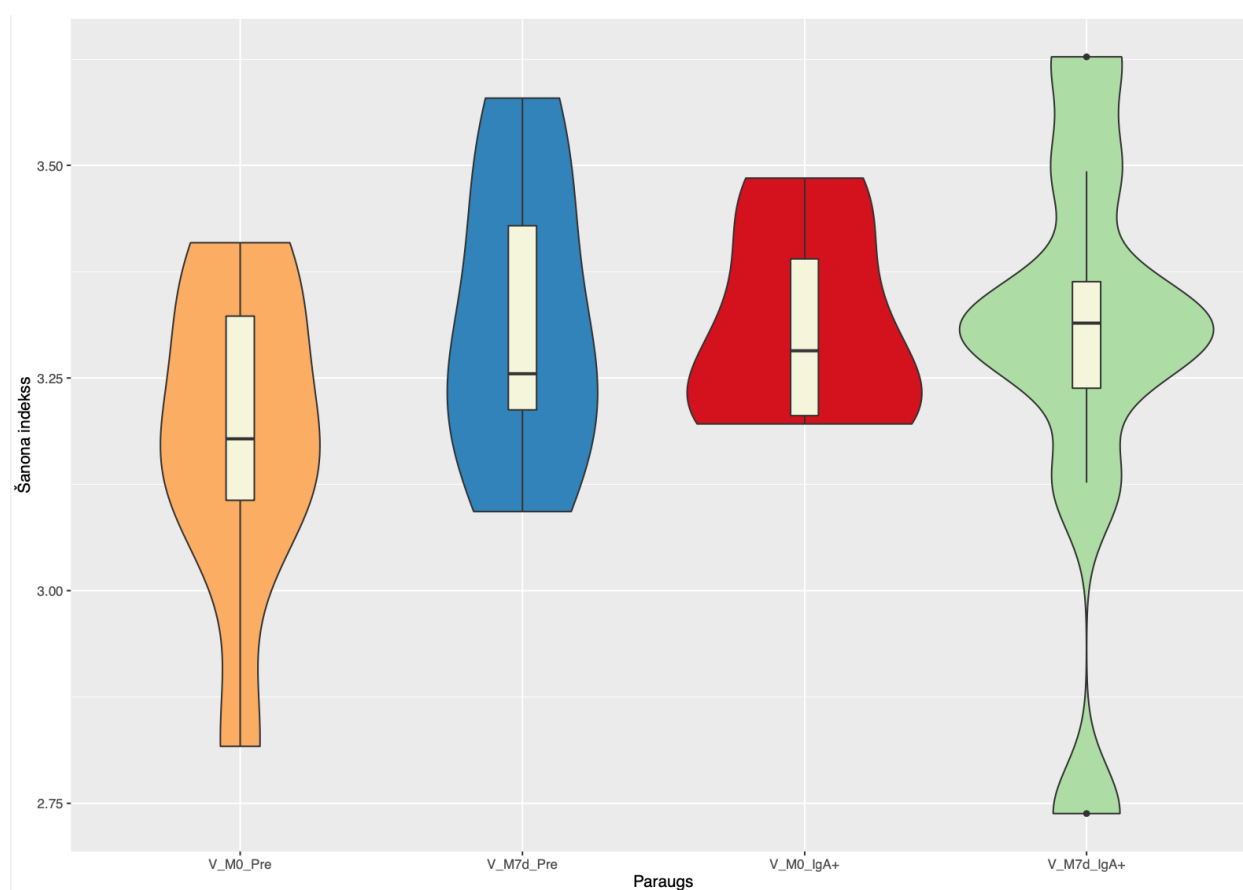


2.attēls. Iekšējās daudzveidības izvērtējums pēc Šanona indeksa T2D pacientiem katrā paraugu grupā visos analizētajos laika punktos. Vērtības attēlotas violīngrafikā, apvienojot kastveida un nogriežņa procentiņu diagrammu un Kernela blīvuma grafiku. Paraugi: M0 - pirms metformīna terapijas, M7d - pēc septiņu dienu metformīna terapijas, M3m - pēc trīs mēnešu metformīna terapijas. T2D - otrā tipa cukura diabēta pacienti, Pre - *Presort* paraugs, IgA+ - baktēriju frakcija, kas saistīta ar sekretoro IgA.

Figure 2. Alpha diversity by Shannon index in each fraction group at the analyzed time points

within the T2D cohort. Values are shown in a violin plot, each combining a boxplot and Kernel density plot. Samples: M0 - before metformin therapy, M7d - after one-week metformin therapy, M3m - after three months of metformin therapy. T2D - type 2 diabetes patients, Pre - Presort sample, IgA+ - bacterial fraction coated with secretory IgA.

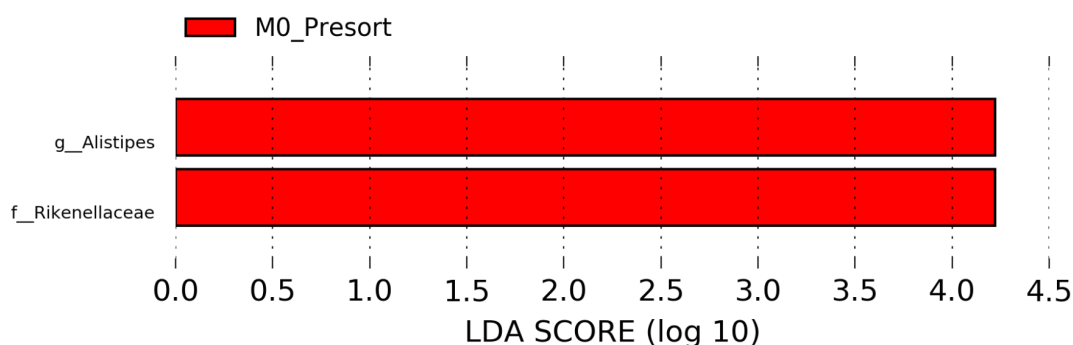
Vispārīgai paraugu raksturošanai veselo indivīdu grupā arī tika noteikta iekšējā daudzveidība pēc Šanona indeksa (skatīt 3.attēlu). Savstarpēji salīdzinot *Presort* paraugus un IgA+ frakciju katrā laika punktā, kā arī novērtējot izmaiņas laikā abos paraugu veidos netika novērotas būtiskas atšķirības.



3.attēls. Iekšējās daudzveidības izvērtējums pēc Šanona indeksa veseliem indivīdiem katrā paraugu grupā visos analizētajos laika punktos. Vērtības attēlotas violīngrafikā, apvienojot kastveida un nogriežņa procentiļu diagrammu un Kernels blīvuma grafiku. Paraugi: M0 - pirms metformīna terapijas, M7d - pēc septiņu dienu metformīna terapijas. T2D- otrā tipa cukura diabēta pacienti, Pre - *Presort* paraugs, IgA+ - baktēriju frakcija, kas saistīta ar sekretoro IgA.

Figure 3. Alpha diversity by Shannon index in each fraction group at the analyzed time points within healthy controls. Values are shown in a violin plot, each combining a boxplot and Kernel density plot. Samples: M0 - before metformin therapy, M7d - after one-week metformin therapy. V - healthy control samples, Pre - Presort sample, IgA+ - bacterial fraction coated with secretory IgA.

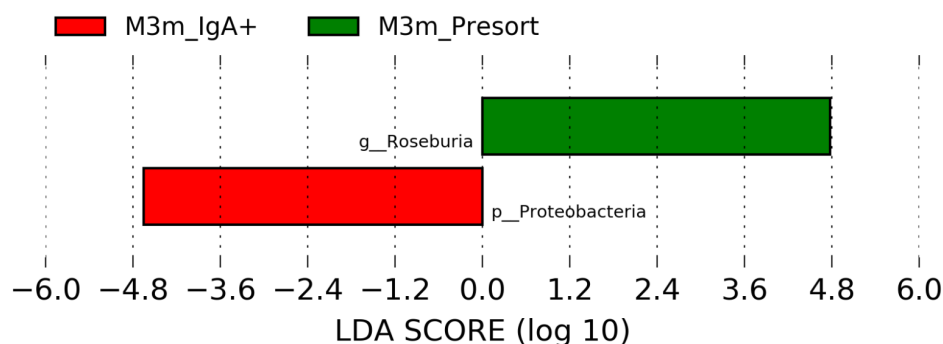
Lai noteiktu analizētajiem paraugiem raksturīgākās taksonomiskās grupas, tika salīdzināts taksonomiskais sastāvs katrā no laika punktiem, izmantojot LEfSe analīzi. Vispirms tika salīdzināti jaundiagnosticēto T2D pacientu paraugi trīs dažādos laika punktos 1) IgA+ ar *Presort*, pirms metformīna terapijas (M0), 2) IgA+ ar *Presort*, nedēļu pēc metformīna terapijas (M7d), 3) IgA+ ar *Presort*, pēc trīs mēnešu metformīna terapijas (M3m). Tika novērotas statistiski būtiskas atšķirības starp IgA+ un *Presort* paraugiem pirms metformīna lietošanas (skatīt 4.attēlu) un pēc trīs mēnešu metformīna terapijas starp IgA+ un *Presort* (skatīt 5.attēlu).



4.attēls. Lineārās diferencētās analīzes histogrammas (LDA) efekta lieluma (LEfSe) salīdzinājums T2D pacientiem zarnu mikrobiomā, kas parāda būtiskas atšķirības starp diviem paraugu pāriem IgA+ un *Presort* pirms metformīna lietošanas (M0). Sarkanā krāsā norāda taksonomisko grupu, kas vairāk sastopama *Presort* paraugos, kura tika identificēta pirms metformīna lietošanas. LDA vērtības sliekšnis = 2.

Figure 4. Histograms of linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) comparison of the T2D cohort gut microbiome, showing significant differences between the two pairs of samples IgA+ and *Presort* before metformin therapy (M0). Red indicates a taxonomic group that is more common in *Presort* samples which are identified before metformin therapy. LDA value

threshold = 2.



5.attēls. Lineārās diferencētās analīzes histogrammas (LDA) efekta lieluma (LEfSe) salīdzinājums T2D pacientiem zarnu mikrobiomā, kas parāda būtiskas atšķirības starp diviem paraugu pāriem IgA+ un *Presort* pēc trīs mēnešu metformīna terapijas. Sarkanā krāsā norāda taksonomisko grupu, kas vairāk sastopama IgA+ grupā, ar zaļu ir iekrāsota tā taksonomiskā grupa, kas ir visvairāk sastopama *Presort* paraugos, kura tika identificēta trīs mēnešus pēc metformīna lietošanas. LDA vērtības sliekšnis = 2.

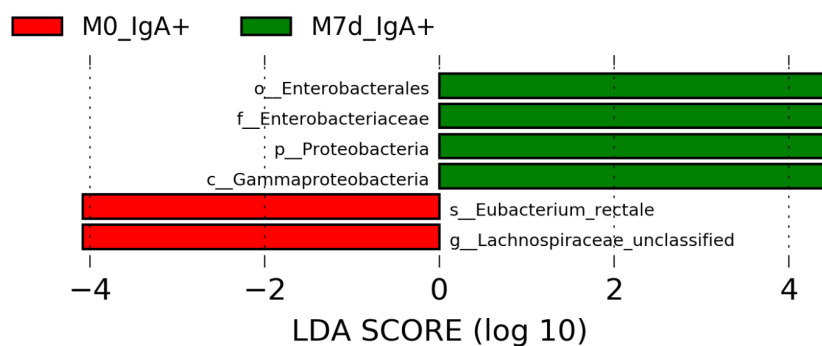
Figure 5. Histograms of linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) comparison of the T2D cohort gut microbiome, showing significant differences between the two pairs of samples IgA+ and *Presort* after three months of metformin therapy (M3m). Red indicates the taxonomic group, which is most commonly in the IgA + group. Green indicates a taxonomic group that is more common in *Presort* samples which are identified before metformin therapy. LDA value threshold = 2.

Tālāk sekoja zarnu mikrobioma analīze starp veselo indivīdu paraugiem divos laika punktos 1) IgA+ ar *Presort*, pirms metformīna terapijas (M0) un 2) IgA+ ar *Presort*, nedēļu pēc metformīna terapijas (M7d). Šajos kontrastos netika novērotas statistiski būtiskas atšķirības.

Lai noskaidrotu kā metformīns ietekmē T2D pacientu zarnu mikrobiomu, tika salīdzināti visu trīs laika punktu *Presort* paraugi 1) M0 pret M7d, 2) M0 pret M3m. Starp šiem trīs laika punktiem *Presort* paraugos nav novērotas statistiski būtiskas atšķirības.

Veicot statistisko analīzi jaundiagnosticētajiem T2D pacientiem, tika salīdzinātas IgA+ frakcijas trīs laika posmos 1) M0 pret M7d, 2) M0 pret M3m nav novērojamas būtiskas atšķirības.

Turpinot zarnu mikrobioma paraugu analīzi, savā starpā tika salīdzināti veselo indivīdu IgA+ frakciju paraugi divos laika punktos: M0 pret M7d. Novērota četru baktēriju sugu īpatsvara pieaugums IgA+ frakcijā pirms metformīna terapijas un divu sugu īpatsvara pieaugums IgA+ frakcijā nedēļu pēc metformīna terapijas (skatīt 6.attēlu). Savukārt salīdzinot divu laika punktu *Presort* paraugiem: M0 pret M7d, nav novērotas statistiski būtiskas atšķirības.



6.attēls. Lineārās diferencētās analīzes histogrammas (LDA) efekta lieluma (LEfSe) salīdzinājums veseliem indivīdiem zarnu mikrobiomā, kas parāda būtiskas atšķirības ģints līmenī starp diviem paraugu pāriem IgA+ pirms metformīna terapijas (M0) un IgA+ pēc septiņu nedēļu metformīna terapijas (M7d). Sarkanā krāsā norāda taksonomisko grupu, kas vairāk sastopama IgA+ grupā (M0), ar zaļu ir iekrāsota tā taksonomiskā grupa, kas ir visvairāk sastopama IgA+ (M7d) paraugos. LDA vērtības sliekšnis = 2.

Figure 6. Histograms of linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) comparison of health individual gut microbiome, showing significant differences at the genera level between the two pairs of samples before metformin therapy (M0) and IgA+ after one week of metformin therapy (M7d). Red indicates the taxonomic group, which is most commonly in the IgA+ group (M0). Green indicates a taxonomic group that is more common in IgA+ samples (M7d). LDA value threshold = 2.

4. DISKUSIJA

Cukura diabēts, tai skaitā aptaukošanās un T2D, visticamāk, būs lielākā epidēmija cilvēces vēsturē, kurā saslimušo skaits pieaug ar katru gadu. DM ir nepietiekami novērtēts kā globāla sabiedrības veselības problēma (Zimmet et al. 2017). T2D krasi ietekmē vairākus orgānus, tostarp sirdi, asinsvadus, nervus, acis un nieres. Arī faktori, kas palielina diabēta risku, ir riska faktori citām nopietnām hroniskām slimībām. Pasaules Veselības Organizācija ziņo, ka 2021.gadā aptuveni 462 miljoniem cilvēku ir diagnosticēts T2D, kas atbilst 6,28% pasaules iedzīvotāju (pēc *World Health Organization 2022*). Vairāk nekā viens miljons nāves gadījumu tika attiecināti uz šo slimību vien 2017. gadā, ierindojojot to kā devīto galveno mirstības cēloni (Khan et al. 2020). Šāda veida diabēts lielā mērā ir liekā ķermeņa svara un fiziskās neaktivitātes rezultāts (pēc *World Health Organization, 2022*). Tiek prognozēts, ka T2D izplatība pasaulē līdz 2030. gadam pieaugs līdz 7079 indivīdiem uz 100 000, atspoguļojot nepārtrauktu pieaugumu visos pasaules valstīs (Khan et al. 2020).

Metformīns ir viens no visplašāk izmantotajiem medikamentiem T2D ārstēšanā (Aroda et al. 2018). Papildus glikozes produkcijas samazināšanai aknās un glikozes uzņemšanas palielināšanai muskuļos, arvien vairāk pierādījumu liecina, ka zarnu mikrobioms ir metformīna galvenā darbības vieta (Wu et al. 2017, Lee et al. 2021, Noel et al. 2021). Papildus tam, jaunākie dati liecina, ka metformīna terapija var būt saistīta ar sIgA līmeņa izmaiņām zarnās, tādējādi norādot uz iespējamu jaunu darbības mehānismu novērotajām mikrobioma izmaiņām un mikrobiomu mediētajiem terapeitiskajiem efektiem (Wells et al. 2015). Sekretorais IgA ir dominējošā antivielu klase gļotādas sekrēcijās, kas aizsargā pret patogēnu adhēziju un to šķērsošanu zarnu barjerā (Pietrzak et al. 2020). sIgA ir svarīga loma zarnu mikrobioma sastāva veidošanā, modulēšanā un zarnu homeostāzes uzturēšanā (Wells et al. 2015).

Bakalaura darba ietvaros tika apskatīta sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība un dinamika metformīna terapijas laikā. Tika analizēts un raksturots gan pētījuma dalībnieku vispārīgais zarnu mikrobioma taksanomiskais sastāvs, gan arī atlasīta un pētīta ar sIgA saistīto baktēriju frakcija. Līdz šim nav veikti pētījumi, kas analizētu metformīna terapijas ietekmi uz jaundiagnosticētu T2D pacientu un veselu indivīdu zarnu mikrobioma sastāvā esošām ar sIgA saistītajām baktērijām.

Salīdzinot IgA+ un *Presort* paraugus pirms metformīna terapijas uzsākšanas (M0), *Presort* paraugos novērojams palielināts īpatsvars *Alistipes* un *Rikenellaceae* baktērijām.

Alistipes ir gram-negatīvas, nūjiņveida, anaerobas un sporas neveidojošas baktērijas, kas galvenokārt ir sastopamas cilvēka zarnu traktā. Šī ir salīdzinoši jauna baktēriju ģints, fēču paraugos visbiežāk sastopamas tādas sugas, kā piemēram, *Alistipes finegoldii*, *Alistipes indistinctus*, *Alistipes timonensis*. Zinātniskie raksti liecina, ka šī baktērija var būt gan labvēlīga, gan kaitīga cilvēku veselībai. *A. finegoldii* suga tiek novērota pacientiem ar apendicīta sarežģījumiem, savukārt *A. timonensis* - veselā zarnu mikrobiomā. *A. finegoldii* parasti tiek saistīta ar hronisku zarnu iekaisumu un disbiozi (Parker et al. 2020). *Presort* paraugos ir novērojams arī *Rikenellaceae* palielināts baktēriju īpatsvars. *Rikenellaceae* baktēriju dzimta parasti ir sastopama zarnu mikrobiomā, tās ir ūdeņradi ražojošas baktērijas, kas selektīvi neitralizē citotoksiskos brīvos skābekļa radikāļus un aizsargā šūnas no oksidatīvā stresa (Xie et al. 2019).

Salīdzinot savā starpā IgA+ un *Presort* paraugos pēc trīs mēnešu metformīna terapijas (M3m) T2D pacientiem, tika identificētas palielināts *Roseburia* baktēriju īpatsvars *Presort* paraugos un palielināts *Proteobacteria* īpatsvars sIgA+ frakcijā. *Roseburia* ir viena no proteobakērijām, kas ir anaeroba un grampozitīva baktērija, kas producē resnajā zarnu traktā īso ķēžu taukskābes - butirātu. Zinātniskās publikācijas liecina, ka *R.intestinalis* novērš zarnu iekaisumu un uztur enerģijas homeostāzi, ražojot metabolītus (Nie et al. 2021). Fermentējot piruvātu un acetil-CoA, rodas plašs metabolītu klāsts, tostarp formiāts, laktāts un īso ķēžu taukskābes. Etiķskābe, propionskābe un sviestskābe ir visizplatītākās īso ķēžu taukskābes, kas atrodas cilvēka resnajā zarnā, un tām ir izteikta fizioloģiska ietekme uz veselību. Konkrēti, kolonocīti var oksidēt butirātu līdz CO₂, kas palīdz uzturēt hipoksisku epitēliju un veicina enerģijas homeostāzi. *Roseburia* suga ir nozīmīga cilvēka zarnu mikrobioma sastāvā, kas fermentē sarežģītus polisaharīdus līdz butirātam kā gala fermentācijas produktam, kas ietekmē cilvēka fizioloģiju un kalpo kā enerģijas avots kolonocītiem (Hillman et al. 2020). Kā arī *Roseburia* var ietekmēt dažādus vielmaiņas ceļus un ir saistīta ar vairākām slimībām (tostarp kairinātu zarnu sindromu, aptaukošanos, T2D, nervu sistēmas stāvokļiem un alerģijām (Tamanai-Shacoori et al. 2017). *Roseburia* ir sastopama zarnu mikrobiomā, kurai ir svarīga loma cilvēku imunitātē un patofizioloģijā. Tā ir baktērija, kas visvairāk ražo butirātu cilvēku zarnu traktā (Nie et al. 2021). *Roseburia* vairāk sastopama *Presort* paraugos varētu būt tāpēc, ka tā uztur homeostāzi, veicinot zarnu epitēlija šūnu augšanu, palielinot proteīnu ekspresiju un darbojoties kā pretiekaisuma līdzeklim (Kant et al. 2016).

Veicot zarnu mikrobioma paraugu analīzi, savā starpā tika salīdzināti veselo indivīdu paraugi divos laika punktos 1) M0 pret M7d, ar statistiski nozīmīgiem identificēja *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteria* un *Gammaproteobacteria* pārstāvjus, kuriem ir novērojamas lielāks baktēriju īpatsvars nedēļu pēc metformīna terapijas. *Enterobacteriales* ir gramnegatīvu, sporas neveidojošu, fakultatīvi anaerobu, nūjiņveida baktēriju kārtā, *Gammaproteobacteria* klasē (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2021). *Enterobacteriales* ir sastopama veselā indivīda zarnu traktā. Infekcijas laikā šis ģints baktērijas var iekļūt gļotu slānī, izkļūstot cauri gļotādas barjerai (Amaretti et al. 2020). Turpinot salīdzināt veselo indivīdu paraugus divos laika punktos 1) M0 pret M7d, novērots palielināts īpatsvars - *Eubacterium* un *Lachnospiraceae*. *Eubacterium* veic žultsskābes un holesterīna transformāciju zarnās, tādējādi veicinot to homeostāzi. Zarnu disbioze ir saistīta ar dažādām cilvēku slimībām (Mukherjee et al. 2020). *Lachnospiraceae* pieder pie zarnu mikrobioma tā sauktā “kodola”, kas kolonizē zarnu lūmenu kopš dzimšanas un palielinās sugu bagātības un to relatīvā daudzuma ziņā saimniekorganisma dzīves laikā (Vacca et al. 2020). Zarnu mikrobiomā komensālās baktērijas, konkrēti tievajā zarnā, lielākoties ir pārklātas ar IgA. Tās veicina zarnu homeostāzi, tieši inhibējot baktēriju virulences pazīmes un veicinot simbiozi starp baktērijām (Sterlin et al. 2020).

Pētījumā iekļautas divas automatizētās DNS izdalīšanas negatīvās kontroles, kas ļauj izvērtēt automatizētas DNS izolēšanas procesā radušos kontaminantus un nepieciešamības gadījumā tos izslēgt no tālākās datu analīzes. Paraugu apstrādē izmantotas negatīvās kontroles tika apstrādātas tāpat kā visi pārējie paraugi, bet tiem netiek apzināti pievienots ģenētiskais materiāls, tas tika aizvietots ar ūdeni. Reāģentu kontaminantus var novērot gan izdalīšanas negatīvās kontrolēs, gan polimerāzes ķēdes reakcijas negatīvās kontrolēs. Zinātniskajā literatūrā visbiežāk sastopamie reāģentu kontaminanti sakrīt ar pētījumā iegūtajām DNS izdalīšanas negatīvajās kontrolēs identificētajiem. Iegūtajās negatīvajās kontrolēs bija sastopamas *Ralstonia* un *Sphingomonas*. *Ralstonia* ir bieži sastopama polimerāzes ķēdes reakcijas reāģentu piesārņotājs un var būt atrodama DNS izdalīšanas reāģentu komplektā, kas var izraisīt tās kļūdainu parādīšanos analīzes datos (Salter et al. 2014).

Ņemot vērā pētījuma dizaina specifiku, kas nodrošina tikai jaundiagnosticētu T2D pacientu iekļaušanu pētījumā, medicīniski uzstādītais slimības ilgums visiem T2D kohortas

dalībniekiem ir līdzvērtīgs, tomēr, jāņem vērā, ka pacienti nereti vēršas pēc medicīniskas palīdzības novēloti, līdz ar to patiesais diabēta stāžs nav zināms. Viens no galvenajiem šī pētījuma trūkumiem ir salīdzinoši neliels pētījuma dalībnieku skaits: 19 jaundiagnosticēto pacientu un astoņi veselie indivīdi. Tālākai datu analīzei būtu nepieciešams iekļaut lielāku pētāmo paraugkopu. Salīdzinoši nelielā pētījuma paraugkopa varētu būt arī viens no iemesliem būtisko atšķirību trūkumam vairākos kontrastos. Tomēr svarīgi norādīt, ka longitudinālais dizains un tieši jaundiagnosticēto T2D pacientu iekļaušana analīzē ir būtiskas priekšrocības, kas lielākā paraugkopā varētu palīdzēt atklāt jaunus metformīna, zarnu mikrobioma un sIgA mijiedarbības mehānismus.

Tiek uzskatīts, ka novirzes imūnās atbildes reakcijās pret zarnu mikrobiomu ir galvenie iekaisīgo zarnu slimības patogēnēzes virzītāji (Rengarajan et al. 2020). Tomēr IgA un IgG atbildes reakcija uz zarnu baktērijām zarnu slimībās un tās saistība ar slimību smagumu nav līdz galam saprotama. Kā turpinājums šim pētījumam un tālākai rezultātu papildināšanai un jauno izvirzīto mērķu sasniegšanai ir plānots veikt detalizētāku IgA+ frakcijas izpēti un papildus veikt datu analīzes soļus, apskatot arī sekretorā IgA līmeni analizētajos paraugos. Bakalaura darba rezultāti tiks ziņoti FEBS3+ konferencē, Latvijas un Lietuvas Bioķīmijas Biedrībā. Darbu ir plānots turpināt, palielinot pētījuma dalībnieku paraugkopu, kā arī apskatot ar IgG saistīto baktēriju frakciju un tās iespējamo lomu metformīna terapijas efektos.

Secinājumi

1. Starp vispārējo mikrobioma kompozīciju (*Presort* paraugi) un IgA+ baktēriju frakcijām nav novērojamas būtiskas atšķirības iekšējā daudzveidībā.
2. T2D pacientiem novērojamas atšķirības salīdzinot vispārējo mikrobioma sastāvu (*Presort*) un IgA+ baktēriju frakciju M0 un M3m paraugos, kas liecina par iespējamu specifisku metformīna ietekmi uz IgA saistīšanos ar zarnu mikrobioma pārstāvjiem.
3. Veseliem indivīdiem metformīna lietošanas laikā sIgA+ frakcijā ir novērojama *Enterobacterales*, *Proteobacteria* un *Gammaproteobacteria* īpatsvara palielināšanās, kas norāda uz saimniekorganisma mijiedarbību ar zarnu mikrobiomu, ko varētu mediēt tieši metformīna lietošana.

Pateicības

Izsaku pateicību darba vadītājām Ilzei Elberei un Montai Brīvībai par palīdzību un ieteikumiem darba izstrādē, kā arī padomiem gan teorētiskajā, gan praktiskajā darbībā. Laurai Ansonai par zinātniskām konsultācijām un padomu sniegšanu. Līgai Birznieci un Guntaram Zariņam par padomiem un praktisku palīdzību darbā. Vēlos pateikties arī Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par iespēju izstrādāt kursa darbu. Liels paldies Latvijas Genoma centra laboratorijai par paraugu sekvenēšanu un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra IT un Bioinformātikas servisa centram par sekvenēšanas datu apstrādi.

Pētījums tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā Eiropas Reģionālā attīstības fonda (ERAF) Projekts Nr.: 1.1.1.1/19/A/036 “Sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība un dinamika antidiabētiskās terapijas laikā”.

Izmantotās literatūras avotu saraksts

1. Amaretti, A., Righini, L., Candelieri, F., Musmeci, E., Bonvicini, F., Gentilomi, G. A., Rossi, M., & Raimondi, S. (2020). Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Phenotyping, and Genotyping of Non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the Gut Microbiota of Healthy Subjects. *International journal of molecular sciences*, *21*(5), 1847. <https://doi.org/10.3390/ijms21051847>
2. American Diabetes Association (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, *32 Suppl 1*(Suppl 1), S62–S67. <https://doi.org/10.2337/dc09-S062>
3. Aroda, V. R., & Ratner, R. E. (2018). Metformin and Type 2 Diabetes Prevention. *Diabetes spectrum : a publication of the American Diabetes Association*, *31*(4), 336–342. <https://doi.org/10.2337/ds18-0020>
4. Bailey C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, *60*(9), 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
5. Bakema, J. E., & van Egmond, M. (2011). Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies?. *mAbs*, *3*(4), 352–361. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.4.16092>
6. Bansal N, Weinstock RS. Non-Diabetic Hypoglycemia. [Updated 2020 May 20]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK355894/>
7. Canani, R. B., Costanzo, M. D., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology*, *17*(12), 1519–1528. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>
8. Centers for Disease Control and Prevention 2021. Diabetic Ketoacidosis. <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetic-ketoacidosis.html>
9. Center for ecogenetics & Environmental 2014. The Human Microbiome https://depts.washington.edu/ceeh/downloads/FF_Microbiome.pdf

10. Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews. Nephrology*, *16*(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
11. Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., Amato, K. R., Clark, A. G., & Knight, R. (2017). The human microbiome in evolution. *BMC biology*, *15*(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0454-7>
12. de Sousa-Pereira, P., & Woof, J. M. (2019). IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, *8*(4), 57. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
13. Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., & Verma, A. K. (2020). Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of microbiology*, *202*(8), 2147–2167. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
14. De Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, *71*(5), 1020–1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789>
15. Cleary EM, Thung SF, Buschur EO. Gestational Diabetes. [Updated 2021 Jul 26]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572755/>
16. Donaldson, G. P., Ladinsky, M. S., Yu, K. B., Sanders, J. G., Yoo, B. B., Chou, W. C., Conner, M. E., Earl, A. M., Knight, R., Bjorkman, P. J., & Mazmanian, S. K. (2018). Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science (New York, N.Y.)*, *360*(6390), 795–800. <https://doi.org/10.1126/science.aag0926>
17. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>

18. Fletcher, B., Gulanick, M., & Lamendola, C. (2002). Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *The Journal of cardiovascular nursing*, *16*(2), 17–23. <https://doi.org/10.1097/00005082-200201000-00003>
19. Franzosa, E. A., Huang, K., Meadow, J. F., Gevers, D., Lemon, K. P., Bohannon, B. J., & Huttenhower, C. (2015). Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(22), E2930–E2938.
20. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, *21*(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
21. Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L. M., Fernandez-Merino, C., & Vidal, C. (2008). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clinical and experimental immunology*, *151*(1), 42–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x>
22. Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. [Updated 2021 Sep 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>
23. Gupta, A., Gupta, A. K., & Singh, T. P. (2013). Occurrence of complications in newly diagnosed type 2 diabetes patients: a hospital based study. *Journal of the Indian Medical Association*, *111*(4), 245–247.
24. Hillman, E. T., Kozik, A. J., Hooker, C. A., Burnett, J. L., Heo, Y., Kiesel, V. A., Nevins, C. J., Oshiro, J., Robins, M. M., Thakkar, R. D., Wu, S. T., & Lindemann, S. R. (2020). Comparative genomics of the genus *Roseburia* reveals divergent biosynthetic pathways that may influence colonic competition among species. *Microbial genomics*, *6*(7), mgen000399. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000399>
25. Hoogwerf B. J. (2020). Type of diabetes mellitus: Does it matter to the clinician?. *Cleveland Clinic journal of medicine*, *87*(2), 100–108. <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.19020>

26. Irons, B. K., & Minze, M. G. (2014). Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 7, 15–24. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S38753>
27. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
28. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The structure of a typical antibody molecule. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>
29. Jones, J., Reinke, S. N., Ali, A., Palmer, D. J., & Christophersen, C. T. (2021). Fecal sample collection methods and time of day impact microbiome composition and short chain fatty acid concentrations. *Scientific reports*, 11(1), 13964. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93031-z>
30. Kant R, Rasinkangas P, Satokari R, Pietilä TE, Palva A. Genome sequence of the butyrate-producing anaerobic bacterium *Anaerostipes hadrus* PEL 85. *Genome Announc* (2016) 3(2):3–4. doi: 10.1128/genomeA.00224-15
31. Kerr M. A. (1990). The structure and function of human IgA. *The Biochemical journal*, 271(2), 285–296. <https://doi.org/10.1042/bj2710285>
32. Khan, M., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H., & Al Kaabi, J. (2020). Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of epidemiology and global health*, 10(1), 107–111. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191028.001>
33. Lee, C. B., Chae, S. U., Jo, S. J., Jerng, U. M., & Bae, S. K. (2021). The Relationship between the Gut Microbiome and Metformin as a Key for Treating Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3566. <https://doi.org/10.3390/ijms22073566>
34. Lende, M., & Rijhsinghani, A. (2020). Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9573. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249573>

35. Leong, K. W., & Ding, J. L. (2014). The unexplored roles of human serum IgA. *DNA and cell biology*, 33(12), 823–829. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2639>
36. Lucier J, Weinstock RS. Diabetes Mellitus Type 1. [Updated 2022 May 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507713/>
37. Lv, Z., & Guo, Y. (2020). Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Frontiers in endocrinology*, 11, 191. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00191>
38. Martinez, J. E., Kahana, D. D., Ghuman, S., Wilson, H. P., Wilson, J., Kim, S., Lagishetty, V., Jacobs, J. P., Sinha-Hikim, A. P., & Friedman, T. C. (2021). Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Frontiers in endocrinology*, 12, 667066. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.667066>
39. Mathew P, Thoppil D. Hypoglycemia. [Updated 2022 Jan 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534841/>
40. McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, 59(3), 426–435. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>
41. Mohajeri, M. H., Brummer, R., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H., Faas, M., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European journal of nutrition*, 57(Suppl 1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>
42. Mukherjee, A., Lordan, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut microbes*, 12(1), 1802866. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1802866>
43. Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Metformin: Current knowledge. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(7), 658–664.
44. Nie, K., Ma, K., Luo, W., Shen, Z., Yang, Z., Xiao, M., Tong, T., Yang, Y., & Wang, X. (2021). *Roseburia intestinalis*: A Beneficial Gut Organism From the

- Discoveries in Genus and Species. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 757718. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.757718>
45. Noel T. Mueller, Moira K. Differding, Mingyu Zhang, Nisa M. Maruthur, Stephen P. Juraschek, Edgar R. Miller, Lawrence J. Appel, Hsin-Chieh Yeh; (2021) Metformin Affects Gut Microbiome Composition and Function and Circulating Short-Chain Fatty Acids: A Randomized Trial.; *44* (7): 1462–1471.
46. Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., & Olasehinde, G. I. (2020). The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International journal of microbiology*, *2020*, 8045646. <https://doi.org/10.1155/2020/8045646>
47. Pabst, O., Slack, E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunol* *13*, 12–21 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4>
48. Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine connections*, *7*(1), R38–R46. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
49. Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in immunology*, *11*, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
50. Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., & Schmidt, M. (2020). Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *International journal of molecular sciences*, *21*(23), 9254. <https://doi.org/10.3390/ijms21239254>
51. Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
52. Primavera, M., Giannini, C., & Chiarelli, F. (2020). Prediction and Prevention of Type 1 Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, *11*, 248. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00248>

53. Quintanilla Rodriguez BS, Mahdy H. Gestational Diabetes. [Updated 2022 Feb 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545196/>
54. Rasmussen, L., Poulsen, C. W., Kampmann, U., Smedegaard, S. B., Ovesen, P. G., & Fuglsang, J. (2020). Diet and Healthy Lifestyle in the Management of Gestational Diabetes Mellitus. *Nutrients*, *12*(10), 3050. <https://doi.org/10.3390/nu12103050>
55. Reed, J., Bain, S., & Kanamarlapudi, V. (2021). A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, *14*, 3567–3602. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895>
56. Rengarajan, S., Vivio, E. E., Parkes, M., Peterson, D. A., Roberson, E., Newberry, R. D., Ciorba, M. A., & Hsieh, C. S. (2020). Dynamic immunoglobulin responses to gut bacteria during inflammatory bowel disease. *Gut microbes*, *11*(3), 405–420. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1626683>
57. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, *7*(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
58. Rodriguez, J., Hiel, S., & Delzenne, N. M. (2018). Metformin: old friend, new ways of action-implication of the gut microbiome?. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *21*(4), 294–301. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000468>
59. Rogers, K. (2022, January 4). *human microbiome*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/human-microbiome>
60. Ruisheng Song; Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites. *Diabetes Care* 1 February 2016; 39 (2): 187–189. <https://doi.org/10.2337/dci15-0013>
61. Rushakoff RJ. Inpatient Diabetes Management. [Updated 2019 Jan 7]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278972/>

62. Salter S. J., Cox M. J., Turek E. M., Calus S. T., Cookson W. O., Moffatt M. F., Turner P., Parkhill J., Loman N. J., & Walker A. W. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. - *BMC biology*, 12, 87.
63. Sanchez-Rangel, E., Inzucchi, S.E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia*60, 1586–1593 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4336-x>
64. Sapra A, Bhandari P. Diabetes Mellitus. [Updated 2021 Sep 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
65. Schmidt A. M. (2018). Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(1), e1–e8. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310221>
66. Schmidt, T., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, 172(6), 1198–1215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>
67. Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
68. Sensoy I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Current research in food science*, 4, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
69. Stecher B. (2015). The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiology spectrum*, 3(3),10.1128/microbiolspec.MBP-0008-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0008-2014>
70. Sterlin D, Fadlallah J, Adams O, Fieschi C, Parizot C, Dorgham K, Rajkumar A, Autaa G, El-Kafsi H, Charuel JL, Juste C, Jönsson F, Candela T, Wardemann H, Aubry A, Capito C, Brisson H, Tresallet C, Cummings RD, Larsen M, Yssel H, von Gunten S, Gorochoy G. Human IgA binds a diverse array of commensal bacteria. *J Exp Med*. 2020 Mar 2;217(3):e20181635. doi: 10.1084/jem.20181635.

Erratum in: J Exp Med. 2020 Mar 2;217(3): PMID: 31891367; PMCID: PMC7062531.

71. Su, Q., & Liu, Q. (2021). Factors Affecting Gut Microbiome in Daily Diet. *Frontiers in nutrition*, 8, 644138. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.644138>
72. Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2017). Roseburia spp.: a marker of health?. *Future microbiology*, 12, 157–170. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0130>
73. ThermoFisher Scientific 2020. Immunoglobulin ter/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-igg-class.html
74. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
75. Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
76. Vogtmann, E., Chen, J., Amir, A., Shi, J., Abnet, C. C., Nelson, H., Knight, R., Chia, N., & Sinha, R. (2017). Comparison of Collection Methods for Fecal Samples in Microbiome Studies. *American journal of epidemiology*, 185(2), 115–123. <https://doi.org/10.1093/aje/kww177>
77. Wei, H., & Wang, J. Y. (2021). Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM Transcytosis. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2284. <https://doi.org/10.3390/ijms22052284>
78. Wells, J. M., Brummer, R. J., Derrien, M., MacDonald, T. T., Troost, F., Cani, P. D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W. M., Mercenier, A., Nauta, A., & Garcia-Rodenas, C. L. (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 312(3), G171–G193. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00048.2015>
79. Woof, J. M., & Kerr, M. A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology*, 208(2), 270–282. <https://doi.org/10.1002/path.1877>

80. Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V. *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 23, 850–858 (2017). <https://doi.org/10.1038/nm.4345>
81. Yan, J., Herzog, J. W., Tsang, K., Brennan, C. A., Bower, M. A., Garrett, W. S., Sartor, B. R., Aliprantis, A. O., & Charles, J. F. (2016). Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(47), E7554–E7563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607235113>
82. Yang Y, Palm NW. Immunoglobulin A and the microbiome. *Curr Opin Microbiol.* 2020 Aug;56:89-96. doi: 10.1016/j.mib.2020.08.003. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32889295.
83. Xie, Y., Li, W., Zhu, L., Zhai, S., Qin, S., & Du, Z. (2019). Effects of phycocyanin in modulating the intestinal microbiota of mice. *MicrobiologyOpen*, 8(9), e00825. <https://doi.org/10.1002/mbo3.825>
84. Zhu, B., Wang, X., & Li, L. (2010). Human gut microbiome: the second genome of the human body. *Protein & cell*, 1(8), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0093-z>
85. Zimmet, P.Z. Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history?. *Clin Diabetes Endocrinol* 3, 1 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40842-016-0039-3>

Pielikumi

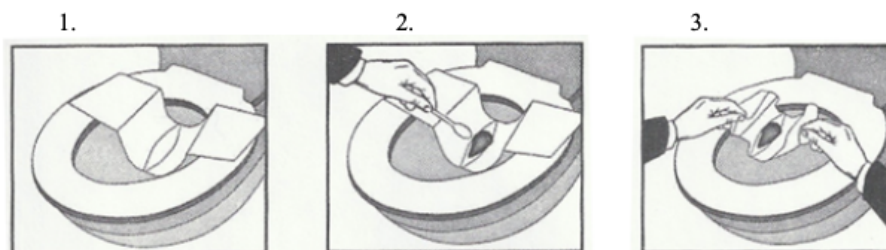
Mikrobioma parauga ievākšanas instrukcija.

Fēču paraugu ievākšanai Jums ir izsniegti divi speciāli tam paredzēti (kodēti) stobriņi ar etiķetēm un *FecesCather* salvete. Abi stobriņi paredzēti parauga paņemšanai no viena fēču parauga!

Ievācot fēču paraugus, lūdzam ievērot:

- ▶ Lūgums ieplānot fēču paraugu ievākšanu **pēc uztura dienasgrāmatas aizpildīšanas un pēc iespējas tuvāk vizītes laikam medicīnas iestādē!**
- ▶ Lai iegūtu ticamus pētījumu rezultātus, fēču paraugs **nedrīkst nonākt** saskarē ar tualetes poda virsmu, urīnu, ūdeni un tīrīšanas līdzekļiem!
- ▶ Abiem stobriņiem uz etiķetēm tam paredzētajās vietās, lūdzu, uzrakstiet paraugu **ievākšanas datumu un laiku!**
- ▶ Stobriņus uzglabājiet **istabas temperatūrā** un pēc iespējas īsākā laikā nogādājiet tos attiecīgajā medicīnas iestādē (**ieteicams tekošajā vai nākamajā dienā, t.i. ~24h laikā**).

FecesCather salvete padara vieglāku fēču paraugu iegūšanu. Tas ir viegli un higiēniski!



FecesCather salveti izmanto šādi:

1. Nomazgājiet rokas pirms sākat parauga ievākšanu.
2. Atveriet *FecesCather* salveti virzienā, kurš norādīts ar bultiņām.
3. Pielīmējiet *FecesCather* salveti pie tualetes poda sēdekļa, kā tas ir parādīts 1.attēlā.
4. Izvarieties no fēču parauga saskares ar tualetes poda ūdeni.
5. Pēc defekācijas, paņemiet fēču paraugu, kā tas ir parādīts 2.attēlā:
 - Atskrūvējiet speciālo stobriņu un ar tajā ievietoto karotīti paņemiet nelielu daudzumu fēču no vismaz trīs dažādām vietām un dziļuma (**aptuveni vienu piekto daļu (1/5) no stobriņa tilpuma**). Stobriņu cieši aizskrūvējiet;
 - **Uzrakstiet uz stobriņa ievākšanas datumu un laiku;**
 - Atkārtojiet parauga ievākšanu ar otru stobriņu;
6. Pēc fēču parauga paņemšanas, atlīmējiet *FecesCather* salveti un savienojiet abas salvetes malas kopā.
7. Iemetiet *FecesCather* salveti tualetes podā, pagaidiet, kamēr tā kļūst mīksta, tad noskalojiet to.
8. Ievietojiet abus speciālos stobriņus necaurspīdīgajā un ūdens-necaurlaidīgajā maisiņā, cieši aizvelciet ciet. Rūpīgi nomazgājiet rokas. **Nogādājiet necaurspīdīgo maisiņu ar fēču paraugiem kopā ar aizpildītajiem dokumentiem medicīnas iestādē 24 stundu laikā.**

Bakalaura darbs „Sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība un dinamika antidiabētiskās terapijas laikā” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Mišela Sivaka _____ 30.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājas:

Dr.biol. Monta Brīvība _____ 30.05.2022

Dr.biol. Ilze Elbere _____ 30.05.2022

Recenzents: Dr.biol. Ineta Kalniņa _____

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 30.05.2022.

Lietvede: Liliāna Teļeševa _____

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

06.06.2022 prot. Nr. _____, vērtējums

Komisijas sekretārs/e: _____