

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПЕТАХ ПАВЛО ВЛАДИСЛАВОВИЧ

УДК 616.34-008.87:612.017:612.112:[616.98:578.834.1]-06:616.378-
008.64(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**SARS-COV-2 ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ КИШКОВОЇ МІКРОБІОТИ ТА
ІМУНОМЕТАБОЛІЗМУ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ НА
ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ П.В. Петах

Науковий керівник: **Камишний Олександр Михайлович**, доктор медичних наук, професор

Тернопіль – 2023

АНОТАЦІЯ

Петак П. В. SARS-CoV-2 індуковані зміни кишкової мікробіоти та імунометаболізму лімфоцитів у хворих на цукровий діабет 2 типу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню змін кишкової мікробіоти та функціонального стану лімфоцитів у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу (ЦД-2).

Першим етапом дослідження було встановити особливості гематологічних показників із COVID-19 та ЦД-2 в періоди переважання варіантів Дельта або Оміврон та залежно від типу гіпоглікемічної терапії. Встановлено, що пацієнти з ЦД-2 у період переважання варіанту Дельта мали вищі значення загальної кількості лейкоцитів і лімфоцитів порівняно з пацієнтами без діабету. Порівнюючи групу COVID-19 пацієнтів із ЦД-2 і без діабету у період переважання варіанту Оміврон, виявлено, що гематологічні показники достовірно не відрізнялися між досліджуваними групами. Аналізуючи групи пацієнтів з діабетом в періоди домінування варіантів Дельта та Оміврон, виявлено, що пацієнти з ЦД-2 у період домінування варіанту Дельта мали достовірно вищі рівні прокальцитоніну та моноцитів. Важливою складовою дослідження було також виявити особливості гематологічних показників у COVID-19 пацієнтів з ЦД-2 залежно від прийому метформіну. Виявлено, що пацієнти, котрі отримували метформін, мали достовірно достовірно нижчі рівні С-реактивного протеїну (СРП).

Наступним етапом дослідження було визначити особливості кишкової мікробіоти у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 і встановити роль антибіотикотерапії та метформіну в модуляції складу кишкової мікробіоти. Спочатку було проведено систематичний огляд 13 клінічних досліджень, щоб встановити мікробіото-модулюючі ефекти метформіну. Виявлено, що метформін здатен впливати на склад та різноманіття кишкової мікробіоти, проте дані є неоднозначними. Основна причина цього полягає в різній дозі метформіну, періоду його прийому, тривалості спостереження за пацієнтами, а також у методах аналізу кишкової мікробіоти.

Наступним завданням було встановити особливості кишкової мікробіоти пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 і впливу антибіотикотерапії та метформіну на її склад. Дослідження проводили культуральним методом. Встановлено, що у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 кишкова мікробіота характеризувалася зниженням чисельності нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* та лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus*, а також збільшення кількості грибів роду *Candida*. Пацієнти з COVID-19, котрі приймали антибактеріальну терапію, мали більшу чисельність імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus*, дріжджеподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Clostridium*. Кишкова мікробіота пацієнтів із ЦД-2 та COVID-19, які отримували цукрознижуючу терапію метформіном, без лікування антибактеріальними препаратами характеризувалася збільшеною чисельністю представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та імуномодулювальної *E. coli*, а також зменшення родів *Clostridium* та *Enterococcus* порівняно з групою, яка отримувала антибактеріальну терапію. Також було виявлено кореляційний зв'язок між чисельністю певних родів мікроорганізмів та рівнем СРП, а також тривалістю перебування пацієнтів у стаціонарі. У пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 виявлено позитивну кореляцію між чисельністю *Clostridium* spp.,

Klebsiella spp., *Enterococcus* spp. та *Candida* spp. та рівнем СРП, а також негативну кореляцію з чисельністю лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та нейроактивних і лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*.

Ще одним важливим завдання було не тільки виявити зміни на рівні окремих родів мікроорганізмів, але й оцінити особливості альфа-різноманіття. Виявлено, що пацієнти з COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію, мали меншу альфа-різноманітність кишкової мікробіоти порівняно з тими пацієнтами, хто не приймав антибактеріальну терапію. Наявність ЦД-2 у пацієнтів із COVID-19 не мала суттєвого впливу на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти. Пацієнти з ЦД-2 та COVID-19, які приймали антибактеріальну терапію та метформін, мали достовірно значущі відмінності у досліджуваних індексах альфа-різноманіття порівняно з тими пацієнтами, хто не отримував антибактеріальної терапії. Досліджувані індекси альфа-різноманіття корелювали з кількістю ліжко-днів, СРП та нейтрофільно-лімфоцитарним співвідношенням (НЛС).

Було проаналізовано також зміни співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2. Виявлено, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 мали вище F/B співвідношення порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2. Виявлено також, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які приймали метформін, мали більше *Firmicutes* та менше *Bacteroidetes*, ніж ті, хто не приймав метформін. Проте, статистично значущих відмінностей між цими групами пацієнтів у F/B співвідношенні не було виявлено. Було встановлено також позитивний кореляційний зв'язок між співвідношенням F/B та рівнем СРП у пацієнтів із ЦД-2.

Для оцінки впливу гіпоглікемічної та антибіотикотерапії на імунометаболізм лімфоцитів було проведено визначення транскрипційної активності генів *PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR* методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу. Встановлено,

що антибактеріальна терапія у пацієнтів із COVID-19, які не мали ЦД-2, достовірно не впливала на експресію генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR*. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які отримували інсулінотерапію, мали знижену експресію гена *PRKAA1* та підвищену експресію генів *SLC2A1* і *MTOR* порівняно з контрольною групою (пацієнтами, котрі не приймали антибактеріальної терапії і не мали ЦД-2). Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін, мали значно збільшену експресію *PRKAA1*, але знижені рівні експресії *SLC2A1* та *MTOR*. Кореляційний аналіз встановив зв'язок між рівнями експресії досліджуваних генів *PRKAA1*, *SLC2A*, *MTOR* та біомаркерами запалення. Зокрема, виявлені негативні кореляційні зв'язки між експресією гена *PRKAA1* і показниками НЛС, СРП та прокальцитоніну, а також позитивні кореляційні зв'язки між експресією генів *SLC2A1* та *MTOR* із цими ж біомаркерами.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертації вперше встановлено особливості змін кишкової мікробіоти у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін або антибактеріальну терапію, виявлено зміни на рівні чисельності окремих родів, а також зміни індексів альфа-різноманітності.

Вперше встановлено кореляційні зв'язки між чисельністю окремих родів мікроорганізмів, а також індексів альфа-різноманіття з біомаркерами запалення зокрема такими, як СРП та НЛС.

Вперше показано, що наявність ЦД-2 у пацієнтів з COVID-19 не мала суттєвого впливу на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти, проте встановлено, що пацієнти з ЦД-2 та COVID-19, які приймали антибактеріальну терапію та метформін, мали достовірно значущі відмінності в індексах альфа-різноманітності порівняно з тими, хто не приймав антибактеріальної терапії.

Вперше виявлено, що F/V співвідношення було вищим у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2, а також виявлено кореляційні зв'язки між цим співвідношенням та рівнем СРП.

Вперше досліджено зміни транскрипційної активності генів *PRKAA1*, *SLC2A*, *MTOR* у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2. Виявлено, що антибактеріальна терапія не впливала на експресію цих генів. Інсулінотерапія в пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 призводила до зниження експресії гена *PRKAA1* та підвищення експресії генів *SLC2A1* і *MTOR*. Прийом метформіну сприяв збільшенню експресії гена *PRKAA1*, але знижував рівні експресії генів *SLC2A1* та *MTOR*. Виявлено кореляційні зв'язки між рівнями експресії цих генів та запальними біомаркерами (НЛС, СРП і прокальцитонін), що може вказувати на можливий вплив цих генів на перебіг COVID-19 у пацієнтів із ЦД-2.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати свідчать про те, що виявлені зміни кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 можуть впливати на біомаркери запалення, а отже, і на клінічний перебіг захворювання. Таким чином, корекція кишкової мікробіоти у цій групі коморбідних пацієнтів може стати однією з важливих опцій персоніфікованого підходу до лікування. Виявлені зміни імунометаболізму лімфоцитів при прийомі метформіну та їх зв'язок з біомаркерами запалення доводить потенційні переваги метформіну та поглиблює існуючі відомості, що відкриває нові горизонти для лікування цієї коморбідної патології.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджено в практику та навчальний процес кафедри біохімії та фармакології, кафедри факультетської терапії ДВНЗ «Ужгородський національний університет», а також у КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня» Закарпатської обласної ради, що засвідчують відповідні акти впровадження.

Ключові слова: COVID-19, цукровий діабет 2-го типу, мікробіота, дисбіоз, метформін, імунометаболізм, антибіотики, Т-лімфоцити, mTOR, Lactobacillus.

ABSTRACT

Petakh P. V. SARS-CoV-2-induced changes in gut microbiota and lymphocyte immunometabolism in patients with type 2 diabetes. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 222 «Medicine» (22 «Healthcare»). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

The dissertation is dedicated to the study of changes in the gut microbiota and the functional state of lymphocytes in patients with COVID-19 and type 2 diabetes (T2D).

The first stage of the study aimed to establish the peculiarities of hematological parameters in patients with COVID-19 and T2D during periods of prevalence of the Delta or Omicron variants and depending on the type of hypoglycemic therapy. "It was found that patients with T2D during the prevalence of the Delta variant had higher levels of white blood cell counts and lymphocytes compared to patients without diabetes. When comparing the COVID-19 group of patients with T2D to those without diabetes during the prevalence of the Omicron variant, haematological parameters did not differ significantly between the study groups. When analyzing the groups of patients with diabetes during the periods of predominance of the Delta and Omicron variants, it was found that patients with T2D during the period of Delta variant predominance had significantly higher levels of procalcitonin and monocytes. An important component of the study was to identify the peculiarities of hematological parameters in COVID-19 patients

with T2D depending on metformin therapy. It was found that patients treated with metformin had significantly lower levels of C-reactive protein (CRP).

The next stage of the study aimed to determine the characteristics of the gut microbiota in patients with COVID-19 and T2D and to establish the role of antibiotic therapy and metformin in modulating the composition of the gut microbiota. Initially, a systematic review of 13 clinical trials was conducted to establish the microbiota-modulating effects of metformin. It was found that metformin can affect the composition and diversity of the gut microbiota, but the data are ambiguous. The main reason for this ambiguity lies in the different doses of metformin, the duration of its administration, the period of patient follow-up, and the methods of analyzing the gut microbiota.

The following task was to determine the characteristics of the gut microbiota of patients with COVID-19 and T2D and the effect of antibiotic therapy and metformin on its composition. The study was conducted using the culture method. In patients with both COVID-19 and T2D, the gut microbiota was found to be characterized by a reduction in the abundance of neuroactive and lactate-producing bacteria from the *Bifidobacterium* genus, as well as lactate-producing bacteria belonging to the *Lactobacillus* genus. Additionally, there was an increase in the prevalence of fungi from the *Candida* genus. Among COVID-19 patients who received antibiotic therapy, there was a higher abundance of immunomodulatory bacteria from the *Enterococcus* genus, yeast-like fungi from the *Candida* genus, and bacteria from the *Clostridium* genus.

The gut microbiota of patients with both T2D and COVID-19, treated with metformin antidiabetic therapy but without antibacterial drugs, exhibited an increased abundance of acetate-propionate-producing bacteria from the *Bacteroides* genus, lactate-producing bacteria belonging to the *Lactobacillus* genus, and immunomodulatory *E. coli*. Additionally, there was a decrease in the *Clostridium* and *Enterococcus* genera compared to the group receiving antibiotic therapy. A correlation was also observed between the abundance of specific genera

of microorganisms and the levels of CRP, as well as the length of hospital stay. Among patients with COVID-19 and T2D, a positive correlation was discovered between the abundance of *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., and *Candida* spp., and the CRP levels, while a negative correlation was noted with the abundance of lactate-producing bacteria from the *Lactobacillus* genus, as well as neuroactive and lactate-producing bacteria from the *Bifidobacterium* genus.

Another significant task was not only to assess changes at the level of individual microbial genera but also to evaluate the characteristics of alpha diversity. It was discovered that patients with COVID-19 who received antibiotic therapy had lower alpha diversity of the gut microbiota compared to those who did not undergo antibiotic therapy. The presence of T2D in patients with COVID-19 did not have a significant effect on the alpha diversity of the gut microbiota. Patients with both T2D and COVID-19 who received both antibiotic therapy and metformin displayed significant differences in the studied alpha diversity indices compared to those who did not receive antibiotic therapy. The studied indices of alpha diversity correlated with the number of days spent in bed, CRP levels, and the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR).

Changes in the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio in patients with COVID-19 and T2D were also analyzed. It was observed that patients with both COVID-19 and T2D had a higher F/B ratio in comparison to patients with only COVID-19 and without T2D. Additionally, it was found that patients with COVID-19 and T2D who were taking metformin had more Firmicutes and fewer Bacteroidetes compared to those not taking metformin. However, statistically significant differences in the F/B ratio between these patient groups were not identified. Furthermore, a positive correlation was found between the F/B ratio and CRP levels in patients with T2D.

To evaluate the impact of hypoglycemic and antibiotic therapy on lymphocyte immunometabolism, the transcriptional activity of the genes *PRKAA1*,

SLC2A1, and *MTOR* was determined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The investigation revealed that antibiotic therapy in patients with COVID-19 but without T2D did not significantly affect the expression of *PRKAA1*, *SLC2A1*, and *MTOR* genes. Patients with COVID-19 and T2D undergoing insulin therapy exhibited decreased expression of the *PRKAA1* gene and increased expression of the *SLC2A1* and *MTOR* genes in comparison to the control group (patients not receiving antibiotic therapy and lacking T2D). Additionally, patients with COVID-19 and T2D treated with metformin showed significantly increased *PRKAA1* expression but decreased levels of *SLC2A1* and *MTOR* gene expression. Correlation analysis established connections between the expression levels of the studied genes (*PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR*) and inflammatory biomarkers. Specifically, negative correlations were found between *PRKAA1* gene expression and NLR, CRP, and procalcitonin. Positive correlations were observed between *SLC2A1* and *MTOR* gene expression and the same inflammatory biomarkers.

Scientific novelty of the results: The dissertation is the first to identify distinctive changes in the gut microbiota of patients with both COVID-19 and T2D undergoing metformin or antibiotic therapy, revealing alterations in the abundance of individual genera as well as shifts in alpha diversity indices. The study established novel correlations between the abundances of individual microbial genera and alpha diversity indices with inflammatory biomarkers like CRP and NLR. Additionally, the research demonstrated that while the presence of T2D in COVID-19 patients didn't significantly impact the alpha diversity of the gut microbiota, patients with T2D and COVID-19 who underwent antibiotic therapy and metformin exhibited noteworthy differences in alpha diversity indices compared to those without antibiotic therapy. Moreover, the research highlighted the higher F/B ratio in patients with both COVID-19 and T2D in contrast to patients with only COVID-19 and without T2D, along with the correlations between this ratio and CRP levels.

Furthermore, the investigation explored changes in the transcriptional activity of *PRKAA1*, *SLC2A1*, and *MTOR* genes in patients with both COVID-19 and T2D for the first time. It was observed that antibacterial therapy did not influence the gene expression of these genes. Patients with COVID-19 and T2D receiving insulin therapy demonstrated decreased *PRKAA1* gene expression and increased *SLC2A1* and *MTOR* gene expression. The administration of metformin resulted in increased *PRKAA1* gene expression but decreased expression levels of *SLC2A1* and *MTOR* genes. Correlations were established between the expression levels of these genes and inflammatory biomarkers (NLR, CRP, and procalcitonin), suggesting a potential influence of these genes on the course of COVID-19 in patients with T2D.

Practical significance of the results: The findings indicate that the observed changes in the gut microbiota among patients with COVID-19 and T2D could influence inflammatory biomarkers and consequently impact the clinical course of the disease. Therefore, rectifying the gut microbiota in this subset of patients with comorbidities could emerge as a vital option for personalized treatment approaches. The identified alterations in lymphocyte immunometabolism due to metformin usage, along with their correlation with inflammatory biomarkers, underscore the potential advantages of metformin and contribute to the deepening of current knowledge. This, in turn, unveils new possibilities for treating this comorbid condition.

The main provisions of the dissertation have been implemented in the practice and educational processes of the Department of Biochemistry and Pharmacology, the Department of Faculty Therapy at Uzhhorod National University, as well as in the Transcarpathian Regional Clinical Infectious Diseases Hospital, as evidenced by the relevant implementation acts.

Keywords: COVID-19, type 2 diabetes, diabetes mellitus type 2, microbiota, dysbiosis, metformin, immunometabolism, antibiotics, T lymphocytes, mTOR, Lactobacillus.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні результати дисертації

1. **Petakh P**, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina). 2022;76(5):329-32. DOI: 10.5455/medarh.2022.76.329-332 (**Scopus; CiteScore 2.2; SCImago Q3 – Medicine (miscellaneous)**) *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
2. **Petakh P**, Loshak K, Kamyshnyi A. Hematological features of patients with type 2 diabetes depending on the variant of SARS-COV-2. Fiziologichnyi Zhurnal. 2023;69(1):35-42. DOI: 10.15407/fz69.01.035 (**Scopus; CiteScore 0.4; SCImago Q4 – Physiology**) *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
3. **Petakh P**, Kobyljak N, Kamyshnyi A. Gut microbiota in patients with COVID-19 and type 2 diabetes: A culture-based method. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Feb 9;13:1142578. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1142578 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 6.4; IF 5.7; SCImago Q1 – Infectious Diseases**) *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
4. **Petakh P**, Kamyshna I, Oksenysh V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Jun 20;16(6):904 DOI: 10.3390/ph16060904 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 4.7; IF 4.6;**

- SCImago Q1 – Pharmaceutical Science)** *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
5. **Petakh P**, Oksenysh V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;163:114892. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114892 **(Scopus & Web of Science; CiteScore 12.6; IF 7.5; SCImago Q1 – Medicine (miscellaneous))** *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
 6. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of metformin on the gut microbiota: A systematic review. *Mol Metab*. 2023 Sep 9;77:101805. DOI: 10.1016/j.molmet.2023.101805 **(Scopus & Web of Science; CiteScore 12.6; IF 8.1; SCImago Q1 – Cell Biology)** *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*
 7. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Gene expression of protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (*PRKAA1*), solute carrier family 2 member 1 (*SLC2A1*) and mechanistic target of rapamycin (*MTOR*) in metformin-treated type 2 diabetes patients with COVID-19: impact on inflammation markers. *Inflammopharmacology*. 2023:1-7. DOI: 10.1007/s10787-023-01341-7 **(Scopus & Web of Science; CiteScore 8.1; IF 5.8; SCImago Q1 – Pharmacology)** *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. **Petakh P**. Laboratory characteristics among patients with type two diabetes (T2D) who were hospitalized with SARS-COV-2 infection during periods of

- DELTA and OMICRON variant predominance in the Transcarpatian region of Ukraine. In: Proceedings of all-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against Russian invaders; 2022 June 15-17; Kyiv. Kyiv. p. 73.
9. **Petakh P.** Gut microbiota changes in COVID-19 patients with Type 2 Diabetes: Potential Impact on Disease Progression. В: Матеріали ХХ Міжнародної науково-практичної студентської конференції «Uzhhorod Medical Students Conference»; 2023 квітня 26-29; Ужгород. Ужгород; 2023, с. 138–9.
 10. **Petakh P.** Exploring the link between gut microbiome and inflammation in Type 2 Diabetes and COVID-19: the potential of F/B ratio and metformin treatment. В: Матеріали ХХVІІ конгрес студентів та молодих учених «майбутнє за наукою»; 2023 квітня 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2023, с.268.
 11. **Петак П.В.** Експресія генів (*PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR*) та маркери запалення у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та COVID-19: роль метформіну. В: Матеріали LXVI науково-практичної конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини»; 2023 черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль; 2023, с. 133-4.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

12. **Petakh P**, Камышна I, Nykyforuk A, Yao R, Imbery J, Oksenysh V, Korda M, Kamyshnyi A. Immunoregulatory Intestinal Microbiota and COVID-19 in Patients with Type Two Diabetes: A Double-Edged Sword. *Viruses*. 2022;14:477. DOI: 10.3390/v14030477 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 7.1; IF 4.7; SCImago Q1 – Infectious Diseases**) *(Здобувачем*

проаналізовано джерела літератури, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)

13. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Unveiling the Potential Pleiotropic Effects of Metformin in Treating COVID-19: A Comprehensive Review. *Front Mol Biosci.* 2023;10:1260633. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1260633 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 4.8; IF 5.0; SCImago Q1 – Biochemistry**) *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку)*

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ | 20 |
| ВСТУП | 22 |
| РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 29 |
| 1.1 Коронавірусна хвороба 2019 та цукровий діабет 2-го типу, коморбідність | 29 |
| 1.2 Вплив метформіну та інсуліну на перебіг COVID-19 у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу – потенційні механізми..... | 31 |
| 1.3 Імунометаболізм Т-лімфоцитів при цукровому діабеті 2 типу, роль метформіну та інсуліну | 36 |
| 1.4 Роль кишкової мікробіоти в модуляції Т-лімфоцитів..... | 38 |
| 1.4.1 Індукція Treg..... | 39 |
| 1.4.2 Індукція Th1..... | 41 |
| 1.4.3 Індукція Th17..... | 41 |
| 1.4.4 Індукція T-FH | 42 |
| 1.5 Індукція Т-лімфоцитів мікробними метаболітами | 42 |
| 1.5.1 Коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA, КЛЖК) | 42 |
| 1.5.2 АТФ | 43 |
| 1.5.3 Мікробні полісахариди, вітаміни та жовчні кислоти..... | 43 |
| 1.6 Роль кишкової мікробіоти при COVID-19. Поняття про «вісь кишківник-легеня»..... | 45 |
| 1.7 Роль кишкової мікробіоти при цукровому діабеті 2-го типу | 47 |
| 1.8 Роль метформіну в модуляції кишкової мікробіоти..... | 49 |
| РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 52 |
| 2.1 Принципи розподілу учасників дослідження на групи..... | 52 |
| 2.2 Методологія визначення клініко-лабораторних та демографічних даних..... | 56 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3 | Методологія проведення систематичного огляду | 57 |
| 2.3.1 | Пошук релевантних джерел | 57 |
| 2.3.2 | Критерії прийнятності | 58 |
| 2.3.3 | Відбір досліджень | 58 |
| 2.3.4 | Процедура збору даних | 59 |
| 2.3.5 | Оцінка ризику упередженості | 59 |
| 2.3.6 | Узагальнена величина ефекту | 59 |
| 2.3.7 | Синтез результатів | 60 |
| 2.4 | Методологія оцінки кишкової мікробіоти культуральним методом . | 60 |
| 2.4.1 | Підготовка зразків та приготування серійних розведень | 60 |
| 2.4.2 | Висів на поживні середовища, інкубація, ідентифікація мікроорганізмів та підрахунок КУО | 61 |
| 2.5 | Методика визначення індексів альфа-різноманіття | 62 |
| 2.6 | Визначення співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes у зразках випорожнень молекулярно-генетичним методом | 63 |
| 2.6.1 | Зберігання та підготовка зразків. Виділення ДНК зі зразків випорожнень | 63 |
| 2.6.2 | Кількісне визначення таксонів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та розрахунок співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes | 65 |
| 2.7 | Зміни рівня експресії генів <i>PRKAA1</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>MTOR</i> у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу | 67 |
| 2.7.1 | Виділення тотальної РНК | 67 |
| 2.7.2 | Синтез кДНК | 69 |
| 2.7.3 | Визначення експресії таргетних генів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу | 69 |
| 2.8 | Методи статистичної обробки одержаних даних | 73 |
| 2.9 | Сплутуючі фактори (конфаундери) та упередженість у дослідженні | 74 |

| | |
|--|-----|
| РОЗДІЛ 3 КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ COVID-19 ТА ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ | 76 |
| 3.1 Гематологічні показники у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу у періоди домінування варіанту Оміврон (B.1.1.529) або Дельта (B.1.617.2)..... | 76 |
| 3.2 Вплив метформіну та інсуліну на гематологічні показники у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу | 82 |
| РОЗДІЛ 4 КИШКОВА МІКРОБІОТА ПРИ КОРОНАВІРУСНІЙ ХВОРОБІ 2019 ТА ЦУКРОВИМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ | 87 |
| 4.1 Систематичний огляд ролі метформіну у модуляції кишкової мікробіоти | 87 |
| 4.1.1 Відбір досліджень | 87 |
| 4.1.2 Методи аналізу складу кишкової мікробіоти | 87 |
| 4.1.3 Ризик упередженості | 87 |
| 4.1.4 Зміни кишкової мікробіоти на рівні бактеріальних родів та відділів, спричинені прийомом метформіну..... | 94 |
| 4.1.5 Вплив метформіну на різноманітність кишкової мікробіоти . | 96 |
| 4.2 Вплив прийому метформіну та антибіотикотерапії на зміни кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19 | 99 |
| 4.3 Вплив лікування метформіном та антибіотикотерапії на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти | 104 |
| 4.4 Співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes та його зв'язок з біомаркерами запалення у пацієнтів з COVID-19 | 109 |
| РОЗДІЛ 5 ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ PRKAA1, SLC2A1 ТА MTOR ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ COVID-19 ТА ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ | 119 |
| РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ | 124 |
| ВИСНОВКИ..... | 131 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 134 |
| ДОДАТОК А..... | 163 |
| ДОДАТОК Б..... | 166 |
| ДОДАТОК В..... | 167 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

- ACE2 – ангіотензин-перетворюючий фермент 2
- AMPK (АМПК) – АМФ-активована протеїнкіназа
- AUC – площа під ROC-кривою
- COVID-19 – коронавірусна хвороба 2019
- CRP – С-реактивний протеїн
- Ct – порогове число циклів ампліфікації
- ВЗМ – везикули зовнішньої мембрани
- ДК – дендритні клітини
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- eNHE – ендосомальні Na^+/H^+ транспортери
- IQR – міжквартильний розмах
- ЖК – жовчні кислоти
- FFAR2 – рецептор вільної жирної кислоти 2
- GALT – лімфоїдна тканина, пов'язана з кишківником
- Glut1 – глюкозний транспортер тип 1
- GPCR – G-білокспряжені рецептори
- HbA1c – глікований гемоглобін
- MAM – мікробна протизапальна молекула
- mTOR – мішень рапаміцину у ссавців
- MTOR – Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase (ген)
- NLR (НЛС) – нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення
- NF- κ B – ядерний фактор каппа В
- КУО/г – колонієутворюючі одиниці/грам
- кДНК – комплементарна ДНК
- КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти
- мРНК – матрична РНК
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

PPAR γ – рецептор, активований пероксисомним проліфератором

PRKAA1 – Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1(ген)

PSA – полісахарид А

ROC-крива – receiver operating characteristic (робоча характеристика приймача)

ROS – активні форми кисню

SAA –сироватковий амілоїд А

SARS-CoV-2 – Важкий Гострий Респіраторний Синдром Коронавірус 2

SLC2A1 – Solute carrier family 2 member 1(ген)

SD – стандартне відхилення (середнє квадратичне відхилення)

SFB – сегментовані нитчасті бактерії

Th1 – Т-хелпери 1 типу

Th17 – Т-хелпери 17 типу

T_{reg} – Т-регуляторні клітини

T_{FH} – фолікулярні Т-хелпери

TCR – Т-клітинний рецептор

TLR – Toll-подібний рецептор

TLR2 – Toll-подібний рецептор 2

SIgA – секреторний IgA

GPCR – G-білокспряжений рецептор

V-ATPase – вакуолярна АТФаза

GIP – глюкозозалежний інсулінотропний поліпептид

GLP-1 – глюкагоноподібний пептид-1

F/B співвідношення – Firmicutes/Bacteroidetes співвідношення

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ЦД-2 – цукровий діабет 2-го типу

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пандемія коронавірусної хвороби-2019 (COVID-19) стала одним із найбільш серйозних викликів 21-го століття. За період пандемії у світі захворіло понад 690 мільйонів людей, понад 6 мільйонів померли [1]. Перший випадок в Україні зафіксований 3 березня 2020 року в Чернівецькій області [2]. Загалом за період пандемії в Україні захворіло понад 4 мільйони людей, з них понад 100 тисяч померли. 5 травня 2023 року Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) скасувала статус пандемії COVID-19. Наразі COVID-19 є встановленою та постійною проблемою суспільної охорони здоров'я, яка більше не є надзвичайною ситуацією в галузі охорони здоров'я міжнародного значення.

Цукровий діабет 2-го типу є важливим фактором, котрий впливає на перебіг COVID-19 [3, 4]. Пацієнти з цукровим діабетом більш схильні до зараження COVID-19, мають підвищений ризик важкого перебігу COVID-19 та вищу смертність порівняно з особами без діабету [5]. Неконтрольована глікемія є основним фактором, який суттєво погіршує перебіг COVID-19, впливаючи на рівні маркерів запалення та окислювального стресу.

Цукровий діабет 2-го типу – це метаболічне захворювання, яке призводить до порушення багатьох метаболічних шляхів, впливаючи в тому числі й на імунометаболізм лімфоцитів. Т-лімфоцити експресують низку транспортерів глюкози, основним із яких є глюкозний транспортер тип 1 (Glut1) [9-11]. Прозапальні субпопуляції Т-хелперів – Th1 і Th17-клітини характеризуються високим рівнем експресії Glut 1 і схильністю до гліколізу, а протизапальні Т-регуляторні клітини (Treg) – навпаки, низьким рівнем експресії Glut1 і схильністю до окислювального метаболізму. Також, важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR, висока її активність здатна призводити до активації прозапальних субпопуляцій лімфоцитів, а низька сприяє диференціюванню в Treg. Як

відомо, одним із її інгібіторів є метформін, який діє через АМФ-активовану протеїнкіназу (АМПК). Ці зміни можуть безпосередньо впливати на перебіг COVID-19 у пацієнтів з ЦД-2, пояснюючи один із механізмів гіперзапалення у цієї групи коморбідних пацієнтів, а метформін, будучи активатором АМПК, може мати потенційні протизапальні ефекти, інгібуючи розвиток та прогресію цитокінового шторму. На сьогодні не повідомлено про жодне дослідження на людях, котре розкривало б особливості імунометаболізму лімфоцитів при COVID-19 та ЦД-2 залежно від гіпоглікемічної терапії, а також впливу імунометаболізму на запальні маркери у цієї групи коморбідних пацієнтів.

З іншого боку, одним із значущих факторів, котрий впливає, як на ЦД-2, так і на COVID-19, є стан кишкового мікробіому, який, як відомо, став своєрідним окремим органом. Перше дослідження кишкової мікробіоти ЦД2 було опубліковане в 2010 році, з того часу повідомлено багато праць, які вказують на те, що кишкова мікробіота бере активну участь у регуляції чутливості до глюкози та інсуліну [6]. Вплив кишкової мікробіоти не обмежений лише якоюсь певною системою організму. Наявні дані підтверджують вплив кишкової мікробіоти, в тому числі і на стан легеневої тканини, яка активно залучена при коронавірусному захворюванні [7]. Цей вплив є двостороннім і був названий «вісь кишківник-легеня» [8]. Встановлено також, що SARS-CoV-2 також впливає на стан кишкового мікробіому [9]. Цей подвійний вплив двох різних хвороб на сьогодні момент практично не досліджений і є важливою та актуальною сферою наукових досліджень. Багато є даних про мікробіото-модулюючі ефекти метформіну, які також можуть мати свій потенційний вплив на перебіг COVID-19 у пацієнтів із ЦД-2, що потребує більш детального дослідження, оскільки даних про подібні зміни кишкової мікробіоти у таких коморбідних пацієнтів практично немає.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дослідження проведено при підтримці індивідуального гранту наукового керівника здобувача – проф. О.М. Камишного № 2025-VSE «Virtual Scientist Engagement Fellowship Program for Vulnerable Ukrainian Scientists».

Мета дослідження: з'ясувати особливості кишкової мікробіоти, гематологічних показників та змін функціонального стану лімфоцитів у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу в періоди переважання варіантів Дельта або Омікрон залежно від типу гіпоглікемічної та антибактеріальної терапії.

Завдання дослідження:

1. З'ясувати особливості гематологічних показників пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу в періоди переважання варіантів Дельта або Омікрон залежно від типу гіпоглікемічної та антибактеріальної терапії.
2. Визначити особливості складу кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу залежно від прийому антибактеріальної терапії і/або метформіну та зв'язок чисельності конкретних представників кишкової мікробіоти з біомаркерами запалення.
3. З'ясувати особливості альфа-різноманіття кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу залежно від прийому антибактеріальної терапії і/або метформіну та зв'язок індексів альфа-різноманіття з біомаркерами запалення.
4. Провести систематичний огляд для визначення впливу метформіну на склад кишкової мікробіоти.
5. Дослідити особливості імунометаболізму лімфоцитів шляхом з'ясування рівня мРНК генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR* залежно від прийому антибактеріальної терапії або гіпоглікемічної терапії

(інсулінотерапія або терапія метформіном) та зв'язок рівнів експресії цих генів із біомаркерами запалення.

Об'єкт дослідження: особливості лабораторних показників, кишкової мікробіоти та імунометаболізму лімфоцитів у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу.

Предмет дослідження: взаємозв'язок між лабораторними показниками та кишковою мікробіотою у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу; вплив гіпоглікемічної та антибактеріальної терапії на біомаркери запалення, кишкову мікробіоту та імунометаболізм лімфоцитів у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу.

Методи дослідження: мікробіологічні (вивчення складу кишкової мікробіоти та розрахунок індексів альфа-різноманіття); мікроскопічні (дослідження тинкторіальних та морфологічних властивостей мікроорганізмів); біохімічні (визначення рівня сироваткової глюкози, прокальцитоніну, С-реактивного протеїну, креатиніну); гематологічні (підрахунок лейкоцитів та лейкоцитарної формули, розрахунок нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення); молекулярно-генетичні (визначення співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі; оцінка відносного рівня мРНК генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR* методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу); статистичні (описова статистика; кореляційний аналіз; логістична регресія); систематичний огляд (згідно з протоколом Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)).

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертації вперше встановлено особливості змін кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін або антибактеріальну терапію, виявлено зміни на рівні чисельності окремих родів, а також зміни індексів альфа-різноманітності.

Вперше встановлено кореляційні зв'язки між чисельністю окремих родів мікроорганізмів, а також індексів альфа-різноманіття з біомаркерами запалення зокрема такими, як СРП та НЛС.

Вперше показано, що наявність ЦД-2 у пацієнтів із COVID-19 не мала суттєвого впливу на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти, проте встановлено, що пацієнти з ЦД-2 та COVID-19, які приймали антибактеріальну терапію та метформін, мали достовірно значущі відмінності в індексах альфа-різноманітності порівняно з тими, хто не приймав антибактеріальної терапії.

Вперше виявлено, що F/V співвідношення було вищим у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2, а також виявлено кореляційні зв'язки між цим співвідношенням та рівнем СРП.

Вперше досліджено зміни транскрипційної активності генів *PRKAA1*, *SLC2A*, *MTOR* у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2. Виявлено, що антибактеріальна терапія не впливала на експресію цих генів. Інсулінотерапія у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 призводила до зниження експресії гена *PRKAA1* та підвищення експресії генів *SLC2A1* і *MTOR*. Прийом метформіну сприяв збільшенню експресії гена *PRKAA1*, але знижував рівні експресії генів *SLC2A1* та *MTOR*. Виявлено кореляційні зв'язки між рівнями експресії цих генів та запальними біомаркерами (НЛС, СРП та прокальцитонін), що може вказувати на можливий вплив цих генів на перебіг COVID-19 у пацієнтів з ЦД-2.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати свідчать про те, що виявлені зміни кишкової мікробіоти у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 можуть впливати на біомаркери запалення, а отже і на клінічний перебіг захворювання. Таким чином, корекція кишкової мікробіоти у цій групі коморбідних пацієнтів може стати однією з важливих опцій персоніфікованого підходу до лікування. Виявлені зміни імунометаболізму лімфоцитів при прийомі метформіну та їх зв'язок з біомаркерами запалення

доводить потенційні переваги метформіну та поглиблює існуючі уявлення, що відкриває нові горизонти для лікування цієї коморбідної патології.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджено в практику та навчальний процес кафедри біохімії та фармакології, кафедри факультетської терапії Ужгородського національного університету, а також у КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня» Закарпатської обласної ради, що засвідчують відповідні акти впровадження.

Особистий внесок здобувача. Аспірантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано наукову літературу за обраною тематикою. Відбір пацієнтів здійснювався на базі Комунального Некомерційного Підприємства «Обласна Клінічна Інфекційна Лікарня» Закарпатської Обласної Ради (КНП «ОКІЛ») ЗОР та серед пацієнтів з ЦД-2 без COVID-19, котрі знаходились на амбулаторному лікуванні, а також серед практично здорових осіб.

Дисертантом самостійно проведено мікробіологічне та молекулярно-генетичне дослідження кишкової мікробіоти на базі ПП «АСТРА-ДІА», а також спільно з аспірантом Бучинським М. В. на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України проведено молекулярно-генетичне дослідження крові для визначення рівнів експресії мРНК лімфоцитів досліджуваних пацієнтів. Дослідження гематологічних та біохімічних показників пацієнтів проведено на базі КНП «ОКІЛ» ЗОР.

Аспірантом написані всі розділи дисертаційного дослідження, проведено статистичний аналіз отриманих даних, сформульовано висновки, а також підготовлено до друку наукові праці, у яких висвітлені основні результати дослідження.

Вибір теми, визначення мети та завдання наукового дослідження, планування експериментів, аналіз отриманих даних, їх узагальнення та

формування висновків дисертації здійснено під керівництвом д.мед.н., проф. О. М. Камишного.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень оприлюднено на XX Міжнародній науково-практичній студентській конференції «Uzhhorod Medical Students Conference» (Ужгород, 2023); All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against Russian invaders (Kyiv, 2022); на XXVII конгресі студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (Тернопіль, 2023); на LXVI підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2023).

Публікації. Основні матеріали дисертації опубліковано в 13 наукових працях, серед них 9 статей, індексованих у наукометричній базі даних Scopus (7 статей у журналах, що належать до Q1 SCImago, 1 – у журналі, що належать до Q3 SCImago та 1 – у журналі, що належать до Q4 SCImago); 4 публікації у матеріалах конгресів та науково-практичних конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту і складається із таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, що містить 246 бібліографічних описів (7 – кирилицею і 239 латиницею), додатки. Робота проілюстрована 13 таблицями і 37 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 35 сторінці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Коронавірусна хвороба 2019 та цукровий діабет 2-го типу, коморбідність

Перші випадки пневмонії невідомого походження були виявлені в Ухані (провінція Хубей, КНР) на початку грудня 2019 року [10]. Атипова пневмонія була спричинена коронавірусом, який належить до родини Coronaviridae і отримав назву Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [11]. Ця хвороба швидко поширилася з Уханя на інші райони. Офіційний статус пандемії був оголошений Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) 11 березня 2020 року [12]. Згідно з даними ВООЗ, станом на 12 січня 2022 року у світі було зафіксовано понад 314 мільйонів підтверджених випадків COVID-19, в тому числі понад 5 мільйонів летальних випадків.

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД-2) вважається фактором ризику більш важкого COVID-19 [3, 13]. В умовах пандемії COVID-19 скринінг діабету для виявлення недіагностованих осіб набув вирішального значення [14]. У Китаї було проведено мета-аналіз пацієнтів з COVID-19, який показав, що поширеність цукрового діабету становить 9,7 %, що еквівалентно загальній захворюваності на цукровий діабет у Китаї [15]. Серед 23 804 учасників дослідження COVID-19 у Сполученому Королівстві одна третина була пацієнтами з ЦД-2, тоді як менше 2 % мали ЦД-1. Виявлено, що пацієнти з діабетом мають у 2,03–3,5 рази більший ризик смерті в лікарні порівняно з людьми без діабету [5]. Згідно з ретроспективним китайським дослідженням, пацієнти з діабетом, хворі на COVID-19, мали вищий ризик серцевих захворювань порівняно з людьми без діабету [16]. Згідно з когортним дослідженням у Сполученому Королівстві, пацієнти з ЦД-2 та COVID-19,

котрі мали рівень глікованого гемоглобіну (HbA1c) більше ніж 10 %, частіше помирали від COVID-19 порівняно з тими, у кого рівень HbA1c становив менше 6,5 % [5].

Згідно з іншим мета-аналізом, проведеним D. B. Shrestha et. al., котрий охопив 128 досліджень, було показано, що загальний рівень смертності від COVID-19 серед пацієнтів із ЦД-2 і гіперглікемією становив приблизно тричі більше – 26,62 %, порівняно з пацієнтами без діабету 9,26 % [17].

Було описано багато механізмів, які пояснюють гірший прогноз COVID-19 у пацієнтів, хворих на ЦД-2. Зокрема, ці механізми включають порушення дегрануляції нейтрофілів, надмірну активацію системи комплементу, підвищення концентрації глюкози в секреті дихальних шляхів, що значно збільшує реплікацію вірусу, надмірне виділення цитокінів, зниження кліренсу вірусу та більшу частоту присутності супутніх захворювань [18-20].

Інфекція SARS-CoV-2 на фоні ЦД-2 спричиняє послідовність каскадних ефектів, які підвищують ризик смертності. Наявність COVID-19 збільшує ризик гіперглікемії, сприяючи глікозилюванню ACE2 і посиленій проліферації вірусу [21]. Неконтрольована гіперглікемія спричиняє запалення, ендотеліальну дисфункцію та тромбоз через генерацію окисного стресу [22].

Важкий перебіг COVID-19 значною мірою пов'язаний з рівнем гіперглікемії у пацієнтів із ЦД-2 [23] (рис. 1.1). В умовах коморбідної патології контроль гіперглікемії має більшу прогностичну цінність, ніж глікований гемоглобін.

У подальших ретроспективних дослідженнях, що оцінювали лабораторні параметри пацієнтів із ЦД-2 та без діабету, інфікованих SARS-CoV-2, було виявлено підвищений рівень нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення (НЛС), прокальцитоніну, С-реактивного протеїну (СРП) та інтерлейкіну-6 [24-26]. Було показано, що підвищені рівні цих біомаркерів

запалення є незалежними факторами ризику важкого перебігу та смертності [26, 27].

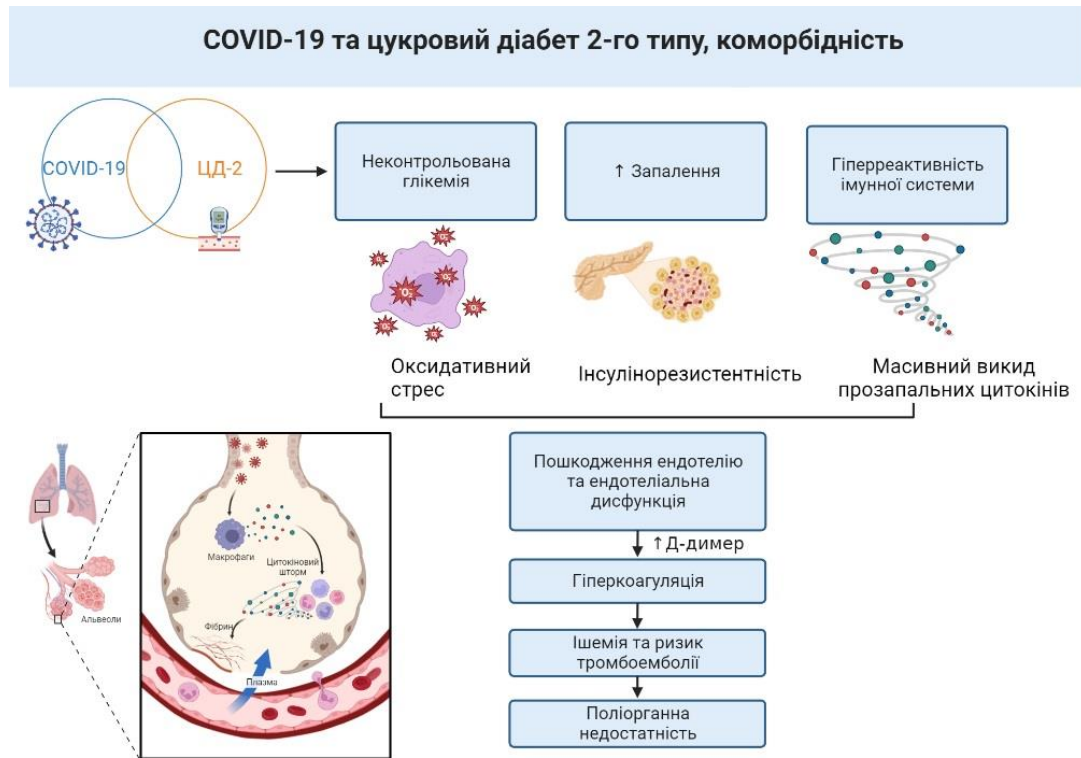


Рисунок 1.1 – Патогенетичні зв'язки ЦД-2 та COVID-19

1.2 Вплив метформіну та інсуліну на перебіг COVID-19 у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу – потенційні механізми

ЦД-2 значною мірою позитивно корелює з більш важким перебігом коронавірусної інфекції, включно з SARS-CoV-2 [28]. Пацієнти з ЦД-2, інфіковані SARS-CoV-2, мають підвищений ризик важких ускладнень, таких, як гостра дихальна та серцева недостатності, ніж пацієнти без діабету [29]. Попередні дослідження показали, що експресія глікозильованого білка ACE2 у легеневій тканині була вищою у мишей з діабетом, ніж у контрольної групи без діабету [30]. Таким чином, глікемічний контроль може зменшити зв'язувальну здатність SARS-CoV-2 шляхом

зниження експресії ACE2 у легенях, що призводить до більш легкого перебігу захворювання.

Крім того, інфекція SARS-CoV-2 може погіршити гіперглікемію, що в свою чергу може сприяти розвитку більш важкого пневмоніту [31]. У порівнянні з пацієнтами, у яких COVID-19 має добре контрольований рівень глюкози в крові, ті, у кого рівень глюкози в крові погано контролюється, мають вищий ризик тяжкості та смертності [32]. Очевидно, що контроль рівня глюкози в крові дуже важливий для прогнозу пацієнтів із COVID-19 [33].

Інсулінотерапія завжди була кращим методом у надзвичайних ситуаціях, особливо для пацієнтів із гострим респіраторним дистрес синдромом (ГРДС). Таким чином, інсулінотерапія була рекомендована багатьма експертами для пацієнтів із ЦД-2, інфікованих SARS-CoV-2 [28, 34]. Однак гіпоглікемія є дуже поширеним побічним ефектом інсуліну, особливо коли пацієнти перебувають у відділенні інтенсивної терапії [35]. Попереднє дослідження показало, що пацієнти у відділеннях інтенсивної терапії з ЦД-2, котрі коригували глікемію інсуліном, мали значно вищий ризик гіпоглікемії, ніж від інших гіпоглікемічних лікарських засобів [36]. Інше дослідження показало, що контроль глікемії за допомогою інсуліну збільшив смертність у когорті пацієнтів, котрі лікувались у відділеннях інтенсивної терапії [37]. Ще одне клінічне дослідження показало, що лікування інсуліном при надходженні пацієнтів із сепсисом було пов'язане з вищим рівнем смертності протягом 30 днів порівняно з пацієнтами, які отримували пероральні гіпоглікемічні лікарські засоби [38]. Також S. I. Brundage et al. встановили, що інсулін збільшує рівень прозапальних цитокінів, що виробляються активованими макрофагами *in vitro* під час ліпополісахарид-індукованого сепсису [39]. Що стосується COVID-19, дослідження Bo Yu et.al. встановило, що лікування інсуліном пацієнтів із COVID-19 і ЦД-2 було пов'язане зі значним підвищенням смертності – 27,2

% проти 3,5 %, котрі приймали інші гіпоглікемічні лікарські засоби [40]. Нещодавнє обсерваційне дослідження показало, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 потребують значно більшої дози інсуліну, ніж пацієнти лише з ЦД-2, що імовірно пов'язано з дисфункцією бета-клітин, спричиненої інфекцією SARS-CoV-2 [5].

Більшість пацієнтів із ЦД-2, які приймають пероральні гіпоглікемічні препарати, застосовують метформін окремо або в поєднанні з іншими препаратами [28]. Метформін є основним препаратом для лікування ЦД-2, котрий спочатку використовувався як протигрипозний засіб, і зниження рівня глюкози в крові було лише одним із його побічних ефектів [41]. Багато плейотропних ефектів метформіну та його широке використання в медицині сьогодні спонукали вчених назвати його аспірином XXI-го століття [42]. Поряд із антидіабетичними ефектами метформін має й інші корисні ефекти, включаючи подовження тривалості життя [43].

На додаток до контролю рівня глюкози, зниження ваги та зниження резистентності до інсуліну, метформін модулює імунну відповідь і зменшує запалення, сприяючи утворенню макрофагів M2 і T-регуляторних (Treg) і CD8 + T-клітин пам'яті [44]. Він також зменшує експресію генів, що кодують цитокіни та хемокіни, пов'язані із запальною відповіддю [45]. Метформін також впливає на склад мікробіоти і таким чином також проявляє протизапальні властивості [46]. Індукція аутофагії метформіном також сприяє елімінації патогенних мікроорганізмів і контролю запалення [47]. Метформін стимулює активність АМФ-активованої протеїнкінази (АМРК) і модифікує активність каталази та супероксиддисмутази [48]. Сироватка крові пацієнтів із COVID-19 має підвищений рівень позаклітинних пасток нейтрофілів, і хоча ці нейтрофільні пастки корисні для захисту господаря від патогенів, надмірне їх виробництво може спровокувати запальний каскад, пов'язаний із цитокіновим штормом і ГРДС [49]. Метформін зменшує кількість нейтрофілів та, відповідно, НЛС у пацієнтів з діабетом, зменшує

утворення нейтрофільних пасток у пацієнтів з діабетом та предіабетом незалежно від контролю рівня глікемії [50].

Інші вчені виявили потенційну роль АМРК у регуляції експресії АСЕ2. Автори продемонстрували, що метформін підвищує стабільність АСЕ2 шляхом фосфорилування Ser680 АСЕ2 в ендотеліальних клітинах пупкової вени людини та ембріональних клітинах нирок людини, що призводить до конформаційних та функціональних змін рецептора АСЕ2 [51]. Ці зміни можуть призвести до зменшення зв'язування між рецептором АСЕ2 та доменом зв'язування рецептора SARS-CoV-2 через стеричну перешкоду, спричинену додаванням фосфатних груп, що знижує інфекційність SARS-CoV-2 [52]. Активація АМРК під час лікування метформіном, яка пов'язана зі збільшенням стабільності АСЕ2, пригнічує запальну відповідь шляхом зменшення вивільнення прозапальних цитокінів через інгібування активації макрофагів і передачу сигналів NF- κ B [53].

Іншим потенційним механізмом противірусної дії метформіну є блокування вивільнення SARS-CoV-2 з ендосоми (рис. 1.2). Вакуолярна АТФаза (V-АТФаза) та ендосомальні Na^+/H^+ транспортери (eNHE) є важливими мембранними компартментами для регуляції рН в ендосомах. Кілька досліджень показали, що метформін може безпосередньо впливати на eNHE та/або V-АТФазу, спричиняючи пригнічення вірусної інфекції шляхом підвищення рН в ендосомах [54, 55]. Крім того, метформін може запобігати розвитку легеневого фіброзу, пов'язаного з COVID-19 [55]. Пригнічення комплексу I мітохондріального електронтранспортного ланцюга під час лікування метформіном призводить до зменшення утворення активних форм кисню [56]. Більше того, подібно до пригнічення сигналу mTORC1, пов'язаного з метформіном, пригнічення електронтранспортного ланцюга також призводить до пригнічення взаємодії білків хазяїна та вірусу, що сприяє зменшенню реплікації та дозрівання вірусу [55].

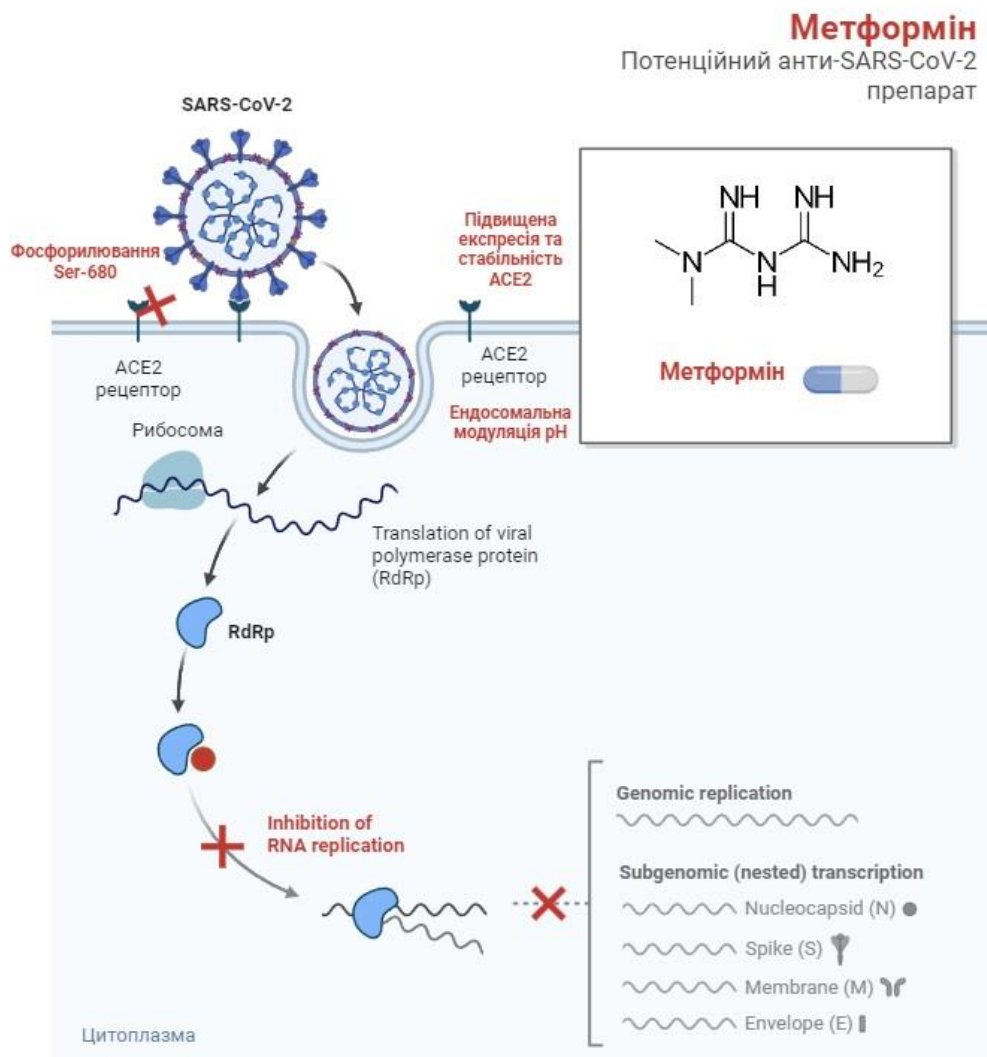


Рисунок 1.2 – Противірусні ефекти метформіну

У дослідженні, проведеному Haripriya Parthasarathy et al. було продемонстровано значний інгібуючий вплив метформіну на реплікацію SARS-CoV-2 *in vitro* [57]. При активації AMPK в клітинних лініях Calu3 і Caco2 за допомогою метформіну спостерігалось значне пригнічення реплікації SARS-CoV-2.

Крім того, багатообіцяючі результати були отримані у клінічних дослідженнях Carolyn et.al. [58]. Середня зміна вірусного навантаження була значно нижчою при застосуванні метформіну порівняно з групою плацебо (-0,64 \log_{10} копій/мл), що свідчить про зниження вірусного

навантаження в 4,4 рази. На 5-й день рівень невизначуваного вірусного навантаження SARS-CoV-2 становив 49,9 % у групі метформіну та 54,6 % у групі плацебо зі співвідношенням шансів 1,235. Аналогічно, на 10-й день невизначуваний показник становив 14,3 % у групі метформіну та 22,6 % у групі плацебо із співвідношенням шансів 1,663, що свідчить про статистично значущу різницю між групами.

C. Ventura-López et al. провели дослідження, в якому лікування метформіном продемонструвало суттєві переваги порівняно з групою плацебо [59]. В учасників, які отримували метформін, спостерігалось значне зниження потреби в додатковому кисні, більш виражене зниження вірусного навантаження. Однак не було виявлено суттєвих відмінностей у тривалості госпіталізації між групами метформіну та плацебо.

У рандомізованому клінічному дослідженні TOGETHER застосування метформіну не призвело до значного зменшення рівня госпіталізації пацієнтів з COVID-19 [60]. Статистичний аналіз показав, що не було суттєвої різниці між групами метформіну та плацебо з відносним ризиком 1,14 та 95 % довірчим інтервалом 0,73-1,81. Крім того, метформін суттєво не впливав на вірусний навантаження на 7-й день. Однак спостерігалось зниження ймовірності звернень до відділення невідкладної допомоги та госпіталізації пацієнтів з COVID-19, що призвело до абсолютного зниження ризику на 1,4 % та 3,1 % відповідно.

1.3 Імунометаболізм Т-лімфоцитів при цукровому діабеті 2 типу, роль метформіну та інсуліну

Лімфоцити є чутливими до змін у метаболізмі. Основні сенсори імунометаболізму, які можна виділити, включають кіназу mTOR (вона реагує на сигнали, що походять від амінокислот, ростових факторів та інших молекул, і виступає як центральний регулятор проліферації та виживання

лімфоцитів) [61]. Ще одним важливим сенсором є протеїнкіназа АМПК, яка є сенсором глюкози та регулює енергетичний баланс клітин [62]. Рецептори, активовані пероксисомними проліфераторами PPAR- γ та їх природні ліганди – вільні жирні кислоти і ейкозаноїди, – також беруть важливу роль. Патерн-розпізнаючі рецептори вродженого імунітету (TLR, NLR, RLR та ін.) також є сенсорами, вони активуються не лише мікробними лігандами, але й різними ендогенними патернами пошкодження, зокрема HSP70 і HMGB1. Пуринергічні рецептори P2XR сприймають позаклітинну АТФ як сигнал. І, нарешті, рецептори коротколанцюгових жирних кислот (FFAR2) активуються мікробними метаболітами, такими як бутират, ацетат і пропіонат [63].

Метаболічні зміни, які виникають при цукровому діабеті, зокрема гіперглікемія, можуть прямо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [64]. Т-клітини експресують різні глюкозові транспортери, серед них Glut 1 є основним [65, 66]. Продіабетогенні Th1 і Th17-клітини, які спричиняють запалення підшлункової залози, характеризуються високим рівнем експресії Glut 1 і спрямовані на гліколіз [66, 67]. З іншого боку, супресорні Treg-клітини мають низький рівень Glut 1 і високу активність окислювального метаболізму [65, 68]. Важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR, яка є частиною внутрішньоклітинних сигнальних комплексів mTORC1 і mTORC2 [69]. mTOR відіграє роль "провідника" внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних сигналів і є одним із центральних регуляторів проліферації, метаболізму та росту лімфоцитів та інших клітин [70, 71]. Метформін, який діє через АМПК, є одним із інгібіторів mTOR. Висока активність mTOR може сприяти прогресії діабету через активацію прозапальних субпопуляцій лімфоцитів, тоді як низька активність сприяє дозріванню протизапальних Treg-клітин [72, 73] (рис. 1.3).

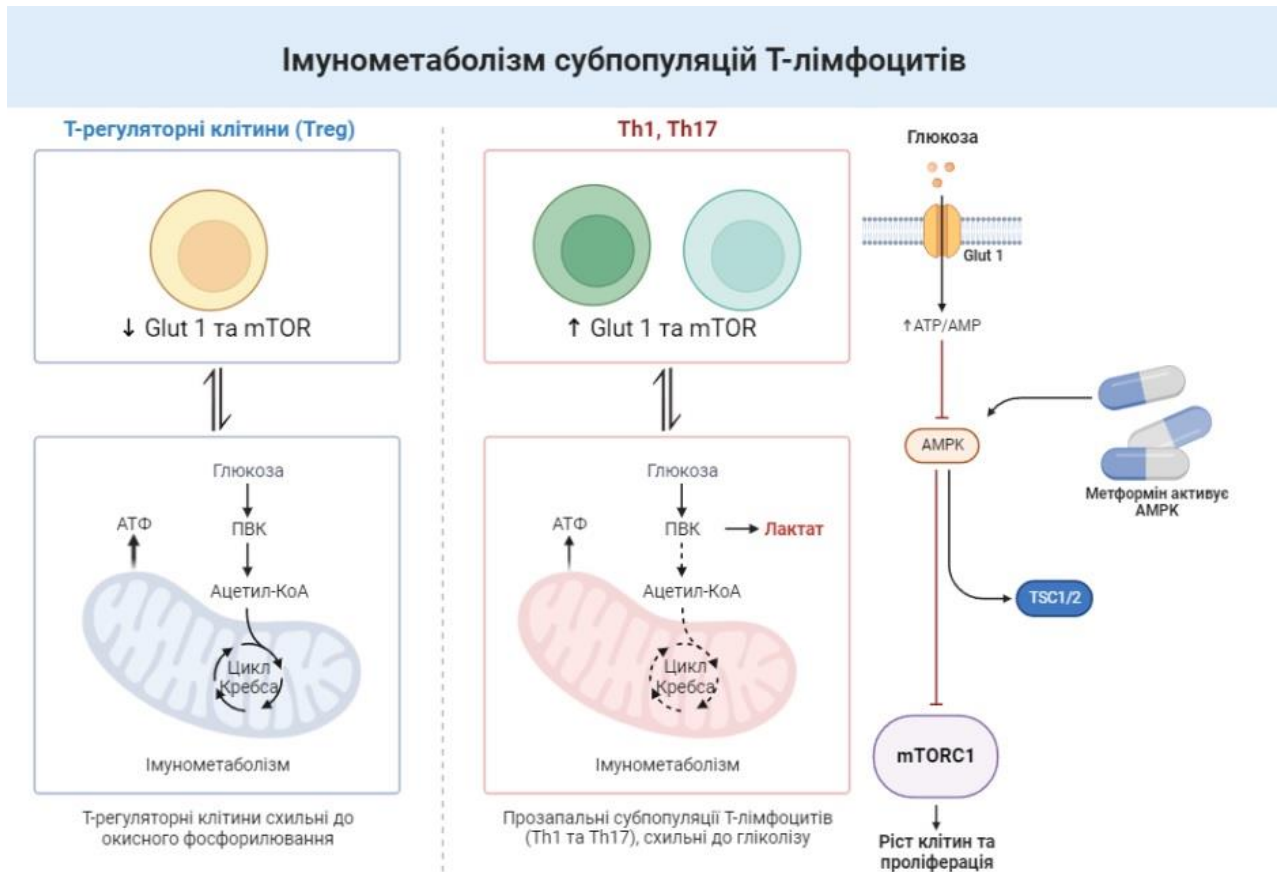


Рисунок 1.3 – Імунометаболізм Т-лімфоцитів, роль метформіну

1.4 Роль кишкової мікробіоти в модуляції Т-лімфоцитів

Кишечник людини представлений надзвичайно різноманітною та складною мікробною екосистемою, котра налічує понад 10^{14} резидентів, взаємодіє з хазяїном та активно бере участь у реалізації величезного спектру фізіологічних процесів, включаючи метаболізм та енергетичний гомеостаз, синтез важливих метаболітів та вітамінів, регуляцію імунної відповіді, метаболізм токсинів, ксенобіотиків, канцерогенів, а також інших токсичних сполук [74-77]. Серед величезної кількості коменсальних бактерій, що населяють ШКТ, особливу роль відіграють окремі види ключових імунорегуляторних бактерій, які керують диференціюванням різних субпопуляцій Т-лімфоцитів, а Т-клітинні рецептори (TCR) цих імунних клітин, у свою чергу, є комменсал-специфічними [78]. Одна з основних функцій кишкової мікробіоти – це її здатність модулювати Т-лімфоцити в

GALT (лімфоїдній тканині пов'язаній з кишківником), ця модуляція здійснюється двома шляхами: індукція Т-лімфоцитів окремим мікроорганізмами чи їх консорціумами та індукція спеціальними мікробними метаболітами. Розглянемо ці два механізми більш детально (рисунок 1.4).

1.4.1 Індукція Treg

Т-регуляторні клітини (Treg) мають важливе значення для підтримки імунного гомеостазу шляхом пригнічення надмірної імунної відповіді. Встановлено дві основні групи Treg: природні nTreg та периферично індуквані pTreg. Встановлено декілька консорціумів видів *Clostridia*, які як вважається є потужними індукторами кишкових Treg [79, 80]. Колонізація зміненою флорою Шедлера (ASF), котра налічує 8 бактеріальних видів, індукувала Treg [81].

Clostridium spp. (кластери IV та XIVa) спільно індукували секрецію трансформуючого фактор росту бета (TGF-beta) клітинами епітелію кишечника, що спричиняло диференціацію та розмноження pTreg у товстому кишечнику [80]. Відносно нещодавно кишкова індукція pTreg також була описана після колонізації дещо складнішою мікробіотою мишей (sDMDMm2/Oligo-MM12) [78].

Серед 19 кластерів (від I до XIX) класу *Clostridia*, що мешкають у кишечнику, найбільший Treg-індукувальний потенціал мають представники кластерів IV і XIVa (також відомі як групи *Clostridium leptum* і *Clostridium coccoides* відповідно). *Clostridium* кластер XIVa включає види, що відносяться до родів *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Roseburia* і *Butyrivibrio*. *Clostridium* кластер IV складається з родів *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* та *Anaerofilum* [82].

Зокрема, Treg-індукуюча активність у мишей була виявлена в консорціумі з 46 штамів роду *Clostridium*, що належать до кластерів IV та

XIVa [83]. Була також ідентифікована комбінація з 17 людських штамів Clostridia, що має активність Treg-індукування [84].

Одним із представників *Clostridium* кластеру IV є вид *Faecalibacterium prausnitzii*, що впливає на баланс Th17/Treg у GALT [85]. *F. prausnitzii* – один з основних продуцентів бутирату, в кишечнику здатний зменшувати запалення за рахунок стимуляції продукції великої кількості IL-10 та блокади активації ядерного фактора NF-κB, що призводить до пригнічення вироблення прозапальних цитокінів (IL-1β, IL-8, IL-12, IFN-γ, TNF-α) та підвищення активності Foxp3+ Treg в GALT [86]. У 2016 році у супернатантах культур *F. prausnitzii* ідентифікували білок, названий мікробною протизапальною молекулою (MAM) [87]. Було показано, що принаймні сім пептидів білка MAM *F. prausnitzii* індукують продукцію IL-10 in vitro та блокують розвиток DSS-індукованого коліту у мишей [88].

Індукторами диференціювання Treg у кишечнику є також представники філуму *Bacteroidetes*: *Bacteroides fragilis* та *Bacteroides thetaiotaomicron* [89]. Важливими метаболітами *B. fragilis* є коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), що виконують роль сполучної ланки між мікрофлорою та імунною системою, які активують клітини GALT через рецептор FFAR2 [90]. Окремі бактеріальні види, які можуть індукувати RORγ+ Treg є *Clostridium ramosum* and *Bacteroides thetaiotaomicron*, які досліджували Sefik et al. [90, 91].

Також встановлено, що *Akkermansia muciniphila* індукує диференціацію Treg [92]. Імунорегуляторний потенціал *Akkermansia muciniphila* – муцин-деградуюча бактерія з філуму *Verrucomicrobia* – вивчений ще недостатньо. Plovier et al. показали, що введення *A. muciniphila* або її зовнішнього мембранного білка Amuc_1100 активує толл-подібні рецептори 2 типу (TLR2) сигналізація через, які збільшувала експресію генів, що кодують білки щільних контактів claudin 3 та occludin [90, 93].

1.4.2 Індукція Th1

Хоча було виявлено безліч окремих видів бактерій, здатних індукувати клітини Treg або Th17 у кишечнику, описано дуже мало коменсальних видів, які стимулюють незапальну гомеостатичну реакцію Th1. Перше дослідження для виявлення індукторів Th1 показало, що види *Klebsiella*, які зазвичай колонізують ротову порожнину, можуть ектопічно колонізувати кишечник в умовах дисбактеріозу, де вони індукують сильну реакцію Th1 [94]. Ця відповідь була прозапальною і виявилася залежною від CD11b–CD103+ [95].

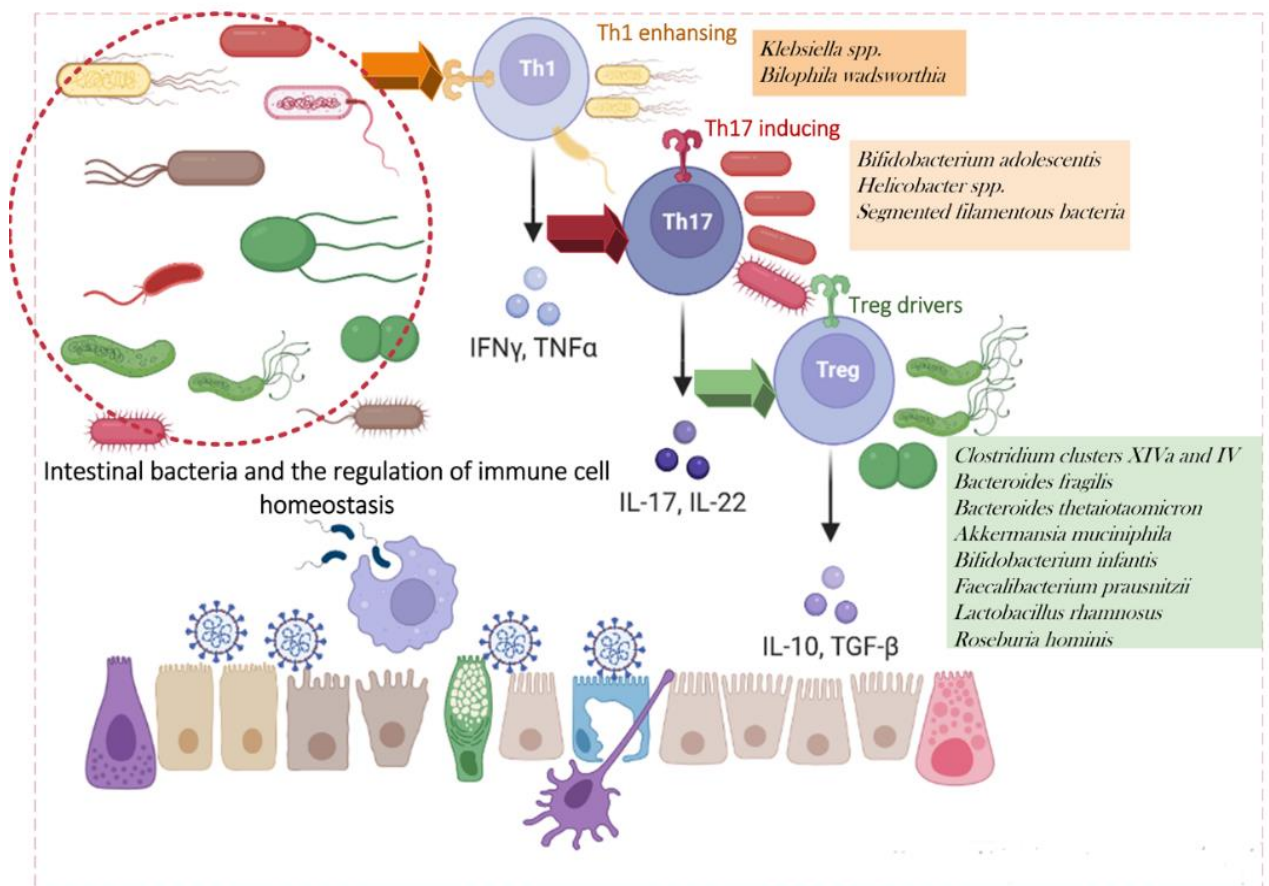


Рисунок 1.4 – Індукція субпопуляцій Т-лімфоцитів мікроорганізмами

1.4.3 Індукція Th17

Одними з головних індукторів Т-хелперів 17 (Th17) є сегментовані нитчасті бактерії (SFB). Отримані дані свідчать про те, що миші, які не мали сегментованих нитчастих бактерій, демонстрували знижений рівень Т-

хелперів 17 типу в порівнянні з генетично ідентичними мишами, які були колонізовані мікробіотою, яка містила ці бактерії [96]. Th17 експресують на своїй поверхні TCR, специфічний до антигенів SFB. Епітеліальна адгезія SFB стимулює вироблення сироваткового амілоїду А (SAA) та активних форм кисню (ROS), що відіграє важливу роль у диференціації Th17 [94]. Отже, епітеліальна адгезія SFB індукує активацію у власній пластинці SFB-специфічних клітин Th17.

1.4.4 Індукція T-FH

У Пейєрових бляшках фолікулярні T-хелпери (T_{FH}) підтримують дозрівання В-клітин у зародкових центрах та диференціювання В-клітин до плазматичних клітин, що секретують IgA [97].

Позаклітинний АТФ, продукований мікробами, регулює T_{FH}, котрі, у свою чергу, регулюють рівень секреторного IgA (SIgA) [98]. Встановлено, що *A. muciniphila* індукує антиген-специфічні T_{FH} для стимулювання антиген-специфічної T-залежної продукції IgA та IgG1 [99].

1.5 Індукція T-лімфоцитів мікробними метаболітами

1.5.1 Коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA, КЛЖК)

Ацетат, бутират та пропіонат КЛЖК утворюються шляхом мікробного бродіння харчових волокон. Кілька груп бактерій здатні продукувати ацетат, серед них види *Clostridia*, що належать до кластерів IV і XIVa, є важливим джерелом бутирату в кишечнику [100]. Пропіонат виробляється видами типу *Bacteroides* і *Firmicutes* [99, 100]. Зокрема, було показано, що ацетат і бутират сприяють індукції та функції кишкового Treg за допомогою кількох механізмів: посилення експресії Foxp3 в CD4 T-клітинах шляхом посиленого гістонового ацетилювання локусу Foxp3 [101]. Ефекти КЛЖК опосередковуються зв'язуванням із рецепторами вільних жирних кислот,

такими як рецептори, пов'язані з G-білком (GPCR), експресовані на CD4 T-клітинах (GPR43, також відомі як FFAR2) і дендритних клітинах (GPR109A) [102]. На відміну від КЛЖК, довголанцюгові жирні кислоти підсилюють диференціацію та проліферацію клітин Th1 і Th17 [103].

1.5.2 АТФ

Люмінальний аденозин-5'-трифосфат (АТФ) може бути отриманий як від господаря, так і від мікробіоти, у літературі було показано, що він сприяє диференціації клітин Th17 кишечника [90]. Також було продемонстровано, що АТФ, що виділяється бактеріями, обмежує кількість T_{H17} у Пееєрових бляшках через АТФ-керований іонотропний рецептор P2X7, що призводить до зниження продукування SIgA в тонкому кишечнику [104].

1.5.3 Мікробні полісахариди, вітаміни та жовчні кислоти

Полісахарид А (PSA, ПСА), що виробляється *B. fragilis*, є хорошим прикладом бактеріальної сполуки з імуномодулюючою дією [105]. Повідомлялося, що PSA превентує виникнення в мишей коліту [106]. Цей захисний ефект був опосередкований продукцією IL-10 кишковим Treg за TLR2-залежним механізмом, а також через непрямий вплив на звичайні ДК або плазмоцитоїдні ДК [107-109].

Крім того, було показано, що *B. fragilis* вивільняє PSA через пухирці (везикули) зовнішньої мембрани (ВЗМ), які доставляються до ДК; ці ВЗМ-праймовані ДК індукують кишковий Treg і тим самим захищають тварин від експериментального коліту [108, 110].

Жовчні кислоти (ЖК) – це невеликі молекули, які синтезуються з холестерину в печінці і далі метаболізуються кишковою мікробіотою, включаючи декон'югацію гліцину або таурину та біотрансформацію некон'югованих первинних жовчних кислот у вторинні жовчні кислоти [111].

ЖК функціонують як сигнальні молекули з плейотропними метаболічними та імунними ефектами через динамічну взаємодію з рецепторами хазяїна, мікробіотою та імунною системою хазяїна.

Наприклад, у мишей, яких годували дієтою з високим вмістом жирів, спостерігався змінений склад кон'югованих ЖК, що призводило до збільшення кількості *Bilophila wadsworthia*. Ці зміни були пов'язані з посиленням Th1-відповіді та розвитком коліту у генетично схильних до дефіциту IL-10 тварин [112].

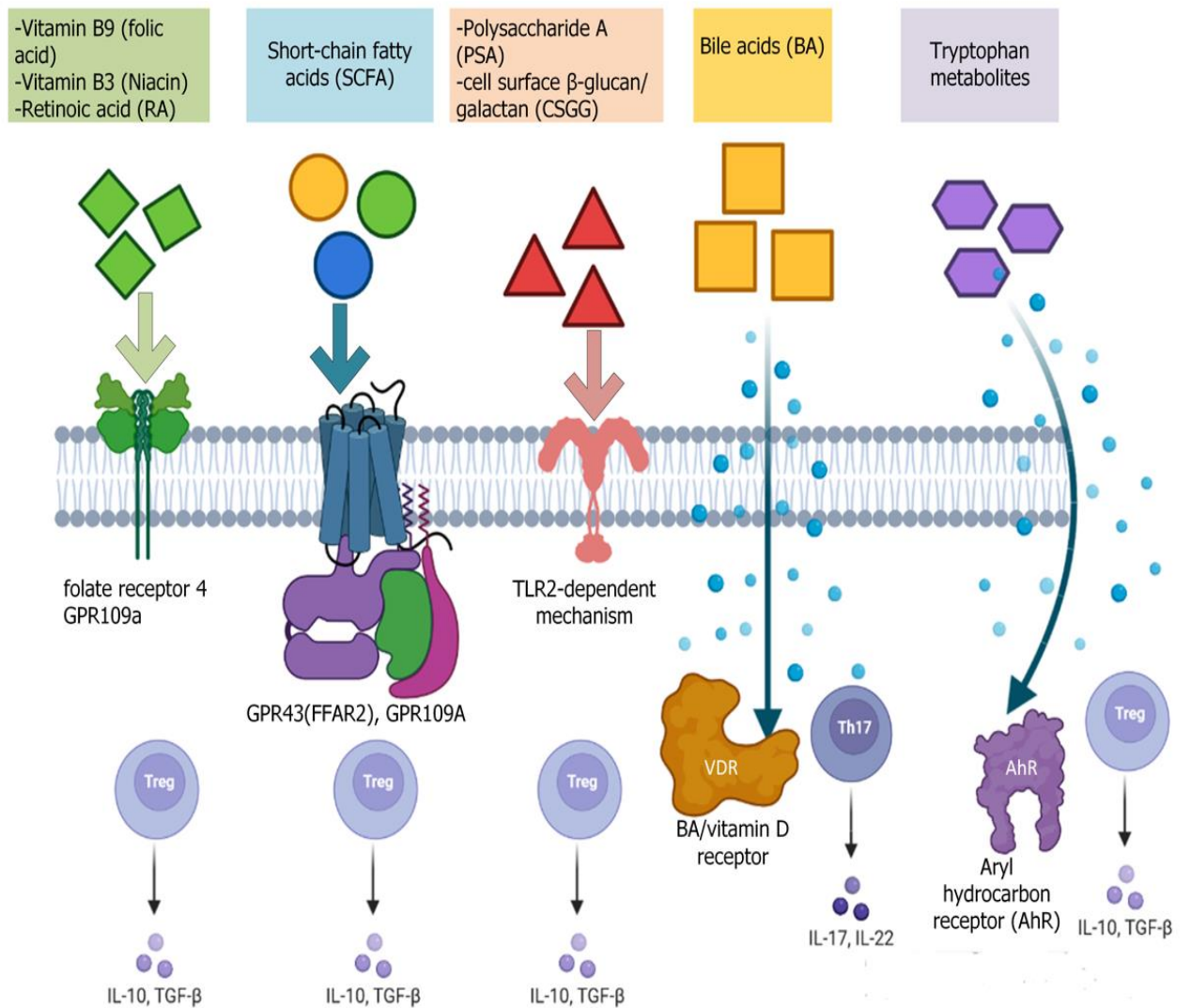


Рисунок 1.5 – Індукція субпопуляцій Т-лімфоцитів мікробними метаболітами

Ретиноева кислота сприяє індукції Treg і пригнічує розвиток Th17-клітин, фолієва кислота забезпечує підтримку Treg клітин, які експресують фолатний рецептор 4 [112-114] (рис. 1.5).

1.6 Роль кишкової мікробіоти при COVID-19. Поняття про «вісь кишківник-легеня»

К. Xu et al дослідили, що у пацієнтів на фоні COVID-19 спостерігається зменшення таких родів, як *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* [115]. В іншому дослідженні Zuo et al. вивчали мікробіоту кишечника у 15 пацієнтів із SARS-CoV-2 інфекцією, взявши зразки фекалій 2-3 рази під час перебування в лікарні [116]. Вони виявили зменшення коменсальних бактерій (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium ventriosum*, *Roseburia* і *Lachnospiraceae*) та підвищену кількість умовно-патогенних мікроорганізмів (*Actinomyces viscosus*, *Clostridium hathewayi* та *Bacteroides nordii*). Також встановлено зв'язок таких мікроорганізмів, як *Clostridium ramosum*, *Coprobacillus* та *Clostridium hathewayi* зі ступенем важкості захворювання [7]. Цими ж авторами було встановлено, що у пацієнтів із COVID-19 було значно зменшене мікробне різноманіття, більша кількість умовно-патогенних бактерій (*Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella* та *Actinomyces*) та зниження кількості корисних симбіонтів. Yeoh et al. проводили аналіз кишкової мікробіоти методом секвенування у 100 госпіталізованих пацієнтів з COVID-19 (34 приймали антибіотики, 73 отримували противірусні засоби), встановивши, що дисбактеріоз кишечника пов'язаний із тяжкістю захворювання у пацієнтів, котрі отримували антибіотики [117]. У пацієнтів із COVID-19 спостерігалось порівняно зі здоровими людьми значне зниження кількості *Actinobacterium*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, причому знайдено корелятивний зв'язок між кількістю цих бактерій та важкістю перебігу COVID-19 [117].

L. Lv et al. вивчали зв'язки між зміною мікробіому кишечника та клінічними ознаками COVID-19 у 67 госпіталізованих пацієнтів з COVID-19, отримавши дані про значне зниження кількості *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chromista* та *Mucoromycota* порівняно зі здоровими людьми. *Mucoromycota* позитивно корелює з умовно-патогенними мікроорганізмами *Peptostreptococcaceae*, *Fusicatenibacter*, *Intestinibacter*, *Aspergillus* та *Agathobacter*. *Aspergillus* позитивно корелював із частотою діареї. *Penicillium citrinum* негативно корелював із концентрацією СРП. *Rhodotorula mucilaginosa* негативно корелювала з концентрацією ангіотензин-перетворюючого ферменту [7].

Також, варто звернути уваги на дослідження L. Tang et al., які досліджували мікробіоту кишечника 57 пацієнтів із COVID-19 залежно від ступеня важкості. У пацієнтів з легким перебігом COVID-19 спостерігалася негативна кореляція СРБ з *S. butyricum*. У важкій групі *F. prausnitzii* та *S. leptum* позитивно корелювали з концентрацією нейтрофілів, *E. rectale* позитивно корелював із концентрацією ІЛ-6. У пацієнтів з критичним перебігом COVID-19 *S. butyricum* негативно корелював із концентрацією СРБ. *Bifidobacterium* spp. негативно корелювали з протромбінним часом і ЛДГ [9].

Встановлено, що мікробіота кишечника впливає на стан легень через перехресну взаємодію, яку називають «вісь кишківник-легеня» [8]. Вісь кишківник-легеня: двонаправлена це означає, що мікробні метаболіти та ендотоксини можуть впливати на запалення в легенях також з іншого боку - запалення в легеневій тканині може впливати на мікробіоту кишечника, що певною мірою збігається з дослідженнями, які вивчають дисбіоз кишківника при COVID-19 [118] (рисунок 1.6).

Імунний гомеостаз кишечника регулюється тонким балансом прозапальних реакцій, які забезпечуються Th17, та протизапальних, які

підтримуються Treg, що разом в кінцевому підсумку індукуються та регулюються мікробіотою кишечника [105].

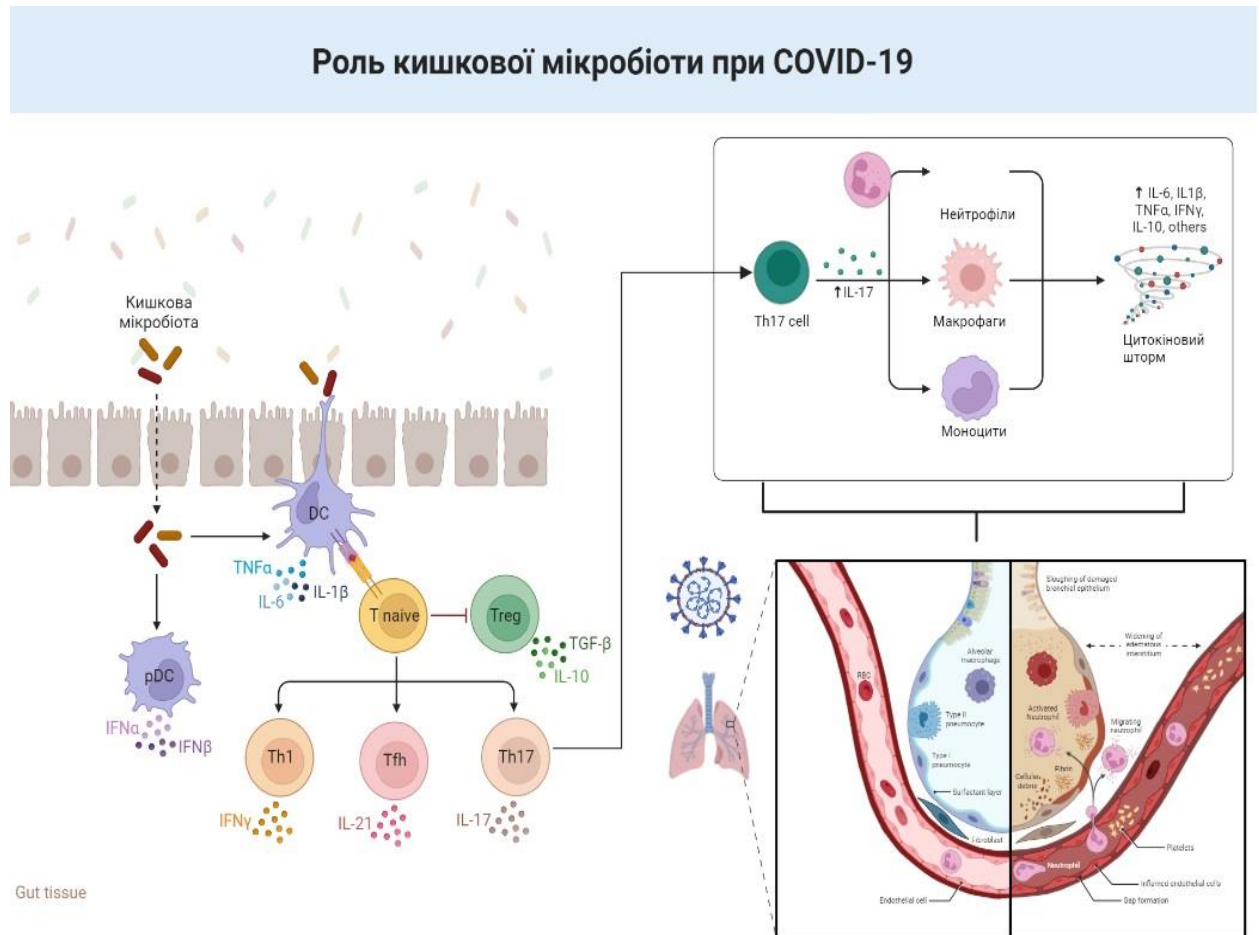


Рисунок 1.6 – Роль кишкової мікробіоти в перебігу COVID-19, «вісь кишківник-легеня»

1.7 Роль кишкової мікробіоти при цукровому діабеті 2-го типу

Мікробіота кишківника пов'язана з патогенезом багатьох хронічних хвороб, не є виключення і цукровий діабет 2 типу [6]. Найпоширенішими мікроорганізмами, які мають потенційну протидіабетичну дію, є *Bacteroides* і *Bifidobacterium* spp. *Bifidobacterium* spp. розглядається в більшості дослідженнях як протидіабетичний мікроорганізм [119, 120]. Такі види, як *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*

показали покращення толерантності до глюкози в моделях на тваринах [121, 122]. У дослідженнях на тваринах *Bacteroides acidifaciens* та *Bacteroides uniformis* покращили контроль глікемії та інсулінорезистентність у мишей з діабетом [123-126].

Akkermansia muciniphila є ще одним протективним для розвитку ЦД мікроорганізмом. Встановлено негативний кореляційний зв'язок між збільшеною кількістю цієї бактерії та перебігом ЦД 2 типу [127, 128].

Дослідження Eckburg et.al. показали, що кишкова мікробіота здорових людей характеризувалася збільшенням чисельності бактерій, котрі є продуцентами бутирату, а саме *Eubacterium rectale*, *Clostridium* spp., та *F. prausnitzii*, тоді як у осіб із ЦД-2 відмічали збільшення *Bacteroides*, *E. coli* та *Desulfovibrio* [129].

Kim-Anne Lê et.al. встановили зменшення чисельності *Bifidobacterium* spp. у поєднанні зі збільшеною кількістю ентерококів у кишківнику пацієнтів з ЦД-2, у порівнянні зі здоровими людьми [130].

КЛЖК мають здатність інгібувати ріст умовно-патогенних бактерій, підтримувати водно-електролітний баланс, покращувати моторику кишечника, а також підкислювати середовище в товстій кишці. Останні дослідження підтвердили, що КЛЖК можуть інгібувати вироблення протизапальних цитокінів, що сприяє зменшенню запалення слизової оболонки в товстій кишці [131]. Дисбаланс кишкової мікробіоти призводить до зниження продукції КЛЖК, що пов'язано з порушення балансу між про- та протизапальною імунною відповіддю. Зниження рівня КЛЖК – бутирату призводить до зниження стимульованої секреції підшлункової залози, а також пов'язано з розвитком інсулінорезистентності [132]. Показано, що високий рівень КЛЖК – ацетату, впливає на викид з бета-клітини панкреатичних острівців більшої кількості інсуліну [133].

1.8 Роль метформіну в модуляції кишкової мікробіоти

Глюкозомодулюючий вплив метформіну на мікробіом кишечника оцінювали в різних клінічних дослідженнях. Перше клінічне дослідження, в якому вивчався взаємозв'язок між метформіном і кишковою мікробіотою, було проведене як відкрите одноступеневе дослідження у пацієнтів з ЦД-2 [55]. У цьому дослідженні було продемонстровано зміни у складі кишкової мікробіоти та концентрації ЖК у калі [134].

По-перше, на рівні відділів зміни чисельності Firmicutes і Bacteroidetes були помітними при порівнянні груп без лікування та з лікуванням метформіном. Чисельність Firmicutes збільшувалася, тоді як чисельність Bacteroidetes зменшувалася після лікування метформіном. Цей результат узгоджується з попереднім висновком про те, що співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes вважається предиктором метаболічних захворювань, таких як ЦД-2 або ожиріння, у кількох дослідженнях на людях [135-137]. Співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes було знижене у пацієнтів з ЦД-2, і це явище було кориговане використанням метформіну у кількох клінічних дослідженнях [134, 138]. На відміну від цих результатів, деякі дослідження не виявили змін у співвідношенні між Firmicutes та Bacteroidetes [139]. На рівні роду варто відзначити, що рід *Escherichia* показав значне збільшення кількості під час лікування метформіном. Збільшення чисельності *Escherichia/Shigella* при лікуванні метформіном також спостерігали в інших клінічних дослідженнях, включно зі здоровими добровольцями [127, 138-141]. Forslund et al. припустили, що введення метформіну створює конкурентне середовище для *Escherichia coli*, що призводить до змін у мікробіомі кишківника [142]. Н. Wu et al. також продемонстрували зміну чисельності *Escherichia coli* як непрямий ефект лікування метформіном у дослідженнях in vitro [138]. Forslund et al. припустили, що побічні ефекти з боку ШКТ, імовірно, викликані *Escherichia* spp., зумовлені збільшенням

синтезу ліпополісахаридів або потенціалом сульфатного метаболізму, що, як відомо, сприяє здуттю кишечника [142].

A. muciniphila, яка позитивно корелює з прийомом метформіну, показала менш чіткий зв'язок у дослідженнях на людях. Хоча Wu et al. продемонстрували збільшення кількості *A. muciniphila* в дослідженнях *in vitro*, зв'язок між чисельністю *A. muciniphila* та рівнем глікованого гемоглобіну не було виявлено [138]. Крім того, деякі клінічні дослідження на здорових добровольцях не виявили змін у кількості *A. muciniphila* при лікуванні метформіном [139, 141]. Причини цих відмінностей можуть бути пов'язані з індивідуальними факторами, такими як прийом клітковини, особливості імунної відповіді, вік [128, 143-146]. Таким чином, може бути важко зробити висновок про роль *A. muciniphila* в організмі людини як одного з основних факторів протидіабетичного ефекту метформіну, хоча в дослідженнях на людях, які отримували лікування *A. muciniphila*, спостерігалось покращення метаболічних параметрів, таких як рівень глікемії.

З точки зору біохімічних змін при лікуванні метформіном спостерігалися деякі відмінності в концентраціях ЖК і КЛЖК у калі. Встановлено, що метформін збільшує виведення ЖК з калом [147, 148]. Крім того, велика кількість Firmicutes і Bacteroidetes корелювала з концентрацією ЖК і GIP, що свідчить про те, що метформін опосередковано регулює секрецію кишкових гормонів через метаболізм жовчних кислот. У дослідженнях на людях спостерігалось підвищення концентрації КЛЖК у фекаліях або збільшення кількості бактерій, що продукують КЛЖК [138, 149, 150]. Зокрема, Н. Wu et al. лише продемонстрували, що концентрація КЛЖК у зразках фекалій, що призводить до утворення бутирату та пропіонату, суттєво підвищується при лікуванні метформіном [138, 151]. Цей результат узгоджується з дослідженнями на тваринах, які показали, що метформін збільшує кількість бактерій, що продукують КЛЖК [152-155]. Таким чином,

ці клінічні результати підтверджують гіпотезу про те, що метформін справляє сприятливий вплив через ЖК та КЛЖК (рис. 1.7).

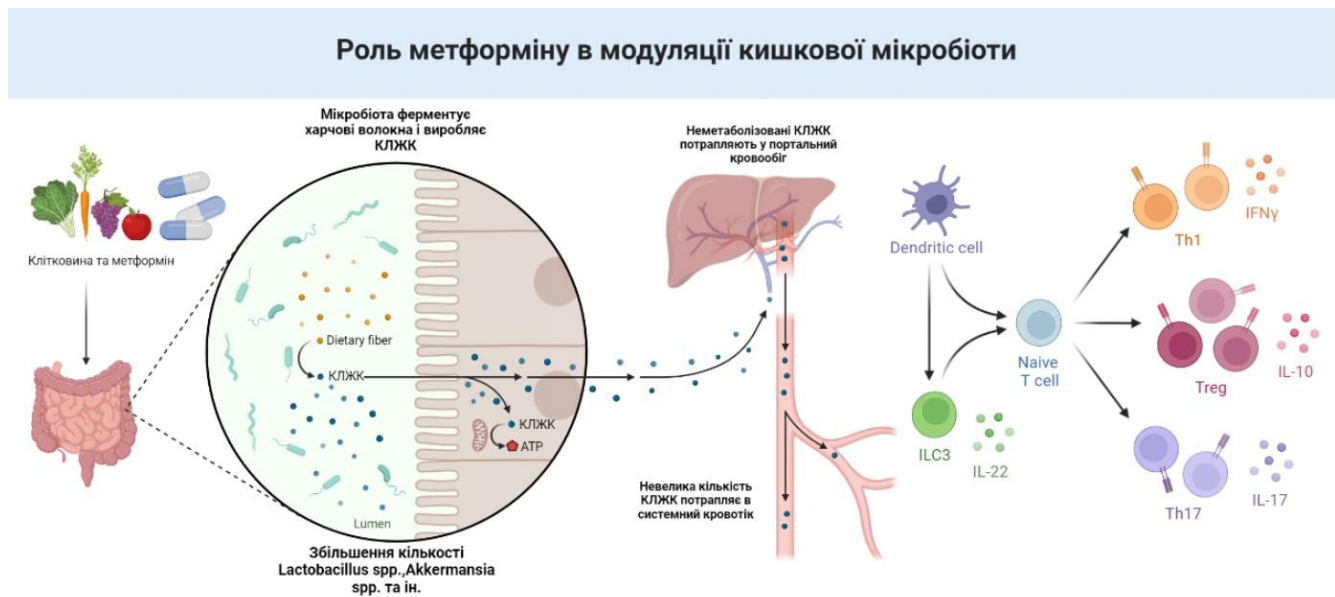


Рисунок 1.7 – Роль метформіну в модуляції кишкової мікробіоти

Таким чином можна зробити висновок, що певні зміни кишкової мікробіоти характерні, як для COVID-19, так і для ЦД-2. Кишкова мікробіота може впливати на стан запалення в легенях через так звану вісь «кишківник-легеня». Поєднаний вплив ЦД-2 та COVID-19 на склад кишкової мікробіоти досліджений не був та є актуальною та важливою сферою наукових досліджень.

Метформін, який є препаратом першої лінії при ЦД-2 – є лікарським засобом з позитивними плейотропними ефектами, такими як – вплив на імунометаболізм лімфоцитів (через АМФ-активовану протеїнкіназу пригнічуючи mTOR) чим він проявляє протизапальні ефекти; модулювання складу кишкової мікробіоти; протівірусні ефекти. Ці всі позитивні ефекти метформіну можуть сприяти швидшому одужанню пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2. Встановлення ролі метформіну в пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 є актуальним завданням клінічних досліджень, що може зменшити тривалість перебування пацієнтів у стаціонару та їх швидше відновлення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Принципи розподілу учасників дослідження на групи

Відбір пацієнтів для дослідження проводили на базі Закарпатської обласної клінічної інфекційної лікарні в період 2021 – 2022 років, згідно з листом-проханням проректора з наукової роботи проф. І.М. Кліща та дозволу директора КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня" Закарпатської Обласної Ради" (КНП «ОКІЛ» ЗОР) к.м.н., доц. М.А. Поляка.

Для дослідження особливостей кишкової мікробіоти та лабораторних показників було проведено неінтервенційне (обсерваційне) дослідження з поділом учасників на різні групи (рис. 2.1).

Принципи формування груп:

1. Контрольна група – група складається з пацієнтів, які не мають ні ЦД-2, ні COVID-19.
2. Пацієнти з ЦД-2 – група складається з пацієнтів, які мають діагноз ЦД-2, але не мають COVID-19. Діагноз ЦД-2 встановлювали на основі критеріїв American Diabetes Association.
3. Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2 – група складається з пацієнтів, які мають COVID-19, але не мають діагнозу ЦД-2. Всім пацієнтам діагноз COVID-19 підтверджувався на основі позитивного результату тесту полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
4. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 – група складається з пацієнтів, які мають і COVID-19 і ЦД-2.
5. Група варіанту Оміврон – пацієнти, котрі мають позитивний результат тесту ПЛР, наявність або відсутність ЦД-2 та лікувалися в медичному закладі в період високої поширеності штаму Оміврон.

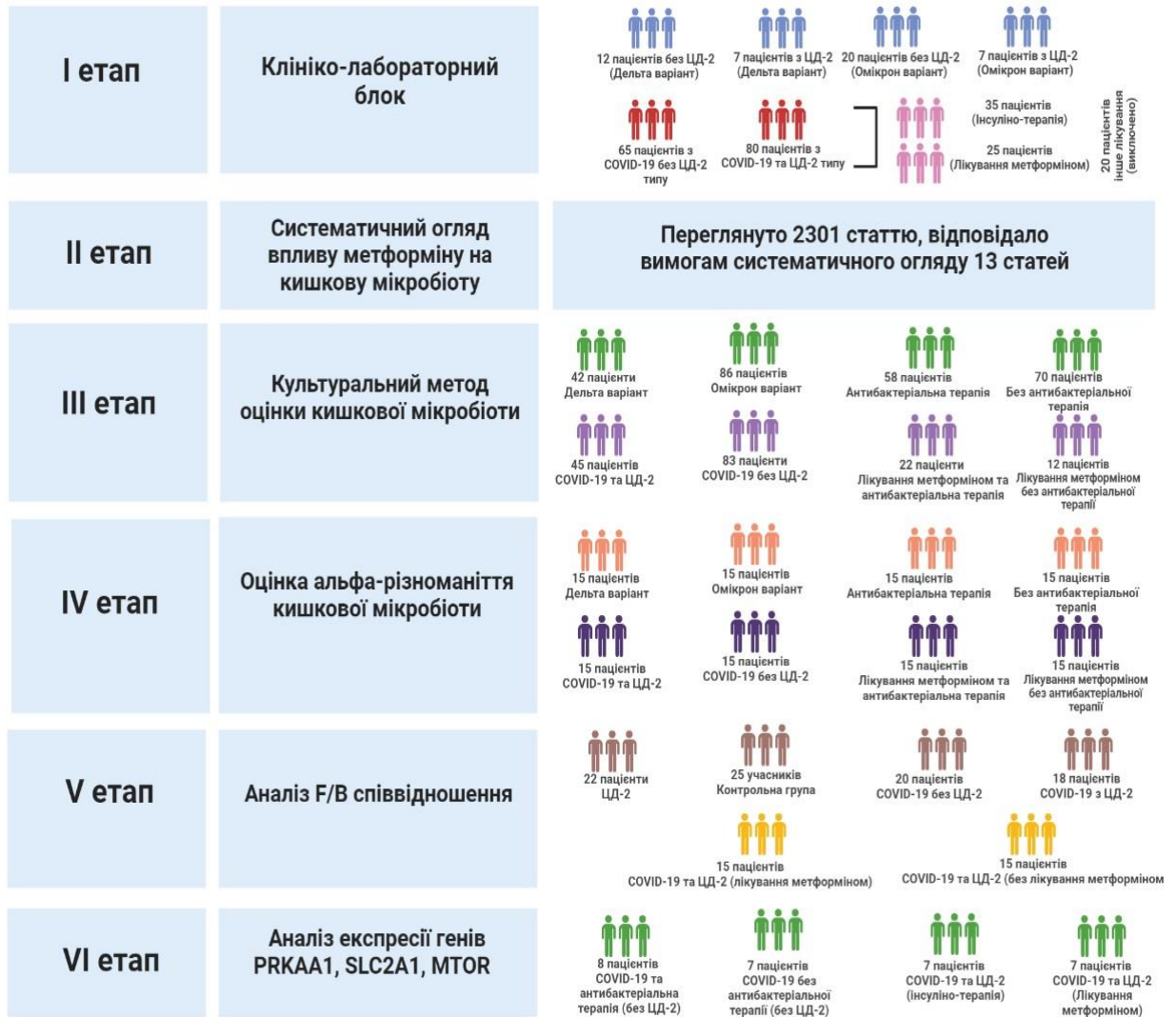


Рисунок 2.1 – Методологія розподілу пацієнтів на групи у різних частинах обсерваційного дослідження

6. Група варіанту Дельта – пацієнти, котрі мають позитивний результат тесту ПЛР, наявність або відсутність ЦД-2 та лікувалися в медичному закладі в період високої поширеності штаму Дельта.
7. Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію – група складається з пацієнтів з COVID-19, які не мають ЦД-2 і були піддані антибактеріальній терапії.
8. Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2, котрі не приймали антибактеріальну терапію – група складається з пацієнтів із COVID-19, які не мають ЦД-2 і не були піддані антибактеріальній терапії.

9. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію та лікування метформіном – група складається з пацієнтів, які мають як COVID-19, так і ЦД-2 та були піддані антибактеріальній терапії і лікуванню метформіном як мінімум за 3 місяці до поступлення в медичний заклад.
10. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію без лікування метформіном – група складається з пацієнтів, які мають як COVID-19, так і ЦД-2 та були піддані антибактеріальній терапії і терапії іншими цукрознижуючими лікарськими засобами (не метформіном).
11. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі були на терапії інсуліном – група складається з пацієнтів, які мають як COVID-19, так і ЦД-2, котрі були на інсулінотерапії як мінімум за 3 місяці до поступлення в медичний заклад.
12. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі лікувались метформіном – група складається з пацієнтів, які мають як COVID-19, так і ЦД-2, котрі були на інсулінотерапії як мінімум за 3 місяці до поступлення в медичний заклад.

Залежно від групи, було відібрано біологічний матеріал (кров та випорожнення) для подальшого бактеріологічного та молекулярно-генетичного дослідження.

У групі пацієнтів, які приймали антибактеріальну терапію — 29,3 % пацієнтам призначали лінезолід; 34,4 % — меропенем; 25,8 % — фторхінолони (моксифлоксацин або ципрофлоксацин), 10,5 % — цефалоспорини III або IV покоління. Пацієнти з ЦД-2, які отримували метформін, приймали його у дозі 1000-1500 мг на добу щонайменше 3 місяці до госпіталізації.

Критерії включення для всіх груп були такими: вік від 18 років та відсутність даних про прийом пребіотиків, не менше, як за 3 місяці до

відбору зразків випорожнень. Критерії виключення: вік менше 18 років, вагітність, лактація, запальні захворювання кишківнику (неспецифічний виразковий коліт та хвороба Крона) в анамнезі.

Бактеріологічні дослідження проведено згідно з наказом МОЗ України № 500 (редакція 28.12.2002) «Про затвердження примірних положень в бактеріологічній службі МОЗ України», а також Державні санітарні правилами–9.9.5–2001 МОЗ України «Правила влаштування і безпеки в лабораторіях мікробіологічного профілю». Молекулярно-генетичні дослідження проведено згідно з наказом МОЗ України № 26 (редакція 24.01.2008) «Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами", а також наказом МОЗ України № 662 (редакція 30.07.2013) «Про затвердження Методичних рекомендацій "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції"». Бактеріологічні та молекулярно-генетичні дослідження проводили відповідно до чинних нормативних актів та методичних рекомендацій.

Усі дослідження були виконані з дотриманням основних положень Гельсінської декларація Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження» (редакція від 01.10.2008), Конвенція про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину (редакція від 25.01.2005), статтею 28 Конституції України, статтею 45 Закону України «Основи законодавства України про охорону здоров'я», наказу МОЗ України № 690 (редакція від 07.04.2023), а також наказу МОЗ України № 616 (редакція від 28.03.2017), в яких людина виступає об'єктом досліджень. Усі пацієнти надавали інформовану згоду на участь у клінічному дослідженні.

Комісія з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (протокол № 74 від 1 вересня 2023 р.) встановила, що дослідження не суперечать загальноприйнятим біоетичним нормам, проведені з дотриманням відповідних міжнародних положень.

2.2 Методологія визначення клініко-лабораторних та демографічних даних

У дослідженні було використано таку демографічну інформацію, як вік та стать, котру було екстраговано з медичних карток стаціонарного хворого та електронної системи охорони здоров'я, також було підраховано тривалість перебування пацієнтів у стаціонарі (Length of stay, кількість ліжко-днів).

З медичних карток пацієнтів також було відібрано такі біохімічні лабораторні показники, як: С-реактивний протеїн (мг/л або мг/дл), креатинін сироватки (мкмоль/л), D-димер (мг/л), прокальцитонін (нг/мл), глюкоза сироватки (ммоль/л), а також показники лейкоцитарної формули: загальна кількість лейкоцитів, абсолютне та відносне число лімфоцитів, гранулоцитів та моноцитів периферичної крові. Додатково було проведено розрахунок нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення (співвідношення абсолютної кількості нейтрофілів до абсолютної кількості лімфоцитів).

Визначення біохімічних лабораторних показників проводили на базі Закарпатської обласної клінічної інфекційної лікарні за допомогою напівавтоматичного аналізатора Bioelab ES 105 (Bioelab, КНР). Лейкоцитарну формулу визначали за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора Abacus 3 CT (Diatron, Угорщина). Визначення D-димеру проводили за допомогою напівавтоматичного коагулометра ECL 105 (Erba Mannheim, Німеччина).

Також було відібрано супровідну медичну інформацію, про тип лікування (присутня антибактеріальна терапія чи ні, тип антибіотику), особливості цукрознижуючої терапії (інсулін, метформін чи інший лікарський засіб та їх дозування) та наявність коморбідної патології (хронічної хвороби нирок, серцево-судинних захворювань).

2.3 Методологія проведення систематичного огляду

2.3.1 Пошук релевантних джерел

Пошукова стратегія була розроблена з урахуванням концепції PICOS, яка зосереджувалася на популяції, втручаннях, порівняннях, результатах та дизайні дослідження. Зокрема, ми мали на меті дослідити вплив метформіну на мікробіоту кишечника людини, включаючи як здорових осіб, так і тих, хто має такі нозології, як ожиріння, переддіабет та діабет. Ми провели систематичний пошук у базах даних PubMed, EMBASE та Scopus за період з 1 січня 2000 року по 1 січня 2023 року, використовуючи відповідні ключові слова та пошукові терміни, узгоджені з критеріями PICO [156]. Наш пошук був зосереджений насамперед на клінічних випробуваннях і обсерваційних дослідженнях, як це рекомендовано для систематичних оглядів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Пошукова стратегія проведення систематичного огляду

| Бази даних | PubMed | Embase | Scopus |
|------------------|--|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Search terms – 1 | flora[tiab], microbiome[tiab], microbiota[tiab], microflora[tiab], microbes[tiab], microbial[tiab], microorganisms[tiab] | flora, microbiome, microbiota, microbial, microbes, microorganisms | flora, microbiome, microbiota, microbial, microbes, microorganisms |

Продовження таблиці 2.1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------|--|--|---|
| Search terms – 2 | Antihyperglycemic*[tiab], Hypoglycemic*[tiab], Antidiabetic*[tiab], Glucose control[tiab], Glucose lower*[tiab], Biguanide*[tiab], Metformin[tiab] | Antihyperglycemic*, Hypoglycemic*, Antidiabetic*, Glucose control, Glucose lower*, Biguanide*, Metformin | Antihyperglycemic*, Hypoglycemic*, Antidiabetic*, "Glucose control*", "Glucose lower*", Biguanide*, Metformin |
| Search fields | Title or abstract | Title or abstract | Title, abstract, or author keywords |

2.3.2 Критерії прийнятності

Ми дотримувалися рекомендацій, викладених у PRISMA, щоб гарантувати, що огляд був проведений у прозорий і ретельний спосіб [157]. Наші критерії включення визначали, що ми включали тільки ті дослідження на людях, які повідомляли оригінальні дані про мікробіоту кишечника після прийому метформіну, а також аналізували мікробіоту кишечника з використанням зразків фекалій. Крім того, дослідження повинні були бути написані англійською мовою. Ми виключили дослідження, які не містили даних про окремі бактеріальні таксони або були доступні лише у вигляді тез доповідей на конференціях чи у збірниках наукових праць.

2.3.3 Відбір досліджень

Спочатку ми переглянули заголовки та анотації всіх потенційно релевантних статей, а потім оцінили повнотекстові статті, щоб визначити їхню придатність. Два дослідники (автор цієї дисертації та його науковий керівник) здійснювали цей процес незалежно один від одного, а будь-які розбіжності вирішувалися шляхом консенсусу між ними і, за необхідності, шляхом консультацій з двома іншими дослідниками (доктором філософії Валентином Оксеничем та к.мед.н., доц. Іриною Камишною).

2.3.4 Процедура збору даних

Вилучення даних проводилося з використанням стандартизованої форми у файлі Microsoft Excel, яка включала такі деталі, як характеристика дослідження, інформація про учасників, деталі лікування, методика аналізу мікробіому та результати досліджень. Аспірант екстрагував дані, тоді як науковий керівник переглядав їх. Будь-які розбіжності вирішувалися на основі консенсусу між нами, а за необхідності залучалися два інші дослідники.

2.3.5 Оцінка ризику упередженості

Для оцінки ризику упередженості в обраних рандомізованих дослідженнях ми використовували інструмент Robvis [158]. Три дослідники (аспірант Павло Петах, доктор філософії Валентин Оксеніч та д-р.мед.наук, проф. Олександр Камишний) екстрагували дані про ризик упередженості, а в разі розбіжності залучали додаткового дослідника (канд.мед.наук, доц. Ірину Камишну).

2.3.6 Узагальнена величина ефекту

Окрім узагальнення особливостей проаналізованих досліджень, наша основна увага була зосереджена на дослідженні змін у конкретних бактеріальних таксонах, класифікованих у двох широко використовуваних таксономічних групах [Phylum (P), Genus (G)], при прийомі метформіну в усіх включених дослідженнях. Вторинними результатами, що представляли інтерес, були відмінності в мікробному різноманітті після прийому метформіну.

2.3.7 Синтез результатів

Первинні та вторинні результати були розділені на три категорії: значне збільшення, значне зменшення та відсутність значної різниці. Для синтезу змін кожного таксону було використано щонайменше два клінічних дослідження. Ці результати були додатково класифіковані на основі цільових досліджуваних популяцій, таких як пацієнти з ожирінням, предіабетом, вперше діагностованим ЦД-2 та маніфестним ЦД-2.

2.4 Методологія оцінки кишкової мікробіоти культуральним методом

2.4.1 Підготовка зразків та приготування серійних розведень

Біологічний матеріал доставляли якнайскоріше, але не пізніше 2-х годин, якщо біологічний матеріал транспортують при кімнатній температурі та не пізніше 4-х годин при температурі +4-6°C.

Першим етапом мікробіологічного дослідження є приготування робочого розведення. Для цього в градуйовану пробірку наливають 9 мл ізотонічного (0,9 %) фізіологічного розчину хлориду натрію. Потім у пробірку додають 1 грам випорожнень, ретельно розтирають, розмішують та залишають при кімнатній температурі протягом 10 хвилин, таким чином створили перше розведення біологічного матеріалу (10^{-1}). Надалі потрібно перенести 1 мл зависі із пробірки з робочим розведенням в 1 мл ізотонічного (0,9 %) фізіологічного розчину хлориду натрію, не торкаючись стінок пробірки і рідини. Піпетку змінити. Чистою піпеткою піпетувати завись 6-8 разів і перенести в наступну пробірку з 1 мл ізотонічного (0,9 %) фізіологічного розчину хлориду натрію. Так приготувати розведення до 10^{-10} .

2.4.2 Висів на поживні середовища, інкубація, ідентифікація мікроорганізмів та підрахунок КУО

З кожного розведення за допомогою стерильних мікропіпеток відбирали по 10 мкл і наносили на живильні середовища (рис. 2.2).

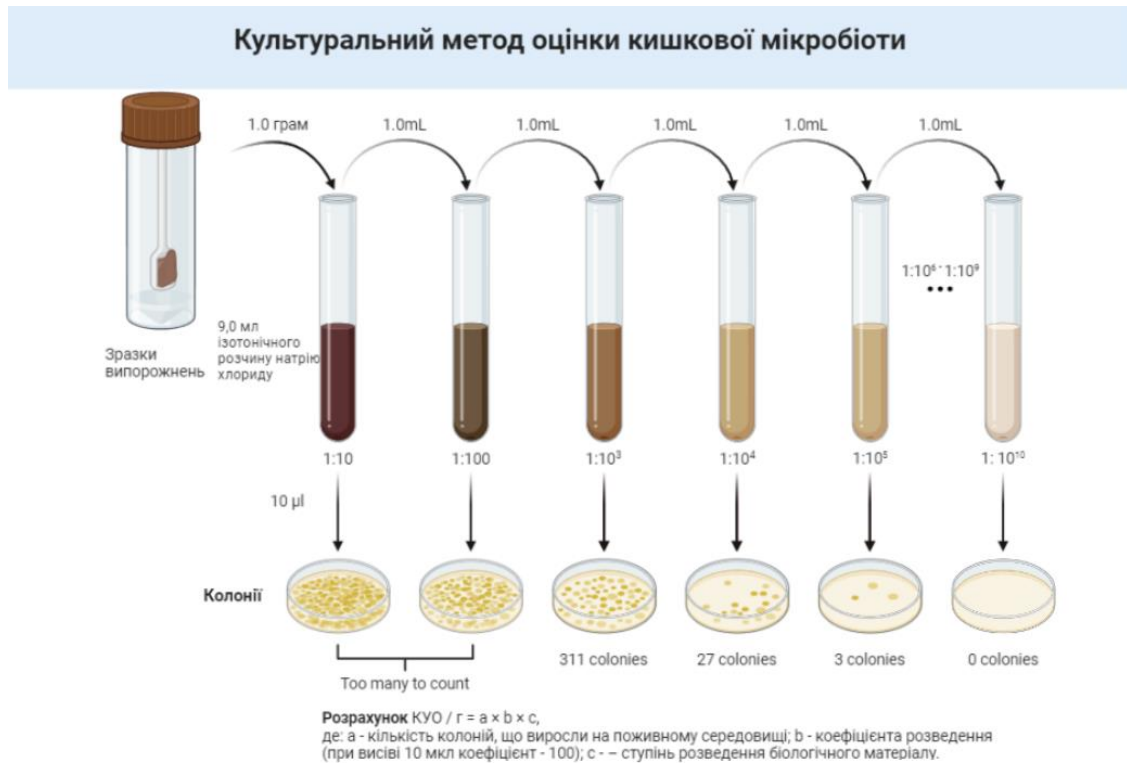


Рисунок 2.2 – Методологія оцінки кишкової мікробіоти культуральним методом

Для виділення ентеробактерій використовували комерційні поживні середовища Ендо (Biolife Italiana S.r.l., Італія) та вісмут-сульфіт агар (Biolife Italiana S.r.l., Італія); для ізоляції бактерій роду *Staphylococcus* – Mannitol salt agar (Biolife Italiana S.r.l., Італія); для бактерій роду *Enterococcus* – Bile Esculin Agar (HiMedia Laboratories, Індія); для дріжджеподібних грибів роду *Candida* – Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (Graco Biotech, Польща); Iron sulfite agar (Wilson-Blair) (Pharmaktiv, Україна) використовувався для виділення бактерій роду *Clostridium*; MRS Agar (Sharpe

agar) (HiMedia Laboratories, Індія) для бактерій роду *Lactobacillus*; Bifidobacterium Selective Agar (HiMedia Laboratories, Індія) для бактерій роду *Bifidobacterium*; а Bacteroides Bile Esculin Agar (HiMedia Laboratories, Індія) для бактерій роду *Bacteroides*. Зразки інкубували в аеробних умовах в термостаті при температурі 37°C протягом 24-48 год. Для ізоляції анаеробних бактерій зразки інкубували з використанням анаеропакетів GENbox anaer («Biomerieux», Франція) протягом 48-72 год при температурі 37°C.

Визначення чисельності мікробних таксонів проводили за формулою:

$$\text{КУО} / \Gamma = a \times b \times c,$$

де: a – кількість колоній, що вирости на поживному середовищі;

b – коефіцієнта розведення (при висіві 10 мкл коефіцієнт – 100);

c – ступінь розведення біологічного матеріалу.

Для зручності викладу матеріалу та статистичної обробки використовували десяткові логарифми кількісного показника вирощених колоній мікроорганізмів ($\lg \text{КУО}/\Gamma$), а також розраховували частку родів, виражену у відсотках.

Видову належність ізольованих штамів мікроорганізмів встановлювали за тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями, згідно зі схемою на основі *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 1-3, 4th Edition*.

2.5 Методика визначення індексів альфа-різноманіття

Для розрахунку альфа-різноманіття кишкової мікробіоти використовували індекси Shannon H' та Simpson.

1. Індекс Shannon H' розраховували за формулою:

$$H' = -\sum (p_i \times \ln(p_i)),$$

де p_i – відносна частота кожного роду в зразку,

\ln – натуральний логарифм.

Сума вираховується для всіх видів, які зустрічаються в зразку.

Високе значення H' вказує на велику різноманітність у популяції мікроорганізмів, що означає більшу різноманітність родів та більш рівномірний розподіл їх відносних частот. Низьке значення H' вказує на меншу різноманітність, що може відбуватися внаслідок домінування деяких родів над іншими.

2. Індекс Simpson $1/D$ розраховували за формулою:

$$1/D = 1 / \sum p_i^2,$$

де p_i – частка особин, віднесених до кожного роду в мікробіоті кишечника.

Значення індексу Simpson $1/D$ також лежить у діапазоні від 0 до 1. Чим більше значення (ближче до 1), тим більша різноманітність у кишковій мікробіоті.

Для обчислення біорізноманіття ми використали калькулятор біорізноманіття Abundance Curve Calculator by Dr. James A. Danoff-Burg and X. Chen, 27 April 05.

2.6 Визначення співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes у зразках випорожнень молекулярно-генетичним методом

Для аналізу визначення співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Основні етапи дослідження відображені на рисунку 2.3.

2.6.1. Зберігання та підготовка зразків. Виділення ДНК зі зразків випорожнень.

Використовують фекалії після природної дефекації, які збирають у чистий одноразовий контейнер з ложечкою, вмонтованою в кришку, що загвинчується. Для тривалого зберігання біоматеріал підлягав

заморожуванню з попередньою пробопідготовкою. Спочатку готували фекальну суспензію шляхом внесення у мікропробірку (типу Еппендорф) 0,8 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, внесення 200 мкг фекалій, отриману суміш ресуспендували на вортексі до отримання гомогенної суспензії, до отриманої суспензії додавали гліцерин у кінцевій концентрації 15 %. Підготовлені проби заморожують після ретельної гомогенізації та витримування з гліцеином впродовж 30 хв. Зберігали зразки при -70°C протягом 3 місяців. Для полегшення екстракції ДНК, зразки зберігали при -20°C за 3 дні до виділення ДНК.

Виділення ДНК та ПЛР в режимі реального часу

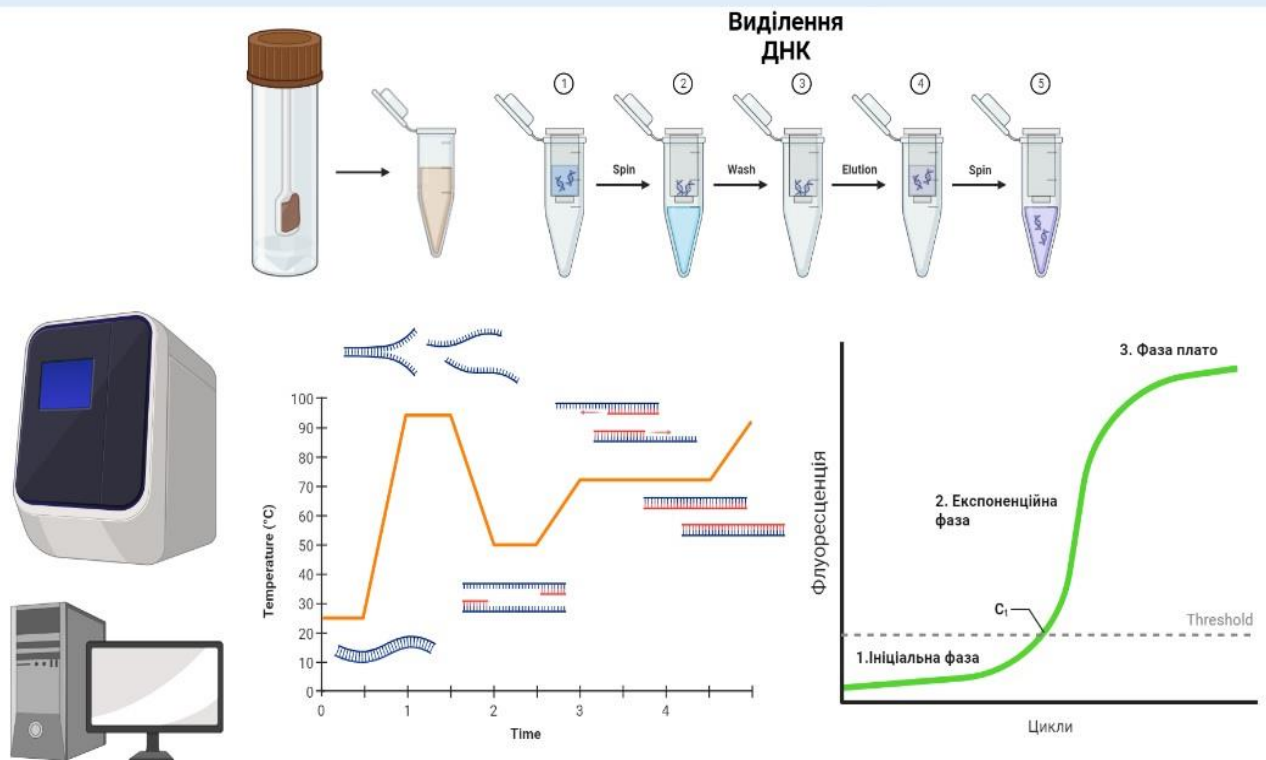


Рисунок 2.3 – Методологія визначення співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes молекулярно-генетичним методом

ДНК екстрагували з 100 мг аліквоти заморожених зразків за допомогою DNAzol (Thermo Scientific, США) відповідно до інструкції виробника. Екстраговану ДНК елюювали в 200 мкл елюючого буферу, щоб отримати кінцеву концентрацію ДНК для кожного зразка.

2.6.2 Кількісне визначення таксонів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та розрахунок співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes

Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили на ампліфікаторі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) з використанням універсальних праймерів, націлених на бактеріальний ген 16 S rRNA, і специфічними праймерами для Firmicutes і Bacteroidetes (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Таксон-специфічні та універсальні праймери використані в дослідженні

| Назва відділу бактерій | Нуклеотидна послідовність праймера |
|---|--|
| Firmicutes | 928 F-firm TGAAACTYAAGGAATTGACG 1040FirmR ACCATGCACCACCTGTC |
| Bacteroidetes | 798cfbF CRAACAGGATTAGATACCCT cfb967R GGTAAGGTTCCCTCGCGCTAT |
| Універсальні бактеріальні послідовності 16 S rRNA | 926 F AAAC TCAA AKGAATTGACGG 1062 R CTCACRRCACGAGCTGAC |

Протокол ПЛР реакції включав в себе такі етапи, як:

1. Початкова стадія денатурації: Тривалістю 5 хвилин при 95 °С.
2. Цикли ампліфікації. Здійснювалося 30 циклів ампліфікації з такими параметрами:

- a) Денатурація. Проводиться при 95 °С протягом 15 секунд.
 - b) Відпал. Здійснюється при 61,5 °С протягом 15 секунд.
 - c) Елонгація. Здійснюється при 72 °С протягом 30 секунд.
3. Кінцева стадія елонгації. Проводиться при 72 °С протягом 5 хвилин.

У пробірку додають такі компоненти в зазначеному порядку: 0,05 одиниць/мкл Таq полімерази (Sigma Aldrich, США); 0,2 mM кожного dNTP Міх; 0,4 мкМ кожного праймера; 1× буфер; 10 нг екстрагованої ДНК; воду, вільну від ДНКаз до отримання загального об'єму 25 мкл.

Зразки ампліфікували з усіма парами праймерів у трьох повторях. Реєстрували критичні цикли ампліфікації Threshold cycle (Cts) (univ і spec).

Середні значення порогових циклів (Cts) використовували для розрахунку відсотка таксон-специфічних копій гена 16 S rRNA у кожному зразку за допомогою рівняння:

$$X = (\text{Eff. Univ})^{\text{Ct univ}} / (\text{Eff. Spec})^{\text{Ct spec}} \times 100,$$

де Cts (як універсальні, так і специфічні) – порогові цикли, зареєстровані термоциклером. Ефективність універсальних праймерів була розрахована та представлена як Eff. Univ (2 =100 % і 1 =0 %), тоді як ефективність таксон-специфічних праймерів представлена як Eff.Spec. Згідно з даним рівнянням, X – це відсоток кількості копій таксону у даному зразку. Виявлення продуктів ампліфікації ґрунтувалося на флуоресценції барвника SYBR Green.

Розрахунок співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes проводили поділом кількості таксонспецифічних копій відділу Firmicutes (виражених у відсотках) до таксон специфічних копій Bacteroidetes (виражених у відсотках).

2.7 Зміни рівня експресії генів *PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR* у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу.

Основні етапи визначення експресії генів відображені на рисунку 2.4.

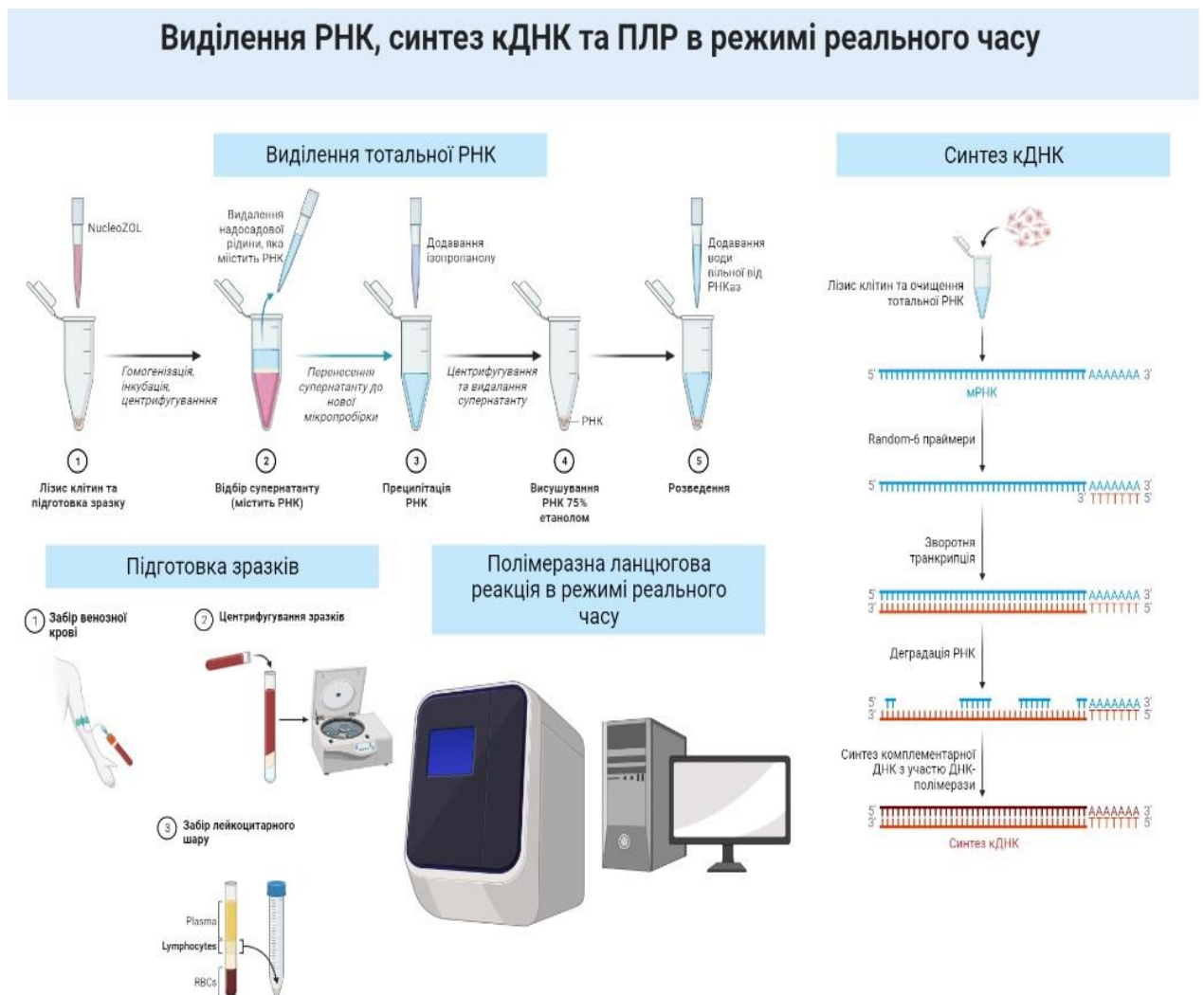


Рисунок 2.4 – Методологія визначення експресії генів *PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR*

2.7.1 Виділення тотальної РНК

Венозна кров була відібрана згідно зі стандартними процедурами флеботомії в пробірці з ЕДТА К3 об'ємом по 2 мл. Надалі пробірці були

піддані заморожуванню при температурі – 80°C та зберігалися в такому стані 4 місяці.

Перед виділенням тотальної РНК, всі зразки були попередньо розморожені. Надалі пробірки центрифугують при 1100 обертах за хвилину (об/хв) протягом 10 хв, після чого, використовуючи наконечник з фільтром, акуратно збирають лейкоцитарну масу з поверхні осаду клітин в об'ємі 0,2 мл і переносять у стерильну мікропробірку типу Еппендорф об'ємом 2,0 мл для подальшої екстракції РНК.

Виділення тотальної РНК проводили NucleoZOL (Macherey-Nagel, Німеччина) , для цього додають 1 мл NucleoZOL до 400 мкл зразку (виділеного шару лейкоцитів). Наступним етапом було додавання 400 мкл води, вільної від РНКаз, інтенсивне перемішування вмісту пробірки протягом 15 секунд та подальшого інкубування при кімнатній температурі протягом 10 хвилин, після чого зразки центрифугували протягом 15 хвилин при 12 000 об/хв.

Утворений супернатант (в об'ємі 1 мл) переносили в нову мікропробірку та додавали 1 мл ізопропанолу, інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин та центрифугували протягом 10 хвилин при 10 000 об/хв. Повністю видаляють супернатант перевертанням пробірки. Додавали 500 мкл 75 % етанолу, центрифугували протягом 2 хвилин при 5000 об/хв, видаляли етанол піпетуванням, цю процедуру промивання виділеної тотальної РНК етанолом повторюють двічі.

Розчинюють отриманий осад РНК у воді, вільній від РНКаз, щоб отримати концентрацію тотальної РНК 1 мкг/мкл. Струшували зразок протягом 2–5 хвилин при кімнатній температурі для ефективного розчинення.

2.7.2 Синтез кДНК

Для зворотної транскрипції використовували набір RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, США).

1. Додають такі реагенти в стерильну мікропробірку на льоду у вказаному порядку: виділена тотальна РНК (2 мкл), Random Hexamer primer (1 мкл), деіонізована вода, вільна від нуклеаз (9 мкл). Загальний об'єм – 12 мкл.

2. У пробірку додають такі компоненти в зазначеному порядку: 5X Reaction Buffer (4 мкл); RevertAid M-MuLV RT (1 мкл); 10 mM dNTP Mix (2 мкл); RiboLock RNase Inhibitor (1 мкл). Загальний об'єм – 20 мкл. Обережно перемішують і центрифугують.

3. Інкубують суміш при 25 °С протягом 5 хвилин, далі при 42 °С протягом 60 хв.

4. Зупиняють реакцію прогріванням при температурі 70 °С протягом 5 хв. Продукти реакції зворотної транскрипції зберігають при температурі -20°C не більше одного тижня.

2.7.3 Визначення експресії таргетних генів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів було використано метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (qPCR) з використанням набору Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) на апараті CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США).

Протокол включав такі етапи:

1. Ініціююча денатурація: Пробірку з реакційною сумішшю піддавали нагріванню до 95 °С протягом 10 хвилин.

2. Цикли ампліфікації: Протягом 50 циклів виконувалися такі кроки:

a) Денатурація: Реакційна суміш була нагріта до 95 °С протягом 15 секунд.

b) Віджиг праймерів: Реакційна суміш була охолоджена до температури 60 °С протягом 40 секунд. Це дозволяло праймерам зв'язуватися з цільовими послідовностями ДНК.

c) Елонгація: Реакційна суміш була нагріта до 72 °С протягом 40 секунд

3. Реєстрація флуоресценції: Інтенсивність флуоресценції, що випромінюється SYBR Green, автоматично реєструвалася після кожного циклу елонгації.

Приготування реакційної суміші проводили відповідно до протоколу набору з виконанням таких етапів:

1. На одну мікропробірку (об'ємом 200 мкл) при кімнатній температурі додають: 2-кратний Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) – 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотній) по 0,3 мкМ кожного.
2. Додають кДНК (500 нг / реакція). Об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою.
3. Ретельно перемішують реакційну суміш без утворення бульбашок.
4. Розміщують зразки в ампліфікаторі й запускають програму (рис. 2.5).

Приготування реакційної суміші проводили відповідно до протоколу набору з виконанням таких етапів:

5. На одну мікропробірку (об'ємом 200 мкл) при кімнатній температурі додають: 2-кратний Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) – 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотній) по 0,3 мкМ кожного.

6. Додають кДНК (500 нг / реакція). Об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою.
7. Ретельно перемішують реакційну суміш без утворення бульбашок.
8. Розміщують зразки в ампліфікаторі й запускають програму (рис. 2.5).

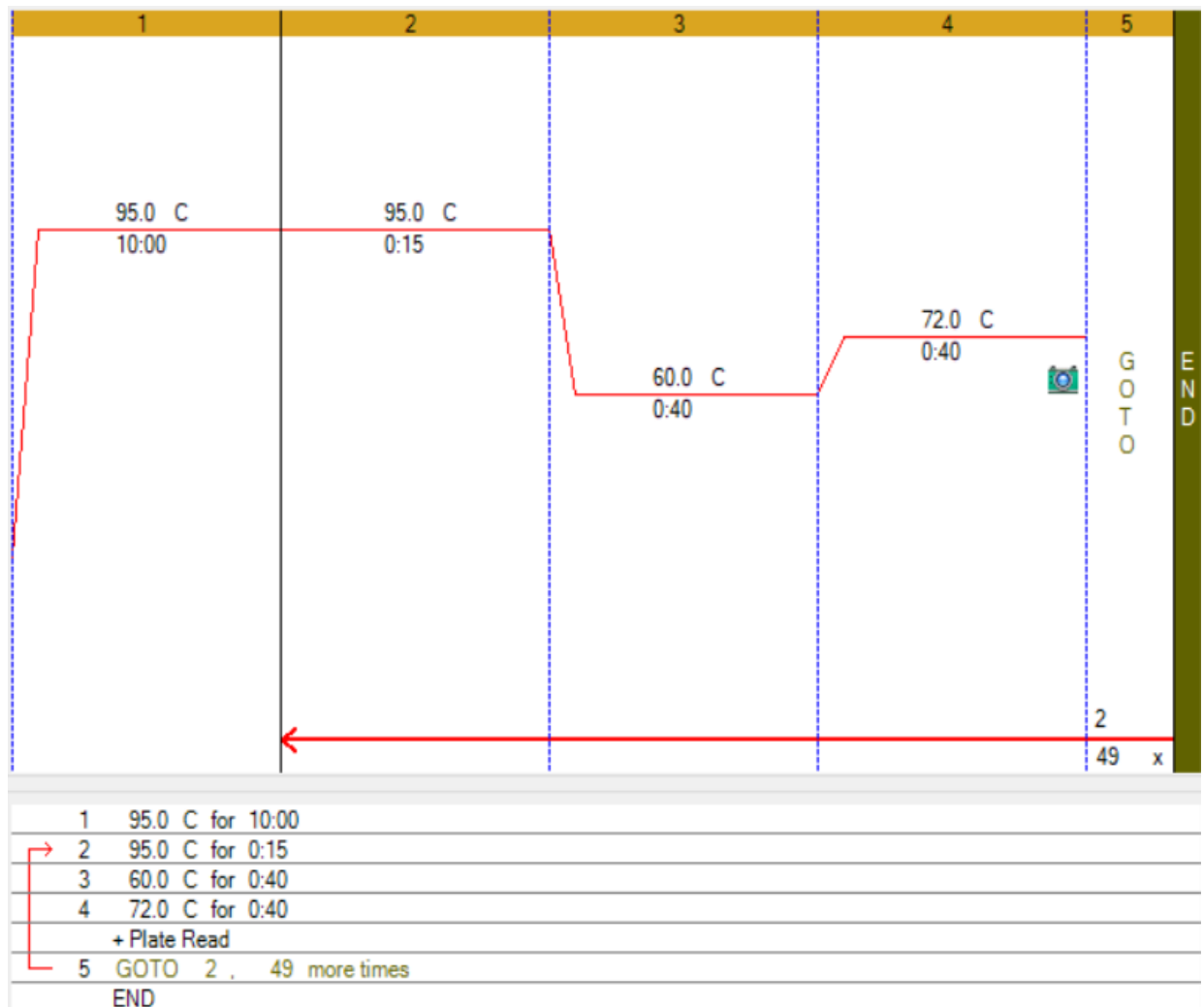


Рисунок 2.5 – Протокол полімеразної ланцюгової реакції

Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референтного гена були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (НИН, США) та виготовлені фірмами Metabion (Німеччина) і ThermoScientific (США). У ролі референт-гену для визначення відносного значення зміни

рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген бета-актину (beta-actin) (табл. 2.3).

Таблиця 2.3 – Специфічні праймери, використані в дослідженні

| Ген | Нуклеотидна послідовність праймера | T _{пл} , °C | Довжина продукту ПЛР, п. н. | Екзон-екзонний стик |
|---------------|---|----------------------|-----------------------------|---------------------|
| <i>PRKAA1</i> | F = CGGCAAAGTGAAGGTTGGC R = CCTACCACATCAAGGCTCCG | 57.8 60.0 | 96 | 312/ 313 |
| <i>SLC2A1</i> | F = TGGCATCAACGCTGTCTTCT R = AGCCAATGGTGGCATAACACA | 59.9 59.9 | 83 | 1084/ 1085 |
| <i>MTOR</i> | F = AAGCCGCGCGAACCTC R = TTGCTAGATGTGGTGGCAGC | 60.5 60.7 | 77 | 642/ 643 |
| <i>Actb</i> | F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = ATATCATCATCCATGGTGAGCTGG | 61.30 61.15 | 59 | 107/108 |

Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ($\Delta\Delta Ct$ метод). Розрахунки проводили за формулами:

$$\Delta Ct (\text{гена-мішені}) = Ct (\text{гена-мішені}) - Ct (\text{гена-калібратора} / \text{ACT1});$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{гена-мішені}) - \Delta Ct (\text{базисного гена}).$$

Відносну нормалізовану експресію виражали в \log_2 .

Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad, США). Усі реакції ампліфікації повторювали три рази.

2.8 Методи статистичної обробки одержаних даних

Аналіз одержаних даних проводили з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism (GraphPad Software, США) , jamovi (project, Австралія), JMP 17 (SAS Institute Inc., США).

Результати кількісних показників були представлені у вигляді $M \pm SD$, де M – середнє арифметичне, SD – середнє квадратичне відхилення. Категоріальні показники були представлені у вигляді відсотків (%).

Для визначення статистичних достовірностей між різними групами було використано такі статистичні методи, як: t-критерій Стьюдента, U-критерій Манна-Уїтні, критерій χ^2 -квадрат та непараметричний Kruskal–Wallis тест. Для визначення нормальності розподілу використовували критерій Шапіро-Вілка. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відкидали при $p < 0,05$.

Також було проведено кореляційний аналіз, з розрахунком коефіцієнта кореляції Спірмена або Пірсона залежно від типу даних та їх розподілу. Презентацію кореляційного аналізу виконували також у вигляді кореляційної матриці.

Бінарну логістичну регресію було використано для дослідження зв'язку між різними бінарними групами та демографічними і лабораторними показниками. Коефіцієнти регресії, стандартні помилки, рівні значущості та інші статистичні показники були розраховані для оцінки сили та значимості зв'язку між групами та показниками. Додатково для оцінки ефективності моделі була побудована ROC-крива (Receiver Operating Characteristic curve). Для цього, залежно від порогового значення, були розраховані чутливість (true positive rate) і специфічність (true negative rate) моделі. Чутливість відображає відсоток правильно визначених позитивних випадків, тоді як специфічність відображає відсоток правильно визначених негативних випадків. Оцінкою ефективності моделі на основі

ROC-кривої є площа під кривою (Area Under the Curve, AUC). Чим більше значення AUC, тим краща є модель у відокремленні позитивних та негативних випадків.

2.9 Сплутуючі фактори (конфаундери) та упередженість у дослідженні

У ході цього дослідження вкрай важливо визнати потенційну присутність сплутуючих факторів та джерел упередженості, оскільки вони можуть суттєво впливати на інтерпретацію та можливість узагальнення результатів. Щоб отримати всебічне розуміння результатів дослідження, необхідно врахувати такі сплутуючі фактори, як:

1. *Вік і стать*: Вік і стать є основними факторами, які можуть впливати на склад кишкової мікробіоти. У дослідженні не враховувалися вплив віку на склад мікробіоти.
2. *Супутні захворювання*: хоча дослідження в основному зосереджено на пацієнтах із COVID-19 і ЦД-2, воно не вивчає вплив інших супутніх захворювань. Такі стани, як ожиріння або серцево-судинні захворювання, також можуть суттєво впливати на стан кишкової мікробіоти.
3. *Використання лікарських засобів (ЛЗ)*: у дослідженні обговорюється вплив метформіну та антибіотикотерапії, але не враховується потенційний вплив інших ЛЗ.
4. *Харчові продукти (дієта)*. Варіації в дієтах учасників можуть спотворити результати, оскільки продукти харчування, також впливають на склад мікробіоти кишківника.

Що стосується джерел упередженості в цьому дослідженні, слід визнати кілька важливих аспектів:

1. *Упередженість відбору*: учасники дослідження відібрані з певного географічного регіону, що потенційно може призвести до упередженості відбору.
2. *Похибка вимірювання*: залежність дослідження від культуральних методів оцінки кишкової мікробіоти може спричинити похибку вимірювання. Такі методи можуть не охопити повного розмаїття мікробіоти кишечника, що потенційно може вплинути на результати дослідження.

РОЗДІЛ 3

КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ COVID-19 ТА ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

3.1 Гематологічні показники у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу у періоди домінування варіанту Омікрон (B.1.1.529) або Дельта (B.1.617.2)

У дослідження було включено 65 госпіталізованих пацієнтів із діагнозом COVID-19. Як показано в таблиці 3.1, у дослідження було включено 33 (50,7 %) пацієнти з ЦД-2 та 32 (49,3 %) пацієнти без ЦД-2. Пацієнти з ЦД-2 були старшими у обох групах порівняно з пацієнтами без ЦД-2 ($p < 0,05$).

Не було достовірних відмінностей у показниках сироваткового креатиніну ($p = 0,692$), кількості гранулоцитів ($p = 0,227$), СРП ($p = 0,462$), D-димеру ($p = 0,926$) та прокальцитоніну ($p = 0,843$) між пацієнтами з ЦД-2 та без ЦД-2 у групі варіанту Дельта. Цікаво, що абсолютна кількість лейкоцитів і лімфоцитів у групі Дельта була достовірно вищою у пацієнтів із ЦД-2 (лейкоцити $9,28 \pm 4,46 \times 10^9/\text{л}$ проти $6,36 \pm 2,80 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,096$ та кількість лімфоцитів $1,32 \pm 0,47 \times 10^9/\text{л}$ проти $0,86 \pm 0,30 \times 10^9/\text{л}$; $p = 0,028$).

У групі варіанту Омікрон не було виявлено достовірних відмінностей між пацієнтами з ЦД-2 та без ЦД-2 у всіх досліджуваних гематологічних показниках, таких як: рівень сироваткового креатиніну ($p = 0,706$), кількість гранулоцитів ($p = 0,101$), СРП ($p = 0,751$), D-димеру ($p = 0,605$), прокальцитоніну ($p = 0,331$), кількість лейкоцитів ($p = 0,223$) та лімфоцитів ($p = 0,258$).

При дослідженні гематологічних показників у пацієнтів із ЦД-2 між групами варіанту Дельта та Омікрон виявлено достовірно вищі рівні прокальцитоніну ($1,45 \pm 0,91$) нг/мл) в групі пацієнтів з ЦД-2 та Дельта варіантом SARS-CoV-2 проти ($0,06 \pm 0,02$) нг/мл в групі пацієнтів з ЦД-2 та

Омікрон варіантом SARS-CoV-2 ($p = 0,003$); моноцитів $(0,001 \pm 0,002) \times 10^9/l$ в групі пацієнтів з ЦД-2 та Дельта варіантом проти $(0,3 \pm 0,20) \times 10^9/l$ в групі пацієнтів з ЦД-2 та Омікрон варіантом ($p = 0,001$).

Таблиця 3.1 – Демографічні та лабораторні показники пацієнтів залежно від наявності ЦД-2 та періоду домінування варіанту Дельта або Омікрон

| Показник | Група варіанту Дельта | | Група варіанту Омікрон | |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Без ЦД-2 | З ЦД-2 | Без ЦД-2 | З ЦД-2 |
| | n = 12 | n = 7 | n = 20 | n = 26 |
| Вік (Середнє \pm SD) | 53,66 \pm 13,37 | 67,00 \pm 7,70 | 55,75 \pm 15,02 | 70,42 \pm 8,86 |
| Стать (Ч/Ж) | 6/6 | 3/4 | 1/19 | 8/18 |
| Сироватковий креатинін (мкмоль/л) | 107,94 \pm 17,73 | 112,74 \pm 34,62 | 104,23 \pm 19,63 | 121,00 \pm 82,10 |
| Лейкоцити ($\times 10^9/l$) | 6,36 \pm 2,80 | 9,28 \pm 4,46 | 9,48 \pm 4,99 | 10,67 \pm 3,76 |
| Гранулоцити ($\times 10^9/l$) | 5,49 \pm 2,79 | 7,98 \pm 4,40 | 7,83 \pm 5,03 | 9,24 \pm 3,69 |
| Лімфоцити ($\times 10^9/l$) | 0,86 \pm 0,30 | 1,32 \pm 0,47 | 1,32 \pm 0,52 | 1,18 \pm 0,55 |
| Моноцити ($\times 10^9/l$) | 0,07 \pm 0,003 | 0,001 \pm 0,002 | 0,1 \pm 0,02 | 0,3 \pm 0,20 |
| СРП (мг/л) | 88,45 \pm 62,06 | 67,14 \pm 34,11 | 69,62 \pm 70,36 | 71,70 \pm 14,06 |
| D-димер (мг/л) | 0,88 \pm 0,55 | 0,90 \pm 0,64 | 3,18 \pm 4,04 | 2,63 \pm 3,10 |
| Прокальцитонін (нг/мл) | 0,05 \pm 0,02 | 1,45 \pm 0,91 | 0,71 \pm 0,69 | 0,06 \pm 0,02 |

Як показано в таблиці 3.2, пацієнти з ЦД-2 достовірно частіше мали серцево-судинні та цереброваскулярні супутні захворювання в обох групах ($p < 0,05$). Переважна пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 в стаціонарі коригували глікемію інсуліном (85,7 % в групі з варіантом Дельта та 73,0 % в групі з варіантом Оміврон).

Таблиця 3.2 – Особливості коморбідної патології та тип цукрознижуючої терапії в досліджуваних групах

| Показник | Група варіанту Дельта | | Група варіанту Оміврон | |
|--|-----------------------|------------|------------------------|-------------|
| | Без ЦД-2 | З ЦД-2 | Без ЦД-2 | З ЦД-2 |
| Коморбідні патології, при надходженні в медичний заклад | | | | |
| Серцево-судинні та цереброваскулярні захворювання, n (%) | 3 (25 %) | 7 (100 %) | 12 (60 %) | 23 (88,4 %) |
| Пухлинні захворювання, n (%) | 0 | 0 | 0 | 1 (3,8 %) |
| За захворювання ШКТ, n (%) | 0 | 0 | 1 (5 %) | 0 |
| Респіраторні хвороби, n (%) | 2 (16,6 %) | 0 | 0 | 1 (3,8 %) |
| Хвороби нервової системи, n (%) | 0 | 0 | 1 (5 %) | 1 (3,8 %) |
| Тип цукрознижуючої терапії | | | | |
| Інсулін, n (%) | 0 | 6 (85,7 %) | 0 | 19 (73,0 %) |
| Метформін, n (%) | 0 | 4 (57,1 %) | 0 | 8 (30,7 %) |

Також для визначення типу варіанту SARS-CoV-2 (Дельта або Оміврон) на основі гематологічних показників із використанням бінарної логістичної регресії була розроблена така математична модель:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%,$$

де P – ймовірність дельта-варіанту;

$$z = 1,506 - 0,102 \times \text{сироваткова глюкоза} + 0,104 \times \text{лейкоцити} - 0,269 \times \text{гранулоцити} + 0,754 \times \text{лімфоцити} - 6,695 \times \text{моноцити} + 0,562 \times \text{прокальцитонін} - 0,002 \times \text{СРП}.$$

Отримана регресійна модель є статистично значущою ($p < 0,001$). Виходячи зі значення R^2 Nagelkerke, модель пояснює 41,6 % спостережуваної дисперсії варіантів. На кожну одиницю збільшення моноцитів, шанси виявлення Дельта-варіанту зменшуються у 808,031 разів (табл. 3.3, рис. 3.1).

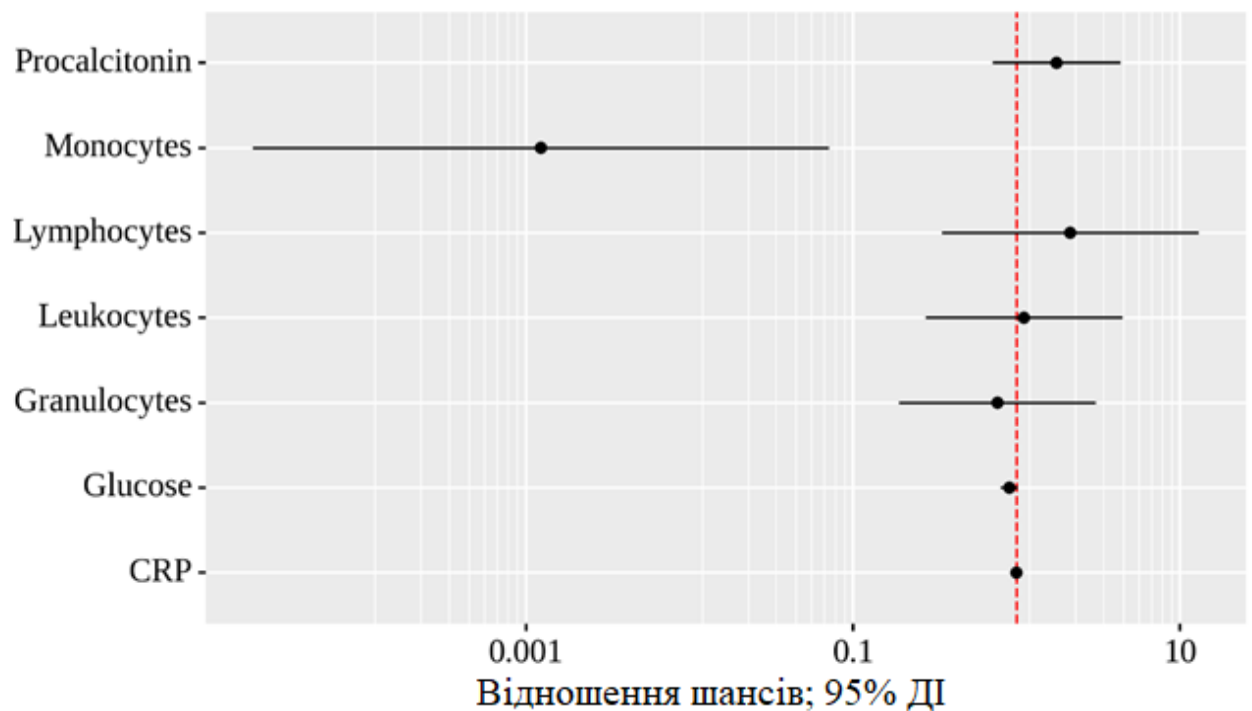


Рисунок 3.1 – Оцінка відношення шансів наявності варіанту Дельта на основі гематологічних предикторів, включених до моделі

Площа під ROC-кривою становила $0,845 \pm 0,047$ при 95 % ДІ: 0,754 – 0,937. Отримана модель була статистично значущою ($p < 0,001$) (рис. 3.2).

Таблиця 3.3 – Характеристики зв'язку предикторів з імовірністю варіанту (Дельта або Оміврон)

| Предиктори | Не скоригований | | Скоригований | |
|---------------------|------------------------------|--------|--|--------|
| | Грубі коефіцієнти 95 % ДІ | p | Скоригований коефіцієнт шансів 95 % ДІ | p |
| Сироваткова глюкоза | 0,890; 0,804 – 0,986 | 0,025* | 0,903; 0,801 – 1,018 | 0,094 |
| Лейкоцити | 0,836; 0,733 – 0,953 | 0,007* | 1,109; 0,279 – 4,415 | 0,883 |
| Гранулоцити | 0,821; 0,714 – 0,944 | 0,006* | 0,764; 0,192 – 3,050 | 0,703 |
| Лімфоцити | 0,917; 0,444 – 1,896 | 0,816 | 2,126; 0,348 – 12,975 | 0,414 |
| Моноцити | 0,008; 0,000 – 0,165 | 0,002* | 0,001; 0,000 – 0,071 | 0,001* |
| Прокальцитонін | 0,892; 0,496 – 1,605 | 0,703 | 1,755; 0,717 – 4,293 | 0,218 |
| СРП | 0,995; 0,987 – 1,003 | 0,194 | 0,998; 0,988 – 1,007 | 0,647 |

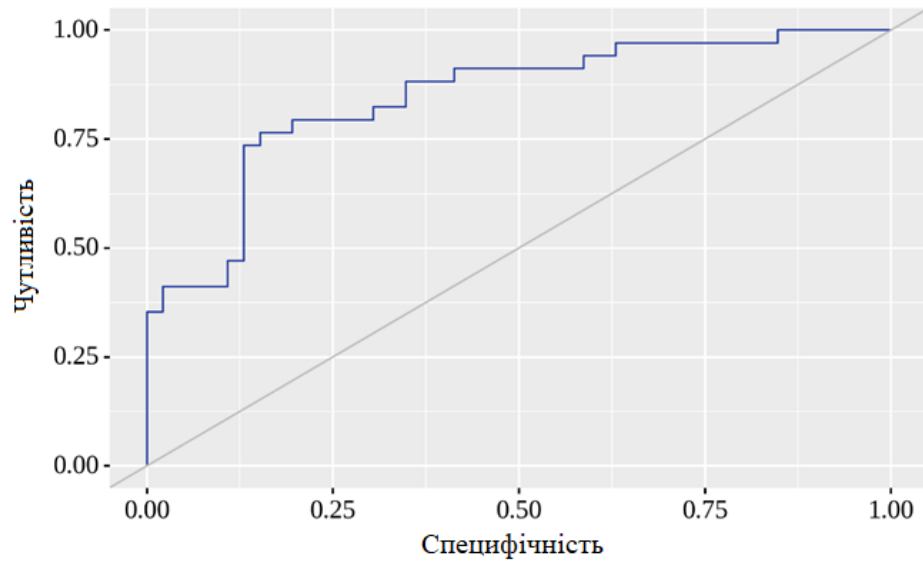


Рисунок 3.2 – ROC-крива, що характеризує залежність ймовірності варіантів (Дельта або Оміврон) від значення логістичної функції P

Граничне значення логістичної функції P становить 0,560, що відповідає найвищому значенню статистики J Юдена. Якщо логістична функція P більша або дорівнює цьому значенню, то прогнозується Дельта-варіант. Чутливість і специфічність методу становлять 76,5 % і 84,8 % відповідно (рис. 3.3).

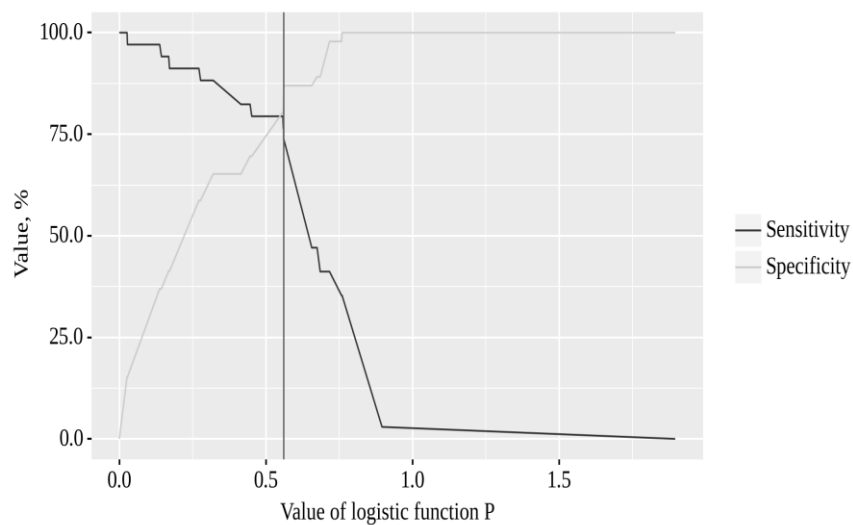


Рисунок 3.3 – Аналіз чутливості та специфічності прогнозу варіанту вірусу SARS-CoV-2 залежно від логістичної функції

3.2 Вплив метформіну та інсуліну на гематологічні показники у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2 типу

Серед 145 підтверджених пацієнтів середній вік становив $(62,66 \pm 12,96)$ років, 66 пацієнтів (45,5 %) були чоловіками.

Пацієнти з ЦД-2 були старші за пацієнтів без ЦД-2: $(53,66 \pm 13,37)$ років проти $(67,00 \pm 7,70)$ років ($p < 0,001$). За ступенем важкості при госпіталізації більшість пацієнтів без ЦД-2 була характеризується як середньої важкості (92,3%), тоді як у групі з ЦД-2 кількість таких пацієнтів складала 55 %. Група пацієнтів з ЦД-2 характеризувалася більшою кількістю осіб з важким і критичним перебігом ніж група пацієнтів без ЦД-2. Антибіотикотерапія була призначена 65 % з ЦД-2 та 44,6 % без ЦД-2 (табл. 3.4).

Під час госпіталізації 25 пацієнтів з ЦД-2 отримували метформін в ролі цукрознижуючої терапії. Пацієнти отримували метформін у стаціонарі з середньою дозою 1000 мг на добу [IQR 0,55-1,52]. Пацієнти, які приймали метформін, мали достовірно нижчий рівень СРП, ніж пацієнти, які використовували іншу цукрознижуючу терапію (24 мг/л [IQR 15 – 58] проти 52 мг/л [IQR 22-121], $p = 0,046$) (табл. 3.5; рис. 3.4).

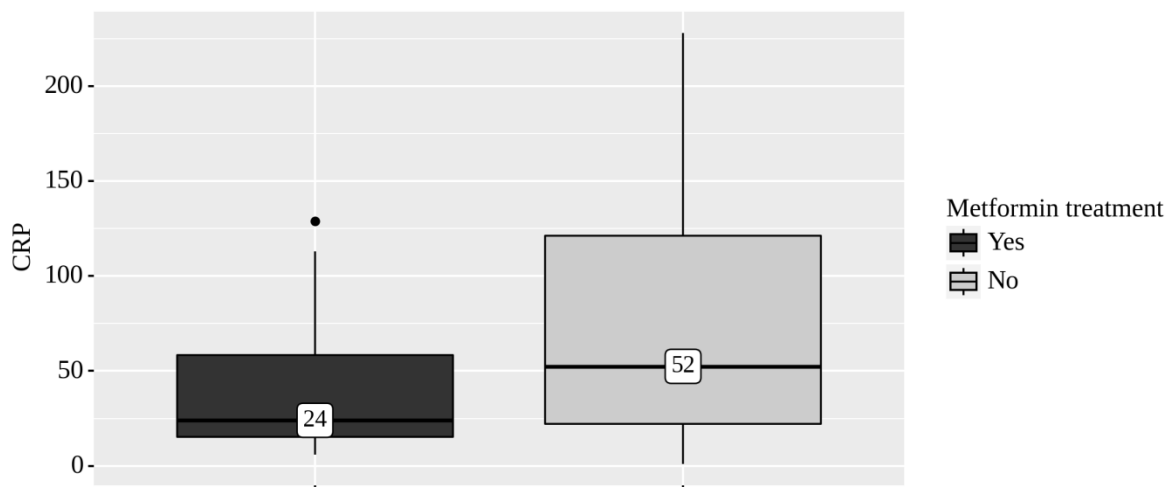


Рисунок 3.4 – Рівень СРП в залежності від гіпоглікемічної терапії

Таблиця 3.4 – Характеристика базових демографічних та клінічних особливостей між досліджуваними групами

| Показники | Без ЦД-2 | 3 ЦД-2 |
|--|---------------|--------------|
| | n = 65 | n = 80 |
| Вік (роки) | 53,66 ± 13,37 | 67,00 ± 7,70 |
| Чоловіча стать (n, %) | 46,10 % | 45,00 % |
| Коморбідні патології, при надходженні в медичний заклад (n, %) | | |
| Артеріальна гіпертензія | 8 (12,3 %) | 36 (45 %) |
| Інші серцево-судинні захворювання | 27 (41,5 %) | 66 (82,5 %) |
| Хронічна хвороба нирок | 8 (12,3 %) | 28 (35 %) |
| Ступінь важкості (n, %) | | |
| Легкий перебіг | - | - |
| Середньої важкості | 60 (92,3 %) | 44 (55 %) |
| Важкий перебіг | 4 (6,2 %) | 12 (15 %) |
| Критичний перебіг | 1 (1,5 %) | 24 (30 %) |

Таблиця 3.5 – Характеристики базових демографічних та клінічних особливостей злежно від цукрознижуючої терапії (ЦТ)

| Показники | Інша ЦТ | Метформін | p | Інша ЦТ | Інсулін | p |
|--|---------------|--------------------|-------|--------------|---------------------|---------|
| | n = 16 | n = 25 | | n = 10 | n = 35 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Добова доза | – | 1 (0,55 – 1,52) | – | - | 35 (28,2 – 50,3) | – |
| Вік (роки) | 58,67 ± 10,81 | 60,80 ± 12,56 | 0,518 | 52,67 ± 8,81 | 67,8 ± 9,26 | 0,038 |
| Чоловіча стать (n, %) | 7 (43,7 %) | 12 (48 %) | 0,657 | 6 (60 %) | 17 (48,5 %) | |
| Коморбідні патології, при надходженні в медичний заклад (n, %) | | | | | | |
| Артеріальна гіпертензія | 7 (43,7 %) | 7 (28 %) | 0,257 | 3 (30 %) | 9 (25,7%) | 0,436 |
| Інші серцево-судинні захворювання | 2 (12,5 %) | 4 (16 %) | 0,368 | 1 (10%) | 5 (14,2 %) | 0,813 |
| Хронічна хвороба нирок | 7 (43,7 %) | 7 (28 %) | 0,537 | 4 (40 %) | 10 (28,5%) | 0,251 |
| Гематологічні показники | | | | | | |
| Сироваткова глюкоза | 7 (5-14) | 10 (8-14) | 0,014 | 5 (4-8) | 14 (9-15) | < 0,001 |

Продовження таблиці 3.5

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|--------------|-------|
| Лейкоцити | 8 (6-12) | 9 (6-10) | 0,463 | 7 (5-11) | 9 (7-12) | 0,032 |
| Лімфоцити | 1 (1-1) | 1 (1-1) | 0,666 | 1 (1-2) | 1 (1-1) | 0,430 |
| Моноцити | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0,040 | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0,368 |
| Гранулоцити | 7 (5-11) | 7 (4-9) | 0,315 | 6 (4-8) | 9 (6—11) | 0,022 |
| Сироватковий креатинін | 102 (86-119) | 105 (90-124) | 0,644 | 102 (86-118) | 102 (87-127) | 0,647 |
| СРП | 52 (22-121) | 24 (15-58) | 0,046 | 40 (16-104) | 43 (18-100) | 0,846 |
| D-димер | 1 (0-3) | 1 (0-3) | 0,544 | 1 (0-3) | 2 (1-3) | 0,181 |
| Прокальцитонін | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0,660 | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0,340 |
| Особливості лікування | | | | | | |
| Антибіотикотерапія (n, %) | 13 (81,2 %) | 14 (56 %) | 0,486 | 8 (80%) | 25 (71,4%) | 0,587 |

Інсулінотерапію в медичному стаціонарі отримували 35 пацієнтів з COVID-19. Доза інсуліну у середньому склала 35,0 одиниць дії (ОД) на добу [IQR 28,2 – 50,3]. Пацієнти, котрі отримували інсулін мали достовірно вищу глікемію 14 ммоль/л, [IQR 9 -15] проти 5 ммоль/л [IQR 4 -8], $p < 0,001$ ніж ті пацієнти, котрі приймали іншу цукрознижуючу терапію. Пацієнти з інсулінотерапією мали вищі рівні лейкоцитів ($9 \times 10^9/l$, [IQR 7 -12] проти $7 \times 10^9/l$ [IQR 5 -11], $p = 0,032$) та гранулоцитів, ніж пацієнти, котрі приймали іншу гіпоглікемічну терапію ($9 \times 10^9/l$, [IQR 6 -11] проти $6 \times 10^9/l$ [IQR 4 -8], $P = 0,022$).

Підсумовуючи результати цього розділу, можна зробити такі висновки:

1. Пацієнти з ЦД-2 у групі варіанту Дельта мали достовірно вищі рівні лейкоцитів та лімфоцитів, ніж пацієнти без ЦД-2. Між пацієнтами з ЦД-2 та без ЦД-2 у групі з варіантом Оміврон не було виявлено достовірної різниці між основними досліджуваними гематологічними показниками.

2. При порівнянні пацієнтів з ЦД-2 між групами з варіантами Дельта та Оміврон, встановлено достовірні відмінності між рівнями прокальцитоніну та моноцитів.

3. Розроблено математичну модель з використанням бінарної логістичної регресії для прогнозування приналежності до типу варіанту Дельта або Оміврон на основі гематологічних показників. Ця модель є статистично значущою та має високий рівень чутливості (76,5 %) та специфічності (84,8 %).

4. Пацієнти, котрі отримували метформін, в ролі цукрознижуючої терапії мали достовірно нижчий рівень СРП. Використання інсуліну було пов'язане з вищими рівнями лейкоцитів та гранулоцитів периферійної крові.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в наукових працях автора [159-161].

РОЗДІЛ 4

КИШКОВА МІКРОБІОТА ПРИ КОРОНАВІРУСНІЙ ХВОРОБІ 2019 ТА ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ

4.1 Систематичний огляд ролі метформіну у модуляції кишкової мікробіоти

4.1.1 Відбір досліджень

Первинно було переглянуто 2301 документ різного типу, а після відбору та оцінки до остаточного аналізу було включено 13 досліджень (рис. 4.1). Більшість досліджень були опубліковані в 2017 році або пізніше, а тривалість лікування метформіном варіювалася від кількох днів до кількох місяців. З 13 досліджень шість із них (46,15 %) були рандомізованими контрольованими дослідженнями, тоді як решта сім досліджень (53,8 %) включали або вперше виявлений, або маніфестний ЦД-2 [134, 138, 142, 149, 162-164]. Іншими учасниками досліджень були особи з ожирінням [165-167], здорові учасники [139, 141] та пацієнти з гестаційним цукровим діабетом [168] (табл. 4.1).

4.1.2 Методи аналізу складу кишкової мікробіоти

У всіх дослідженнях, включених до аналізу, зразки фекалій збирали та аналізували на склад кишкової мікробіоти. Серед різних методів, що використовувалися для аналізу, було виявлено, що секвенування 16S рРНК є найпоширенішим методом (табл. 4.1).

4.1.3 Ризик упередженості

У відібраних рандомізованих дослідженнях два дослідження мали високий ризик упередженості в результативності, виявленні та відсіві. Чотири дослідження мали незрозумілі ризики в більшості сфер. Серед квазі-експериментальних досліджень три мали низький ризик упередженості в усіх

сферах, тоді як одне мало серйозний ризик упередженості щодо заплутування (змішуючі фактори), відбору учасників та класифікації втручань. Усі три перехресні дослідження мали серйозний ризик упередженості в кількох сферах, включаючи плутанину (змішуючі фактори), відбір учасників та класифікацію втручань (рис. 4.2–4.4).

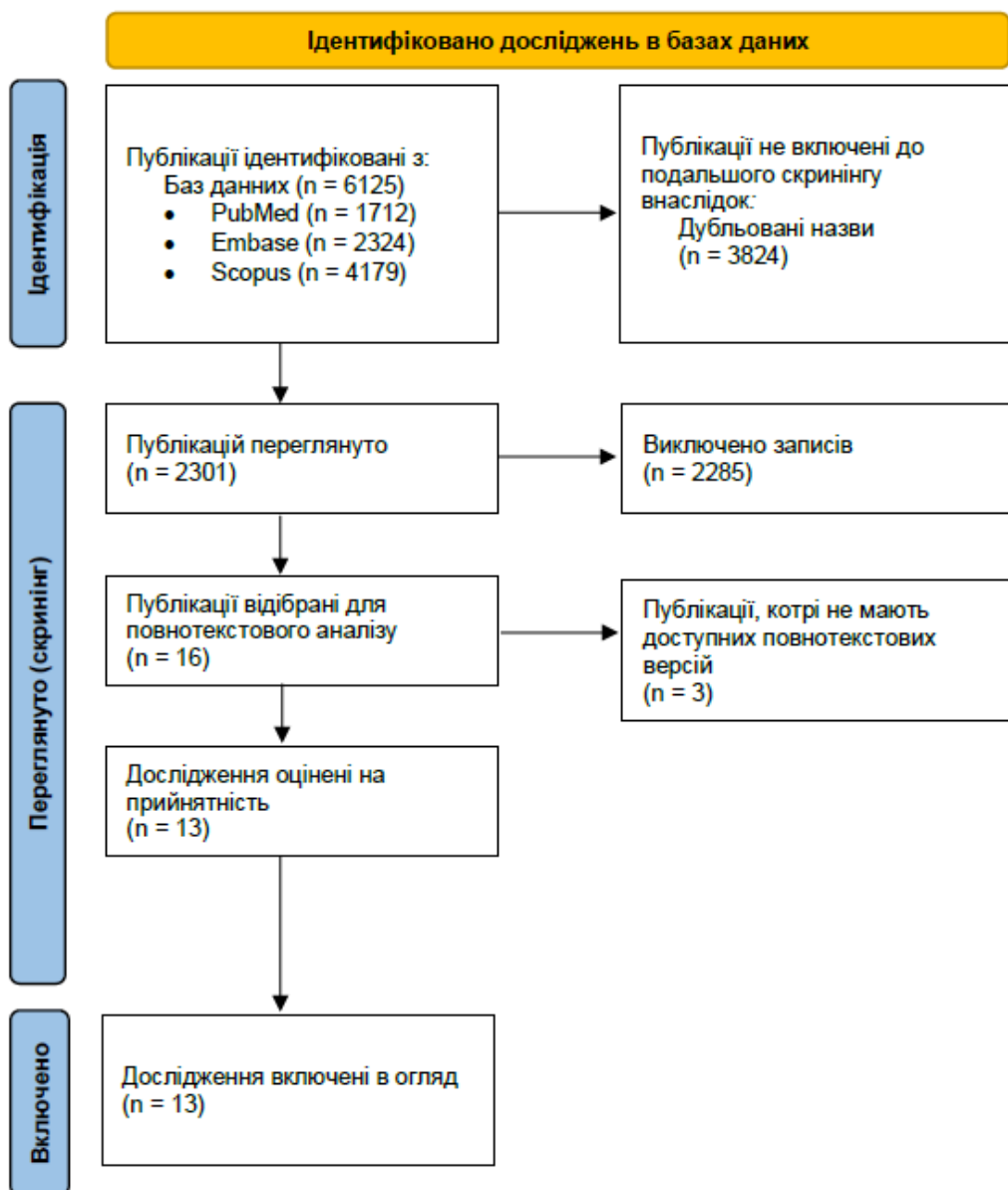


Рисунок 4.1 – Блок-схема PRISMA 2020

Таблиця 4.1 – Опис досліджень, котрі ввійшли в систематичний огляд

| Автор, рік | Дизайн дослідження | Країна походження учасників | Учасники | Кількість учасників | Дозування метформіну | Тривалість прийому | Метод аналізу |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Ejtahed et al., 2019 [165] | Рандомізоване дослідження | Іран | Ожиріння | 20/16 | 1000 мг | 2 місяці | 16S rRNA |
| Tong et al., 2018 [162] | Рандомізоване дослідження | КНР | Вперше виявлений ЦД-2 | 100/100 | 750 мг | 2 тижнів | 16S rRNA V3–V4 region |
| Wu et al., 2017 [138] | Рандомізоване дослідження | ЄС | Вперше виявлений ЦД-2 | 22/18 | 425–1700 мг | 4 місяці | DNA shotgun metagenomics |
| Bryrup et al., 2019 [141] | Квазіекспериментальне дослідження | ЄС | Здорові | 25 | 500–2000 мг | 6 тижнів | 16S rRNA V4 region |
| Sun et al., 2018 [163] | Квазіекспериментальне дослідження | КНР | Вперше виявлений ЦД-2 | 22 | 2000 мг | 3 дні | DNA metagenomics |
| Elbere et al., 2018 [139] | Квазіекспериментальне дослідження | ЄС | Здорові | 18 | 1700 мг | 7 днів | 16S rRNA V3 region |
| Napolitano et al., 2014 [134] | Квазіекспериментальне дослідження | Сполучене Королівство | Маніфестний ЦД-2 | 14/14 | Стандартну, визначену лікарем дозу | Не має даних | 16S rRNA V1, V2, V3 regions |
| Barengolts et al., 2018 [164] | Перехресне дослідження | США | Маніфестний ЦД-2 | 25/16 | Стандартну визначену лікарем дозу | Не має даних | 16S rRNA V3–V4 region |

Продовження таблиці 4.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---------------------------|---------------------|--|----------|------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| De La Cuesta-Zuluaga et al., 2017 [149] | Перехресне дослідження | Республіка Колумбія | Маніфестний ЦД-2 | 14/14 | Стандартну, визначену лікарем дозу | Не має даних | 16S rRNA V4 region |
| Forslund et al., 2015 [142] | Перехресне дослідження | ЄС | Маніфестний ЦД-2 | 58/17 | Стандартну, визначену лікарем дозу | Не має даних | 16S rDNA shotgun metagenomics |
| Noel T Mueller et al., 2021 [166] | Рандомізоване дослідження | США | Дорослі з надмірною вагою або ожирінням з діагнозом зляканої солідної пухлини в анамнезі | 42/39/40 | 2000 мг | 1 рік | DNA metagenomics |
| María Molina-Vega et al., 2021 [168] | Рандомізоване дослідження | ЄС | Гестаційний ЦД | 30/28 | 850 мг | Впродовж вагітності | 16S rRNA |
| Belén Pastor-Villaescusa et al., 2021 [167] | Рандомізоване дослідження | ЄС | Діти з ожирінням | 15/18 | 1000 мг | 6 місяців | Metagenomic analysis |

| Study | Risk of bias | | | | | | Overall |
|---------------------------------------|--------------|----|----|----|----|----|---------|
| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | |
| Ejtahed et al., 2019 | + | - | + | - | + | + | - |
| Tong et al., 2018 | + | + | X | X | X | + | X |
| Wu et al., 2017 | + | - | + | X | + | + | X |
| Noel T Mueller et al., 2021 | - | - | - | - | + | - | - |
| María Molina-Vega et al., 2021 | - | - | X | + | + | + | + |
| Belén Pastor-Villaescusa et al., 2021 | + | - | + | - | + | - | - |

D1: Random sequence generation (Selection bias)
 D2: Allocation concealment (Selection bias)
 D3: Blinding of participants and personnel (Performance bias)
 D4: Blinding of outcome assessment (Detection bias)
 D5: Incomplete outcome data (Attrition bias)
 D6: Selective reporting (Reporting bias)

Judgement
 X High
 - Unclear
 + Low

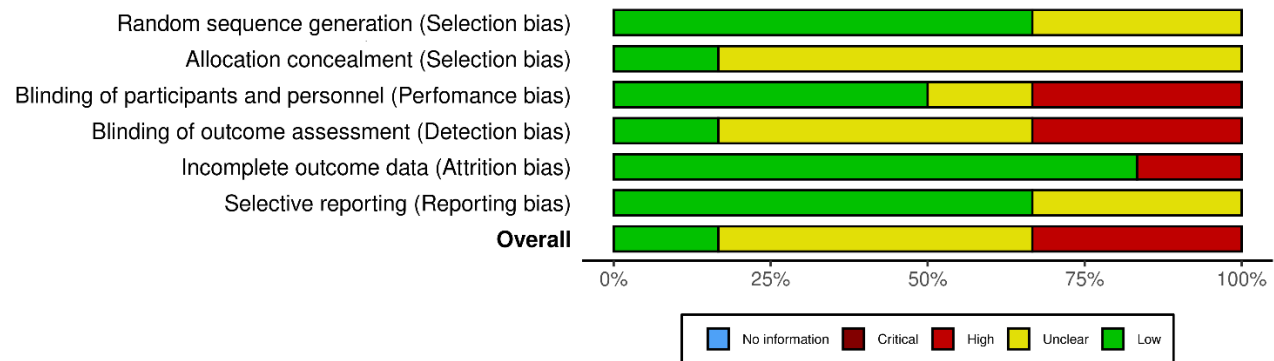


Рисунок 4.2 – Аналіз ризику упередженості у відібраних дослідженнях

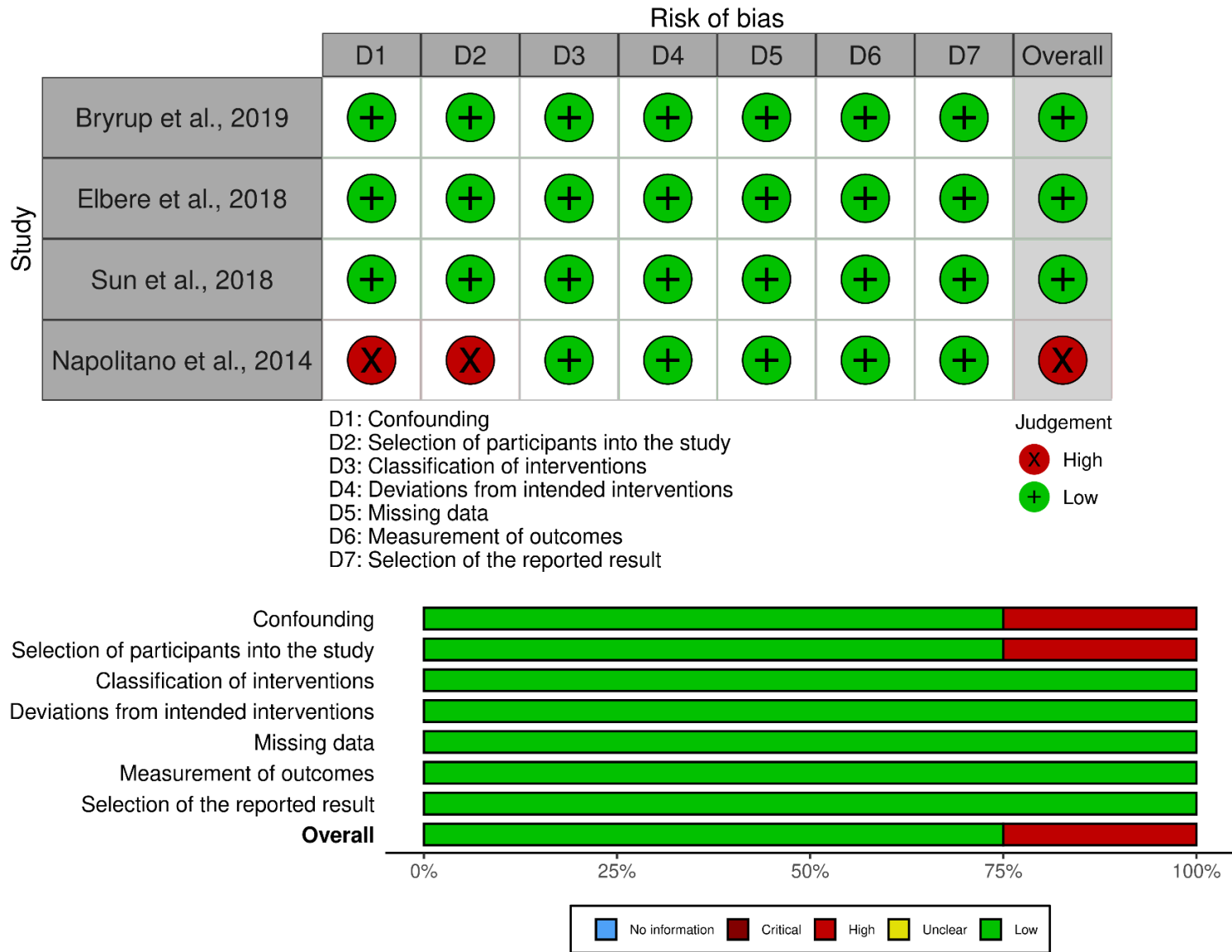


Рисунок 4.3 – Аналіз ризику упередженості у відібраних дослідженнях

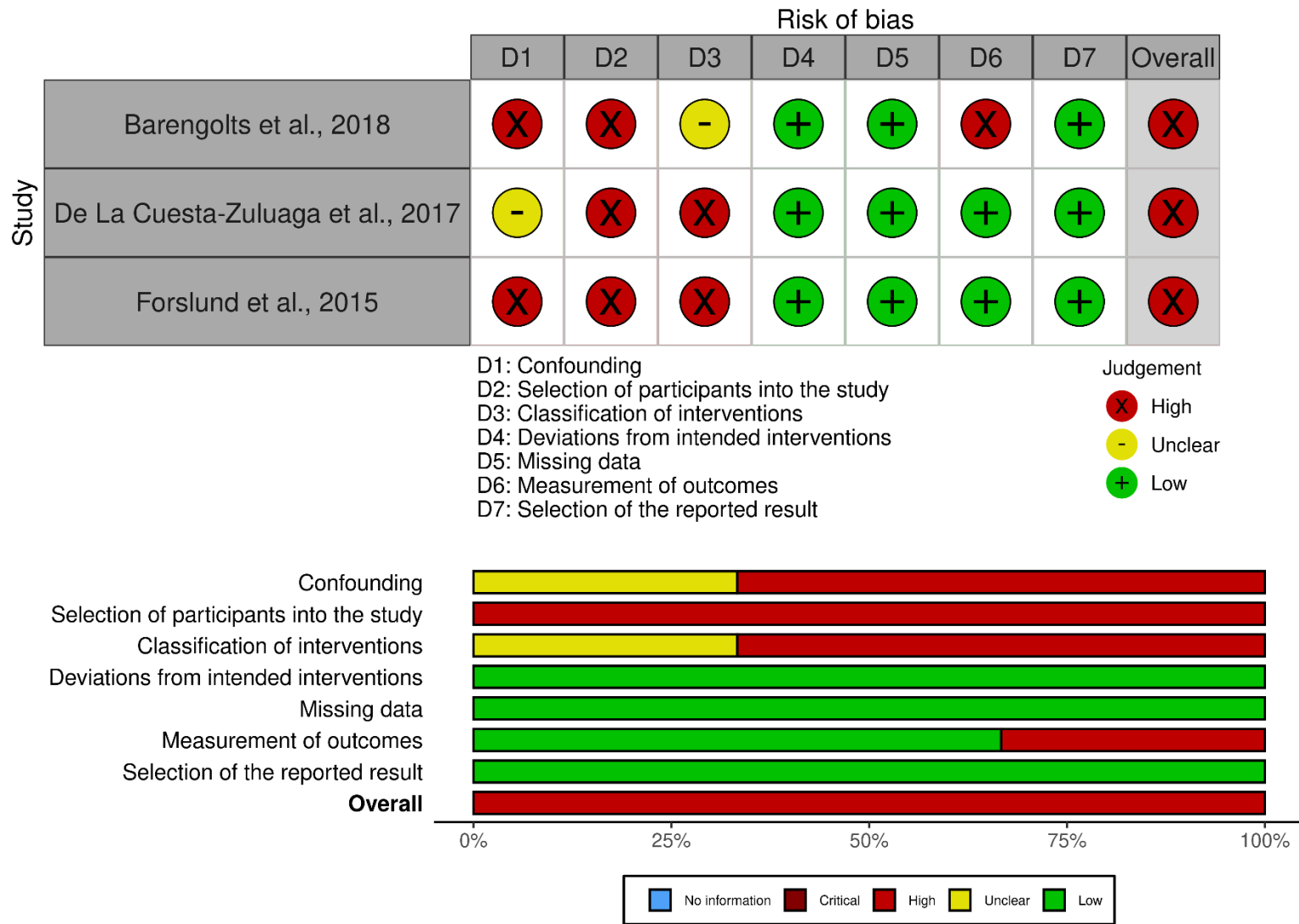


Рисунок 4.4 – Аналіз ризику упередженості у відібраних дослідженнях

4.1.4 Зміни кишкової мікробіоти на рівні бактеріальних родів та відділів, спричинені прийомом метформіну

До цього систематичного огляду було включено тринадцять досліджень для вивчення впливу метформіну на мікробіоту кишківника. Загалом застосування метформіну було пов'язане зі зміною чисельності кількох бактеріальних родів (рис. 4.5).

У відділі *Bacteroidetes* чисельність роду *Bacteroides* збільшилася в одному дослідженні [165] і зменшилася в іншому [162, 163], тоді як чисельність *Parabacteroides* збільшилася тільки в одному дослідженні [164]. Кількість *Alistipes* зменшилася в одному дослідженні [162], тоді як *Prevotella* зменшилася в одному дослідженні [165] і збільшилася в іншому [149].

У відділі *Firmicutes* кількість бактерій роду *Bacillus* зменшилася в одному дослідженні [167], тоді як кількість *Blautia* [162, 165] і *Butyrivibrio* [149, 165] збільшилася. Кількість *Faecalibacterium* зменшилася в одному дослідженні [165], тоді як кількість *Ruminococcus* збільшилася в одному дослідженні [166]. Кількість *Streptococcus* збільшилася в одному дослідженні [165], тоді як кількість *Oscillibacter* [162] і *Lactobacillus* зменшилася в одному дослідженні [165]. Кількість *Catenibacterium* збільшилася в одному дослідженні [164], тоді як кількість *Clostridium* зменшилася у двох дослідженнях [139, 141], а кількість бактерій роду *Intestinibacter* – у чотирьох дослідженнях [141, 142, 165, 166]. В одному дослідженні [166] кількість *Roseburia* зменшилася, а в іншому – збільшилася [165].

У відділі *Proteobacteria* кількість *Escherichia* зросла у двох дослідженнях [142, 166]. У відділі *Actinobacteria* одне дослідження засвідчило про зменшення цього відділу [167], тоді як кількість *Adlercreutzia* збільшилася в одному дослідженні [134], і кількість *Bifidobacterium* збільшилася в одному дослідженні [149].

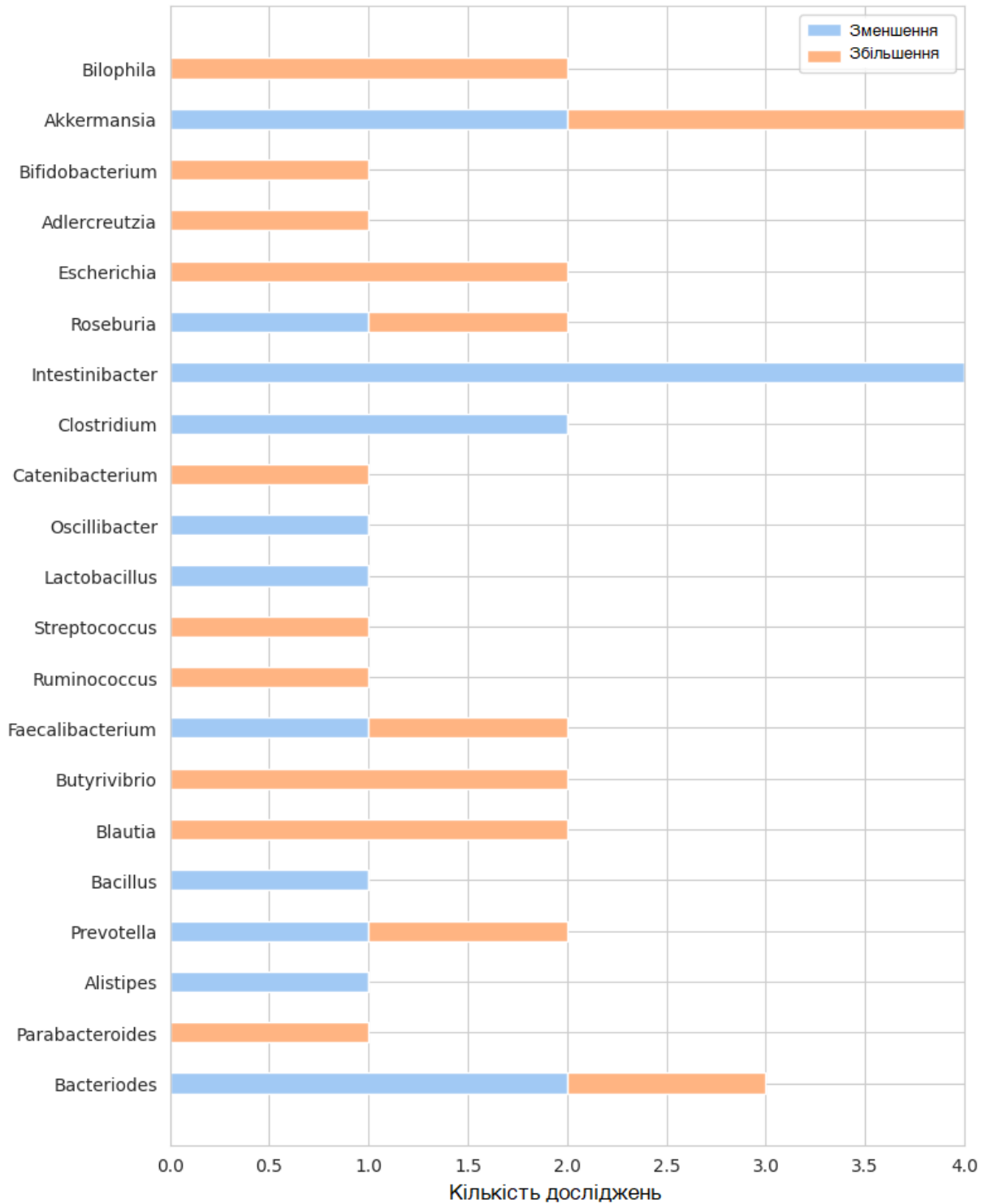


Рисунок 4.5 – Вплив метформіну на бактеріальна таксони кишкової мікробіоти

У відділі *Verrucomicrobia* кількість бактерій роду *Akkermansia* зменшилася у двох дослідженнях [162, 165] і збільшилася у двох

дослідженнях [138, 149], тоді як у відділі *Thermodesulfobacteriota* кількість *Bilophila* збільшилася у двох дослідженнях [138, 141].

4.1.5 Вплив метформіну на різноманітність кишкової мікробіоти

Вплив метформіну на різноманітність кишкової мікробіоти вивчався в різних дослідженнях (табл. 4.2). Серед досліджень, проведених на здорових людях, Elbere та ін. [139] повідомили про значне зменшення різноманітності мікробіоти кишечника через 24 години після прийому метформіну, використовуючи секвенування області V3 16S рРНК та індекс Шеннона. І навпаки, Вругур та ін. [141] не виявили значних змін у багатстві, рівномірності та різноманітності мікробіоти кишечника у відповідь на лікування метформіном.

У пацієнтів з ожирінням Ejtahed et. al. [165] не виявили значних змін в альфа- або бета-різноманітності, але повідомили про негативну кореляцію індексу Сімпсона з ІМТ, об'ємом талії, рівнем інсуліну та індексом НОМА, що вказує на потенційні метаболічні зв'язки.

Щодо пацієнтів із уперше діагностованим ЦД-2, Tong et. al. [162] повідомили про збільшення різноманітності, виміряне індексом Chao1 на основі секвенування ділянок V3-V4 16S рРНК, в той час як Sun et. al. [163] спостерігали незначне зменшення альфа-різноманітності.

Varengolts et. al. [164] показали тенденцію до збільшення різноманітності при лікуванні метформіном, а La Cuesta-Zuluaga et. al. [149] не виявили суттєвих відмінностей в індексах різноманітності між тими, хто приймав метформін, та тими, хто його не приймав.

У дослідженні Noel T Mueller et. al. [166] було повідомлено про відсутність змін у індексі Шеннона. María Molina-Vega et. al. [168] виявили нижчу філогенетичну різноманітність у групі метформіну порівняно з контрольною групою, а Belén Pastor-Villaescusa et. al. [167] не виявили суттєвих відмінностей в індексах різноманітності або бета-різноманітності.

Таблиця 4.2 – Дослідження, котрі вивчали роль метформіну на різноманітність кишкової мікробіоти

| Дослідження | Індекси чи показники різноманіття | Висновки |
|-------------------------------|---|--|
| 1 | 2 | 3 |
| Ejtahed et al., 2019 [165] | Індекс Сімпсона | Негативна кореляція індексу Сімпсона з ІМТ, об'ємом талії, рівнем інсуліну та НОМА. Метформін не впливає на мікробне різноманіття кишечника. |
| Tong et al., 2018 [162] | Індекс Сімпсона та Chao1 | Метформін збільшував різноманітність (за індексом Chao1). |
| Wu et al., 2017 [138] | Немає даних | Немає даних |
| Bryrup et al., 2019 [141] | Багатство, рівномірність, різноманітність | Метформін не впливає на багатство, рівномірність або різноманітність мікробіоти кишечника. |
| Sun et al., 2018 [163] | Індекс Шеннона | Незначне зменшення альфа-різноманіття після лікування метформіном |
| Elbere et al., 2018 [139] | Індекс Шеннона, NMDS | Значне зменшення різноманітності мікробіоти кишечника через 24 години після прийому метформіну |
| Napolitano et al., 2014 [134] | Аналіз бета-розмаїття | Мікрофлора кишечника є індивідуальною для кожного пацієнта. Специфічного впливу метформіну не виявлено |
| Barengolts et al., 2018 [164] | Індекс Шеннона | Тенденція до збільшення різноманітності. Немає відмінностей щодо бета-різноманіття |

Продовження таблиці 4.2

| 1 | 2 | 3 |
|---|--|---|
| De La Cuesta-Zuluaga et al., 2017 [149] | Оцінки бета-різноманітності | Немає значущих відмінностей, окрім відмінностей між пацієнтами, які приймають метформін, та тими, хто його не приймає |
| Forslund et al., 2015 [142] | Немає даних | Немає даних |
| Noel T Mueller et al., 2021 [166] | Індекс Шеннона, багатство метагеномних функціональних шляхів | Немає змін у різноманітності Шеннона, але збільшилося багатство метагеномних шляхів при застосуванні метформіну |
| María Molina-Vega et al., 2021 [168] | Філогенетичне різноманіття | Група, котра приймала метформін, мала нижчу філогенетичну різноманітність порівняно з групою, котра приймала інсулін |
| Belén Pastor-Villaescusa et al., 2021 [167] | Альфа-індекси та бета-різноманіття | Не виявлено суттєвих відмінностей у різноманітності, індексі Сімпсона, зворотному індексі Сімпсона, рівномірності або бета-різноманітності між групами плацебо та метформіну. Тенденція до вищого альфа-індексу та видового багатства в групі метформіну (не статистично значуща) |

4.2 Вплив прийому метформіну та антибіотикотерапії на зміни кишкової мікробіоти у пацієнтів з COVID-19

З метою дослідження особливостей кишкової мікробіоти було обстежено чотири групи пацієнтів (загальна кількість пацієнтів складала 128 осіб), а саме: 1) групу пацієнтів з варіантами Дельта (n = 42) або Омікрон (n = 86); 2) групу пацієнтів з COVID-19 без ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію (n = 58) або не приймали антибактеріальну терапію (n = 70); 3) групу пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 (n = 45) або без ЦД-2 (n = 83); 4) група пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію та лікування метформіном (n = 22) та пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі не приймали антибактеріальну терапію, але продовжували лікування метформіном (n = 12). Для всіх груп досліджено стан кишкової мікробіоти. Середній вік пацієнтів склав 55,5 років (IQR (interquartile range) 51,25 – 60,00). Серед них чоловіки – 72 (56,3 %), жінки – 56 (43,4 %). За віковими та статевими ознаками статистичної відмінності між пацієнтами в групах не було. Пацієнти були ознайомлені з методиками та метою дослідження, а також надали інформовану згоду на участь у дослідженні. Результати дослідження особливостей кишкової мікробіоти наведено на рис. 4.6–4.9.

У ході нашого дослідження виявлено, що у пацієнтів, інфікованих в період домінування варіанту Омікрон, спостерігалось значне збільшення чисельності певних родів кишкових бактерій порівняно з пацієнтами, інфікованими Дельта-варіантом. Зокрема, було виявлене статистично значуще зростання родів *Bifidobacterium* (p<0,001), *Bacteroides* (p<0,05), *Klebsiella* (p<0,001), *Enterobacter* (p<0,05) та *Lactobacillus* (p<0,05) у групі пацієнтів, інфікованих в період домінування варіанту Омікрон. Натомість, у пацієнтів, інфікованих у період домінування Дельта варіанту, спостерігалось

значне збільшення родів *Clostridium* ($p < 0,001$), *Enterococcus* ($p < 0,001$) та *Candida* ($p < 0,05$) (рис. 4.6).

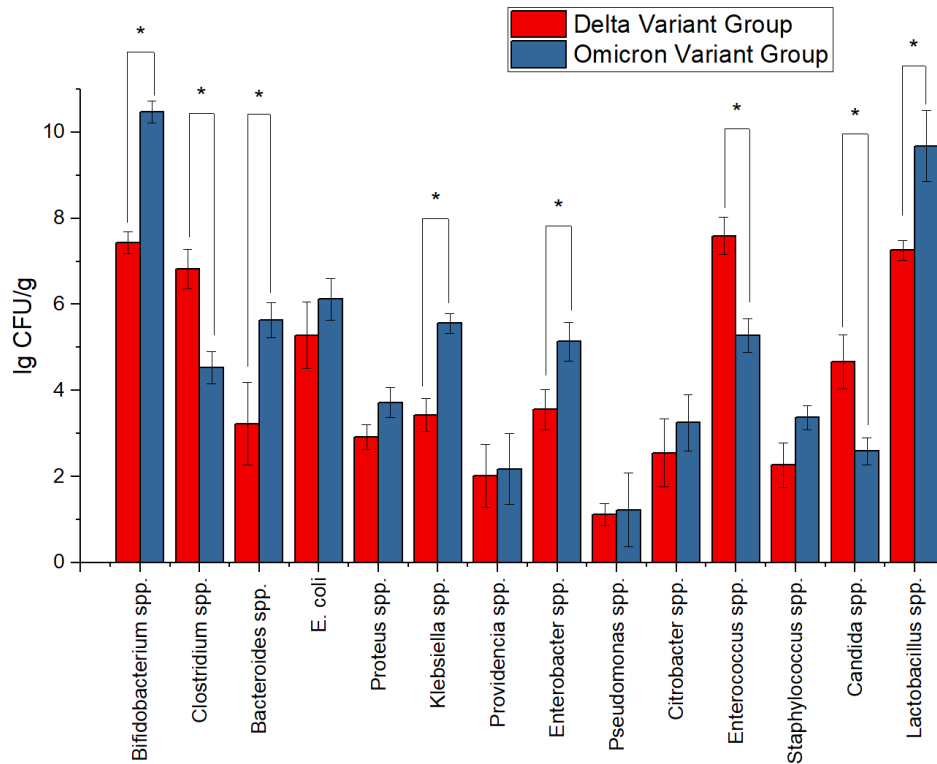


Рисунок 4.6 – Склад кишкової мікробіоти пацієнтів з COVID-19 (варіант Дельта або Омікрон), де * – різниця достовірна ($p < 0,05$)

Також наші результати показали, що в групі пацієнти з COVID-19, котрі отримували антибактеріальну терапію, спостерігалось статистично значне збільшення родів *Enterococcus* ($p < 0,001$), *Candida* ($p < 0,05$) та *Clostridium* ($p < 0,001$). Натомість, у пацієнтів з COVID-19, які не отримували антибактеріальних лікарських засобів, визначалась достовірно вища кількість бактерій родів *Proteus* ($p < 0,001$), *Klebsiella* ($p < 0,001$), *Citrobacter* ($p < 0,05$), *Staphylococcus* ($p < 0,001$), *Lactobacillus* ($p < 0,001$) та *Bacteroides* ($p < 0,001$) (рис. 4.7).

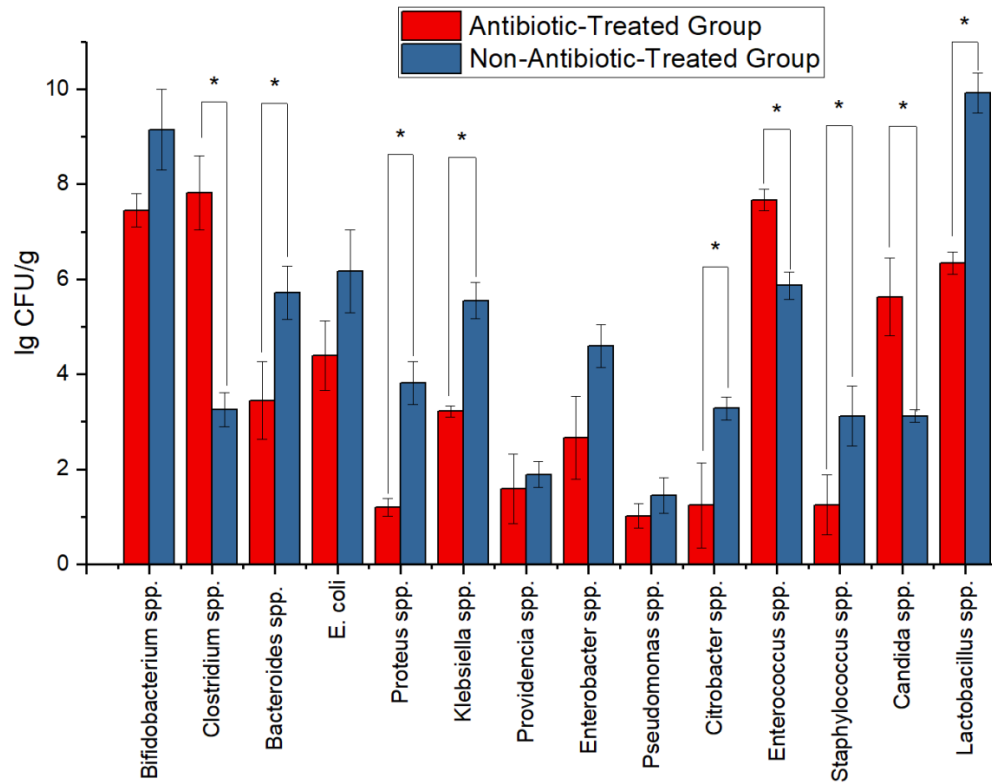


Рисунок 4.7 – Склад кишкової мікробіоти пацієнтів в залежності від прийому антибактеріальної терапії, де * – різниця достовірна ($p < 0,05$)

Крім того, було виявлено, що у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 спостерігалось зниження кількості *Bifidobacterium* spp. ($p < 0,001$) та *Lactobacillus* spp. ($p < 0,001$) і збільшення кількості грибів роду *Candida* ($p < 0,001$) порівняно з пацієнтами, котрі не мали ЦД-2 (рис. 4.8).

Наше дослідження також показало, що пацієнти з ЦД-2 та COVID-19, які отримували метформін без антибіотикотерапії, мали статистично значуще збільшення родів *Bacteroides* ($p < 0,001$), *Lactobacillus* ($p < 0,001$) та кишкової палички ($p < 0,001$), а також статистично достовірне зменшення родів *Clostridium* ($p < 0,001$) та *Enterococcus* ($p < 0,001$) порівняно з групою, котра отримувала антибактеріальну терапію (рис. 4.9).

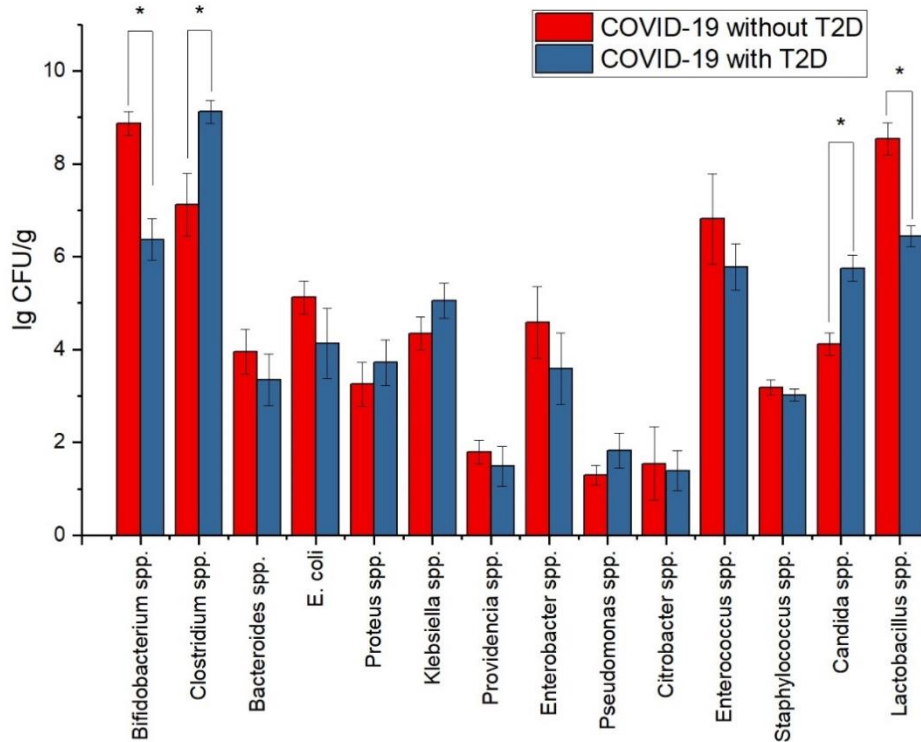


Рисунок 4.8 – Склад кишкової мікробіоти пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, де * – різниця достовірна ($p < 0,05$)

Дослідження також виявило позитивний кореляційний зв'язок між чисельністю бактерій родів *Klebsiella* ($r=0,68$, $p=0,002$), *Enterococcus* ($r=0,84$, $p=0,005$) і рівнем СРП у пацієнтів з COVID-19 без ЦД-2. Також було виявлено, негативний кореляційний зв'язок між рівнем СРП та чисельністю *Bifidobacterium* spp. ($r=-0,62$, $p=0,032$).

Також, чисельність бактерій родів *Clostridium* ($r=0,62$, $p=0,022$), *Klebsiella* ($r=0,61$, $p=0,024$), *Enterococcus* ($r=0,65$, $p=0,043$) та дріжджеподібних грибів роду *Candida* ($r=0,65$; $p=0,043$) позитивно корелювали з кількістю ліжко-днів, тоді як кількість *Bifidobacterium* spp. негативно корелювала з цим показником ($r=-0,65$, $p=0,045$).

Крім зазначених вище результатів, також було досліджено кореляційний зв'язок між чисельністю певних представників кишкової мікробіоти та СРП і кількістю ліжко-днів у пацієнтів із COVID-19 і ЦД-2.

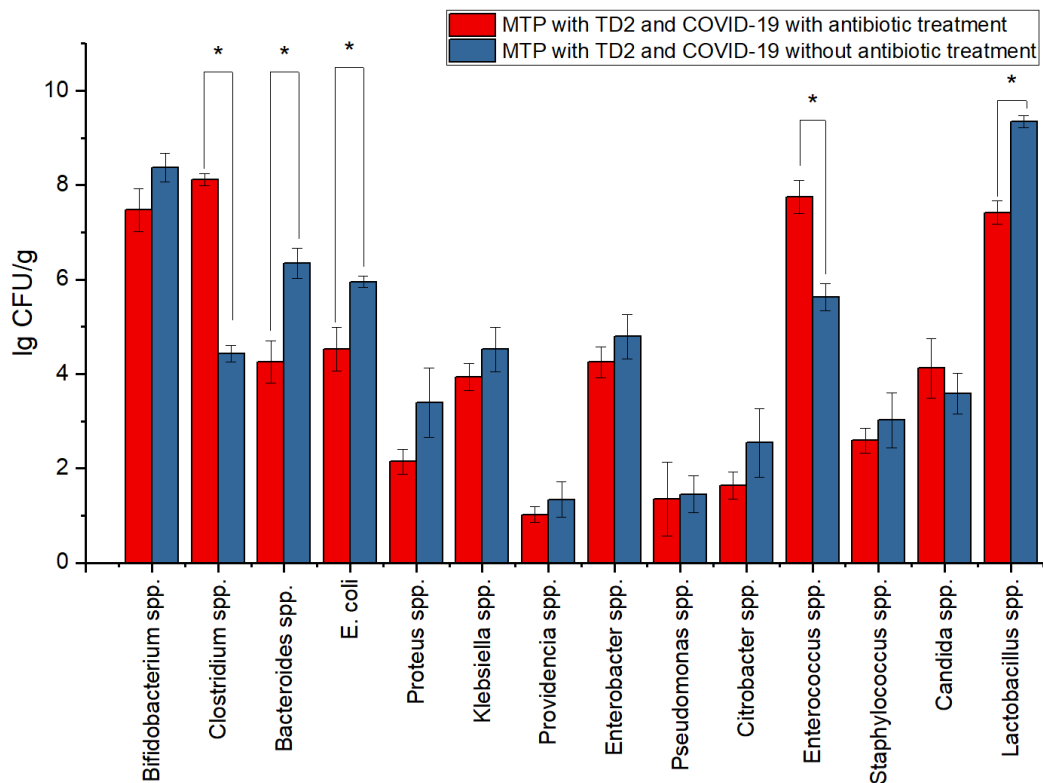


Рисунок 4.9 – Склад кишкової мікробіоти пацієнтів з COVID-19, котрі приймали метформін з/без антибіотикотерапії, де * – різниця достовірна ($p < 0,05$)

Отримані результати показали, що у цій групі пацієнтів було виявлено позитивний кореляційний зв'язок між кількістю *Clostridium* spp. ($r=0,66$, $p=0,038$), *Klebsiella* spp. ($r=0,75$, $p=0,003$), *Enterococcus* spp. ($r=0,88$, $p<0,001$), *Candida* spp. ($r=0,82$, $p=0,002$) та рівнем СРП, а також негативний кореляційний зв'язок із кількістю *Bifidobacterium* spp. ($r=-0,75$, $p=0,028$) та *Lactobacillus* spp. ($r=-0,62$, $p=0,032$). Також чисельність *Klebsiella* spp. ($r=0,72$, $p=0,022$), *Enterococcus* spp. ($r=0,87$, $p<0,001$) та *Candida* spp. ($r=0,74$, $p=0,005$) позитивно корелювала з кількістю ліжко-днів, а чисельність *Bifidobacterium* spp. ($r=-0,72$, $p=0,007$) мала негативний зв'язок з цим показником (рис. 4.10).

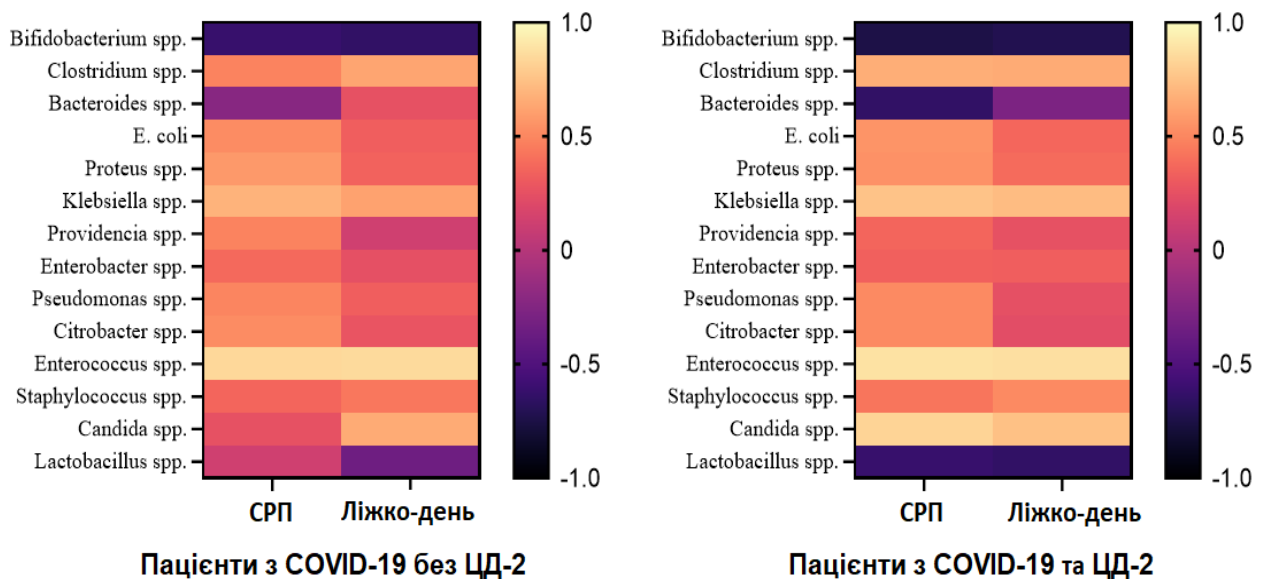


Рисунок 4.10 – Теплова діаграма коефіцієнтів кореляції між чисельністю певних таксономічних одиниць, рівнями СРП та кількості ліжко-днів

4.3 Вплив лікування метформіном та антибіотикотерапії на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти

З метою дослідження особливостей альфа-різноманіття кишкової мікробіоти було обстежено чотири групи пацієнтів (загальна кількість пацієнтів складала 120 осіб), а саме: 1) групу пацієнтів з варіантами Дельта ($n = 15$) або Омікрон ($n = 15$); 2) групу пацієнтів з COVID-19 без ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію ($n = 15$) або не приймали антибактеріальну терапію ($n = 15$); 3) групу пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 ($n = 15$) або без ЦД-2 ($n = 15$); 4) групу пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію та лікування метформіном ($n = 15$) та пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі не приймали антибактеріальну терапію, але продовжували лікування метформіном ($n = 15$). Для всіх груп розраховано індекси альфа-різноманіття Simpson $1/D$ та Shannon H' .

Середній вік пацієнтів склав ($54,1 \pm 9,5$) років. Серед них чоловіки – 48,3 %, жінки – 51,7 % (табл. 4.3). Вік пацієнтів різнився в досліджуваних

групах. Середній вік пацієнтів, що не отримувала антибактеріальної терапії, був значно менший та становив ($43,6 \pm 9,7$) років порівняно з пацієнтами, котрі отримували антибактеріальну терапію, – ($55,3 \pm 11,8$) років. Пацієнти з ЦД-2 та COVID-19 також були старшими ніж без ЦД-2, середній вік їх становив ($61,5 \pm 8,0$) років. Розподіл за статтю був подібним у всіх досліджуваних групах, без суттєвих відмінностей між чоловіками та жінками. Загалом досліджувана популяція була репрезентативною. Пацієнти були ознайомлені з метою і методиками дослідження та надали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Таблиця 4.3 – Статевий та віковий розподіл пацієнтів у розрізі досліджуваних груп

| Група | Вік | Чоловіки, % | Жінки, % |
|---|-----------------|-------------|----------|
| Група варіанту Оміврон | 56.7 ± 4.9 | 46.6 | 53.4 |
| Група варіанту Дельта | 55.1 ± 11.4 | 53.4 | 46.6 |
| Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію | 55.3 ± 11.8 | 46.6 | 53.4 |
| Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2, котрі не приймали антибактеріальну терапію | 43.6 ± 9.7 | 40.0 | 60.0 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 | 61.5 ± 8.0 | 53.4 | 46.6 |
| Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2 | 55.4 ± 5.0 | 53.4 | 46.6 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали антибактеріальну терапію та лікування метформіном | 55.2 ± 5.4 | 53.4 | 46.6 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін, проте не приймали антибактеріальну терапію | 50.1 ± 6.6 | 40.0 | 60.0 |

Для порівняння індексів альфа-різноманітності Shannon H' та Simpson $1/D$ між вісьмома групами було використано тест Крускала-Уолліса. Результати показали значні відмінності між групами як за індексом Shannon H' ($\chi^2 = 45,3$, $df = 9$, $p < 0,001$, $\varepsilon^2 = 0,381$), так і за індексом Simpson $1/D$ ($\chi^2 = 57,3$, $df = 9$, $p < 0,001$, $\varepsilon^2 = 0,482$).

Індекс Shannon H' не був достовірно відмінний між групами варіантів Дельта і Оміврон ($W = 0,588$; $p = 1,000$). Група, яка отримувала антибактеріальну терапію, мала значно нижчу різноманітність ($W = 5,995$; $p < 0,001$) порівняно з групою, яка не отримувала антибіотиків. Однак не було виявлено достовірної різниці в індексі Shannon H' ($p = 0,544$) між пацієнтами з COVID-19 та ЦД-2, і без нього, а це свідчить про те, що наявність ЦД-2 може несуттєво впливати на альфа-різноманітність у пацієнтів з COVID-19 і ЦД-2. Достовірні відмінності спостерігалися ($W = 5,017$, $p = 0,014$) між групами пацієнтів з ЦД-2 та COVID-19, котрі приймали антибактеріальну терапію і лікування метформіном, або ж не приймали антибактеріальну терапію. Було виявлено статистично значущу різницю між індексом Simpson $1/D$ ($W = 5,913$; $p < 0,001$) у групах, які приймали та не приймали антибактеріальної терапії. Також встановлено, що пацієнти без ЦД-2 мали достовірно вищий індекс Simpson $1/D$, ніж пацієнти з ЦД-2 ($W = -5,352$; $p = 0,006$). Пацієнти, котрі приймали метформін без антибактеріальної терапії, мали достовірно вищий індекс Simpson $1/D$, ніж ті, котрі приймали антибактеріальну терапію ($p = 0,006$).

У нашому дослідженні ми провели також кореляційний аналіз між індексами альфа-різноманітності та кількістю ліжко-днів, СРП та НЛС. Для аналізу даних була використана рангова кореляція Спірмена, а результати представлені в кореляційній матриці (рис. 4.11).

Індекс Shannon H' показав значну позитивну кореляцію з індексом Сімпсона $1/D$ ($r = 0,717$, $p < 0,001$). Крім того, була виявлена значна негативна кореляція між індексом Shannon H' та всіма трьома

досліджуваними параметрами: кількістю ліжко-днів ($r = -0,563$, $p < 0,001$), СРП ($r = -0,553$, $p < 0,001$) і НЛС ($r = -0,519$, $p < 0,001$). Індекс Simpson 1/D показав подібну негативну кореляцію з досліджуваними параметрами.

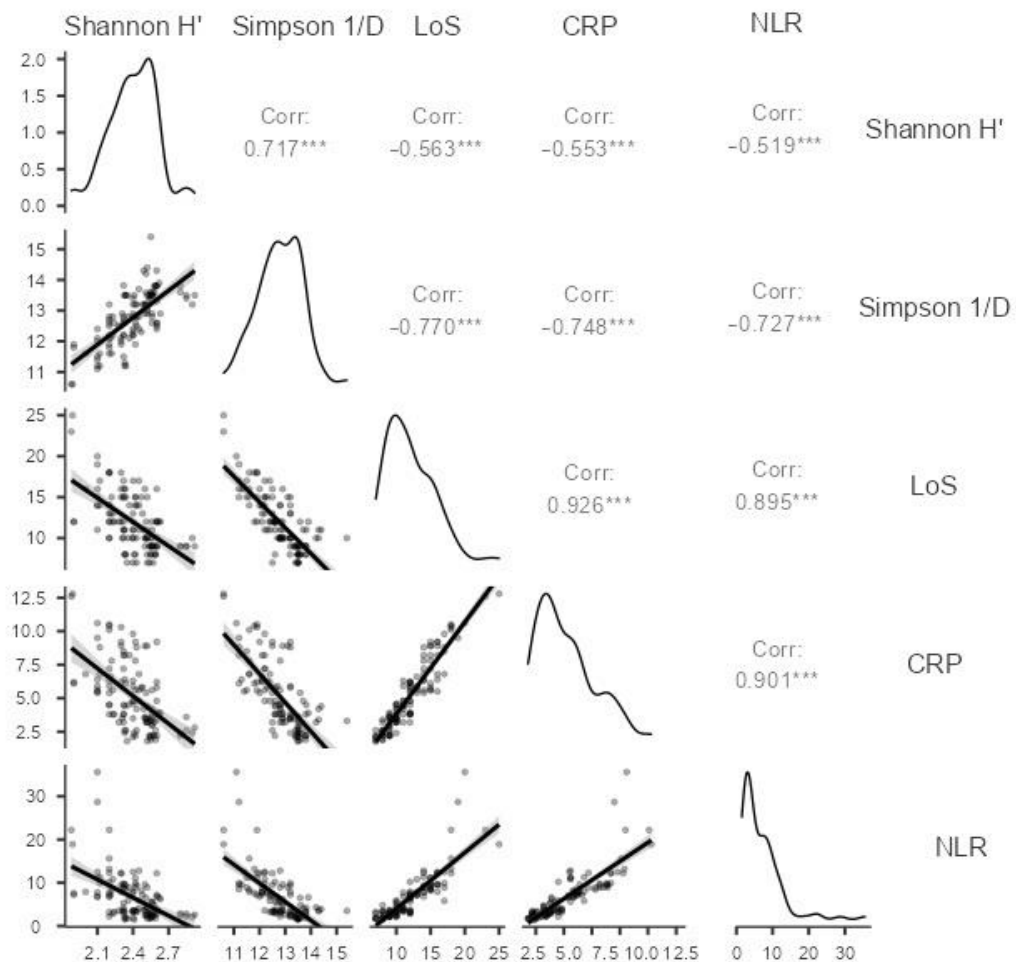


Рисунок 4.11 – Кореляційна матриця між індексами альфа-різноманіття, кількістю ліжко-днів, С-реактивним протеїном і нейтрофільно-лімфоцитарним співвідношенням

Примітка. *** – Статистична значущість кореляцій ($p < 0,001$).

Була розроблена прогностична модель із використанням бінарної логістичної регресії для оцінки ймовірності діагностування COVID-19 у пацієнтів з ЦД-2, з урахуванням індексів Shannon H' та Simpson 1/D.

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}} \times 100\%, z$$

$$= 46.959 + 12.787 \times \text{Shannon } H' - 5.989 \times \text{Simpson } 1/D$$

Отримана регресійна модель статистично значуща ($p < 0,001$) і дозволяє визначати ймовірність віднесення пацієнта до групи COVID-19 з ЦД-2. Також був застосований ROC-аналіз для оцінки точності моделі. Крива ROC мала площу $0,880 \pm 0,065$, що вказує на добру прогностичну здатність моделі з 95 % довірчим інтервалом від 0,752 до 1,000. Значення R^2 Нагелькерке дорівнює 59,1 %, що означає, що модель пояснює 59,1 % спостережуваної дисперсії (рис. 4.12).

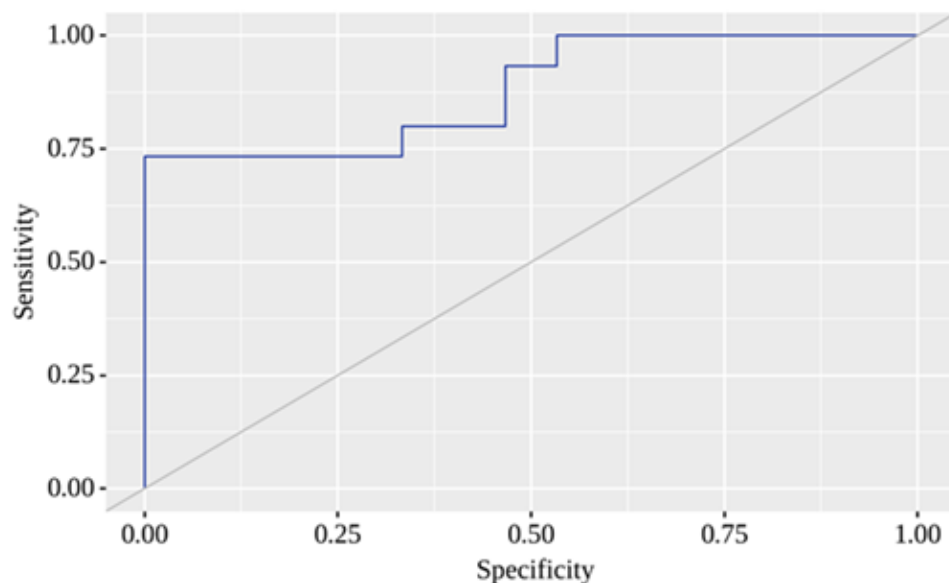


Рисунок 4.12 – ROC-аналіз прогностичної моделі для оцінки ймовірності COVID-19 та ЦД-2 на основі Shannon H' та Simpson $1/D$ з чутливістю 73,3 % та специфічністю 100 %

Отримана модель є статистично значущою ($p < 0,001$). Граничне значення логістичної функції P , яке відповідає найвищому значенню J -статистики Юдена, становить 0,673. Якщо значення логістичної функції P

було більше або дорівнювало цьому значенню, прогнозували віднесення пацієнта до групи COVID-19 та ЦД-2. При застосуванні методу чутливість та специфічність моделі склали 73,3 % та 100,0 % відповідно (рис. 4.13).

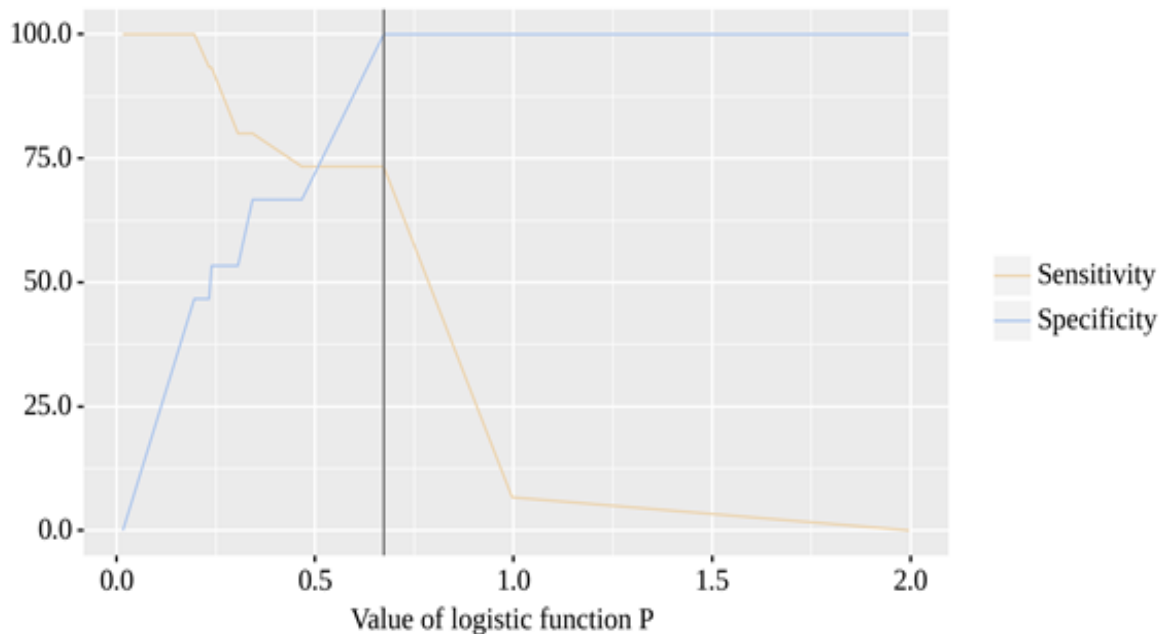


Рисунок 4.13 – Аналіз чутливості та специфічності прогнозування віднесення пацієнта до групи COVID-19 з ЦД-2 з використанням логістичної функції

4.4 Співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes та його зв'язок з біомаркерами запалення у пацієнтів з COVID-19

Для дослідження особливостей співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) кишкової мікробіоти було обстежено 6 груп осіб: 1) Контрольна група (без COVID-19 та ЦД-2) $n = 25$; 2) Пацієнти з ЦД-2 без COVID-19, $n = 22$; 3) Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2, $n = 20$; 4) Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, $n = 18$; 5) Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі отримували метформін, $n = 15$; 6) Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі не отримували метформін, $n = 15$. Загальна кількість осіб, котрі приймали участь у дослідженні, складає 115 осіб. Розподіл досліджуваної популяції за статтю відображений на таблиці 4.4.

Критерії включення в усі групи були такими: вік від 25 до 75 років, відсутність в анамнезі інших хронічних захворювань, а також відсутність вживання антибіотиків або пробіотиків протягом останніх 3 місяців. Критерії виключення були наступними: вагітність, лактація, запальні захворювання кишечника та інші шлунково-кишкові захворювання в анамнезі. Всі учасники надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Всіх учасників попросили здати один зразок калу та один зразок венозної крові.

Переважає більшість учасників були жінки (64,34 %). Розподіл учасників за статтю був досить подібним у всіх обстежених групах. У групі пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 частка жінок була найвищою (72,22 %) (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Статевий розподіл пацієнтів у розрізі досліджуваних груп

| Назва групи | Жінки, n (%) | Чоловіки, n (%) | Всього, n |
|--|--------------|-----------------|-----------|
| Контрольна група | 16 (64 %) | 9 (36 %) | 25 |
| Пацієнти з ЦД-2 без COVID-19 | 15 (68,18 %) | 7 (31,82 %) | 22 |
| Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2 | 12 (60 %) | 8 (40 %) | 20 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 | 13 (72,22 %) | 5 (27,78 %) | 18 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін | 10 (66,66 %) | 5 (33,34 %) | 15 |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі не приймали метформін | 8 (53,33 %) | 7 (46,67 %) | 15 |
| Всього | 74 (64,34 %) | 41 (35,66 %) | 115 |

Згідно з результатами дослідження, проведеного на зразках, представлених різними групами пацієнтів, були отримані такі результати щодо складу мікробіоти.

Результати дослідження показали, що F/V співвідношення було вищим у пацієнтів із ЦД-2 порівняно з контрольною групою ($P < 0,001$). У контрольній групі встановлене незначне переважання Firmicutes над Bacteroidetes зі співвідношенням F/V приблизно 1,02, тоді як у групі пацієнтів із ЦД-2 без COVID-19 було виявлено значно підвищений вміст Firmicutes, що призвело до підвищення F/V співвідношення до 2,26 (рис. 4.14).

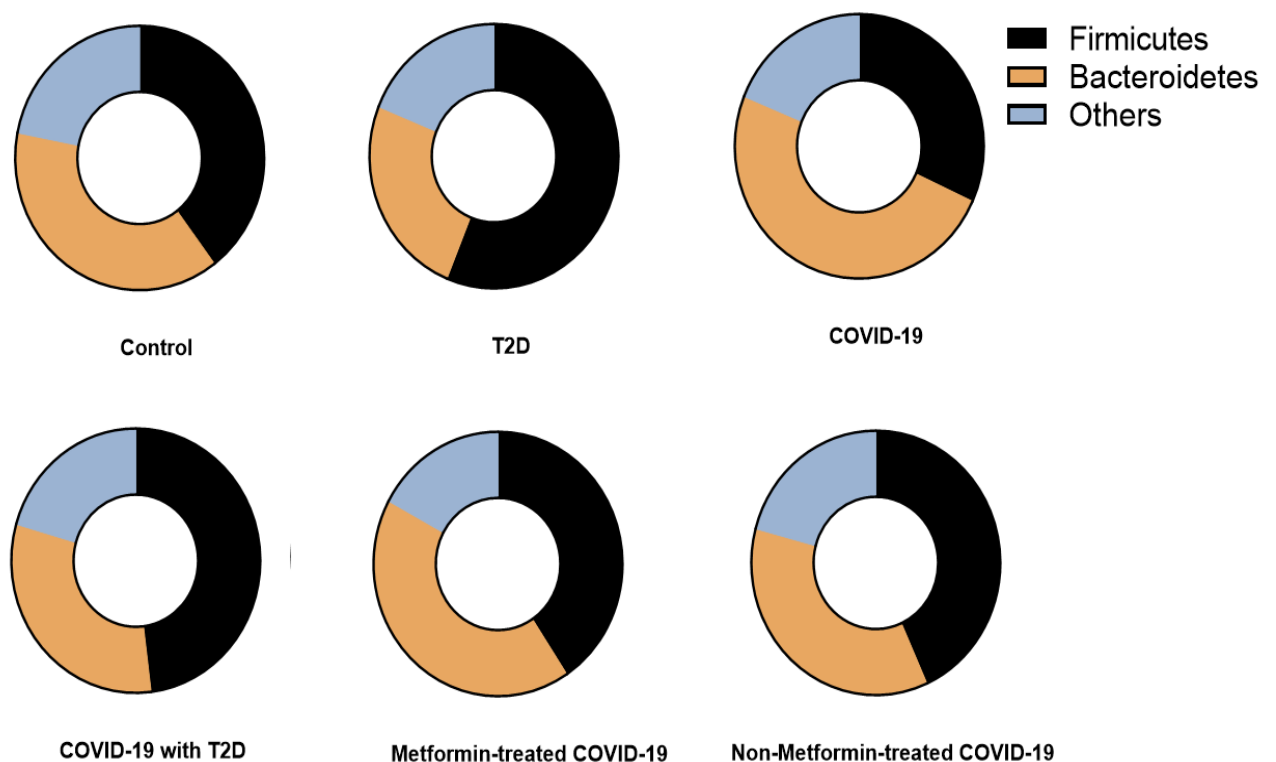


Рисунок 4.14 – Відносна чисельність відділів Firmicutes та Bacteroidetes у розрізі досліджуваних груп

F/V співвідношення також було вищим у пацієнтів із COVID-19 з ЦД-2 порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2 ($p < 0,001$). У групі пацієнтів із COVID-19 без ЦД-2 спостерігалось зменшення Firmicutes, що знизило F/V співвідношення до 0.65, тоді як у групі пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 було виявлене збільшення Firmicutes, що спричинило підвищення F/V співвідношення до 1,56.

Окремий аспект дослідження стосувався порівняння двох підгруп пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2: однієї групи, яка приймала метформін, та іншої групи, що не приймала метформін. Виявлено, що пацієнти, які приймали метформін, мали більше Firmicutes та менше Bacteroidetes, ніж ті, хто не приймав метформін. Співвідношення F/V у групі пацієнтів, що приймали метформін, становило приблизно 0.94, тоді як у тих, хто не приймав метформін, співвідношення F/V було більше – 1.17. Проте, варто зазначити, що статистично достовірних відмінностей у співвідношенні F/V не виявлено між пацієнтами з ЦД 2 типу, які отримували та не отримували метформін, та пацієнтами з ЦД 2 типу, які не отримували метформін, при COVID-19 ($p=0,0675$). Таким чином, такі результати не дають підстав для висновків про статистично значущі відмінності між цими групами пацієнтів (рис. 4.15).

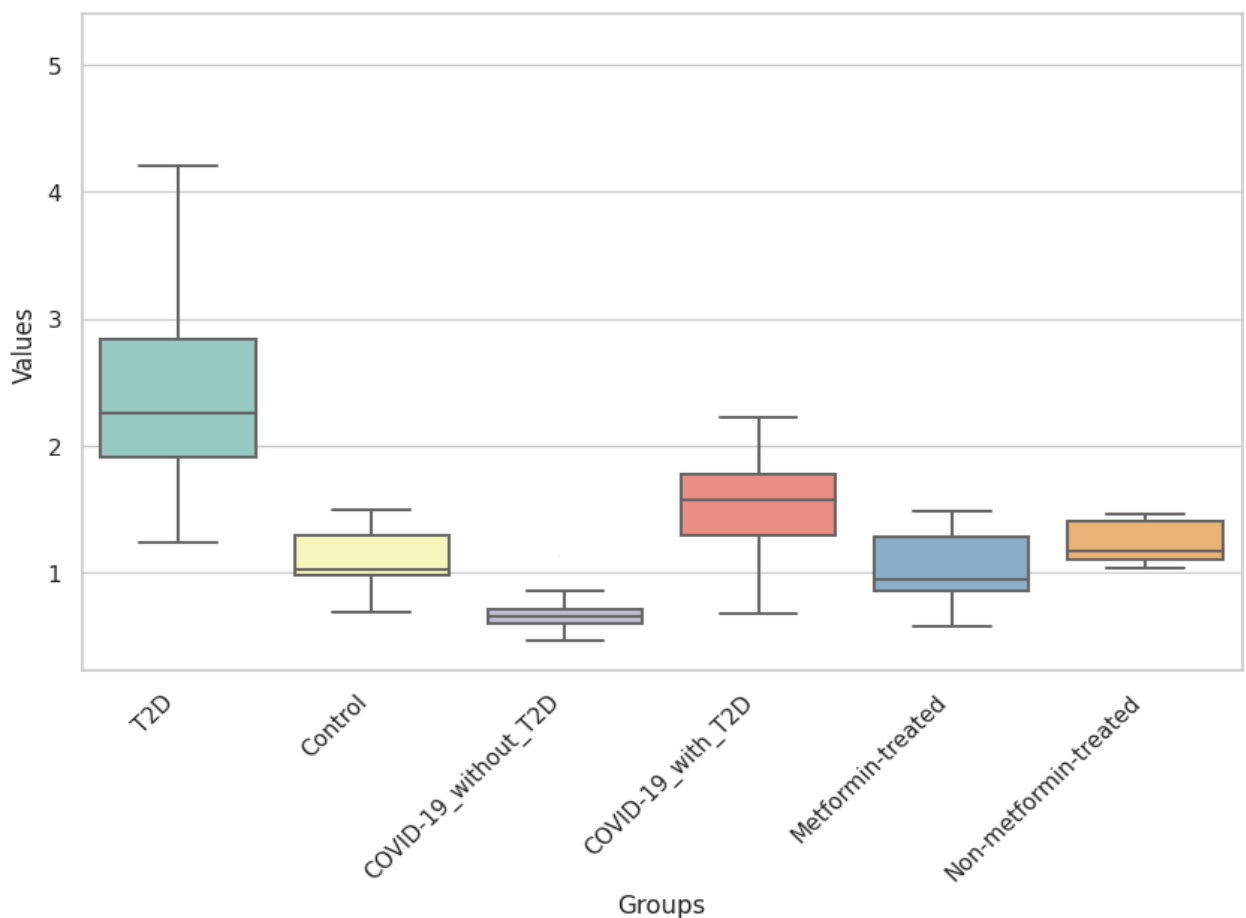


Рисунок 4.15 – Коробковий графік розподілу F/V співвідношення у розрізі досліджуваних груп

Виявлено, що рівень С-реактивного протеїну був значно вищим у пацієнтів із COVID-19 із ЦД-2 порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2 ($P=0.0258$). Було виявлено значний позитивний кореляційний зв'язок між співвідношенням F/V та рівнем СРБ у пацієнтів із ЦД 2 типу, які отримували метформін, та COVID-19 ($r = 0,7524$, $P = 0,0012$), пацієнтів із ЦД 2 типу, які не отримували метформін, та COVID-19 ($r = 0,6752$, $P = 0,0041$), пацієнтів з ЦД 2 типу, які не отримували метформін ($r = 0,6821$, $P = 0,0018$). Однак кореляція між співвідношенням F/V та рівнем СРБ у пацієнтів з COVID-19 без ЦД не була значущою ($r = 0,4345$, $p = 0,055$) (рис. 4.16).

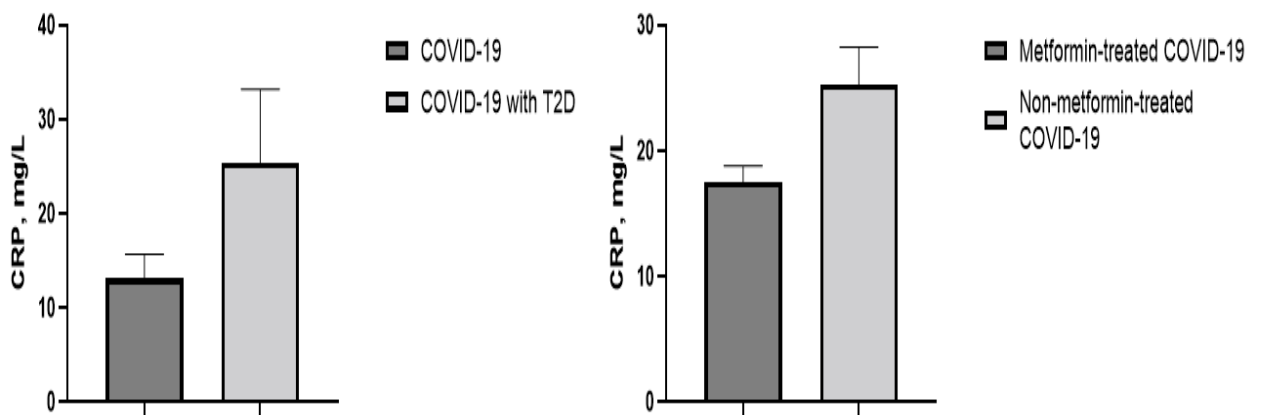


Рисунок 4.16 – Рівні С-реактивного протеїну в розрізі досліджуваних груп

Логістичний регресійний аналіз показав, що співвідношення F/V (вище/нижче 1.0) значною мірою пов'язане з рівнем СРП (середній показник 1.51, 95 % довірчий інтервал: 1.26 – 1.99, рівень значущості < 0.001). Крім того, застосування ROC-аналізу підтвердило добру точність прогнозування, оцінену за площею під кривою ROC, яка складає 0.9022 (стандартна помилка 0.03534, 95 % довірчий інтервал: 0.8330 до 0.9715, рівень значущості < 0.0001) (рис. 4.17; табл. 4.5).

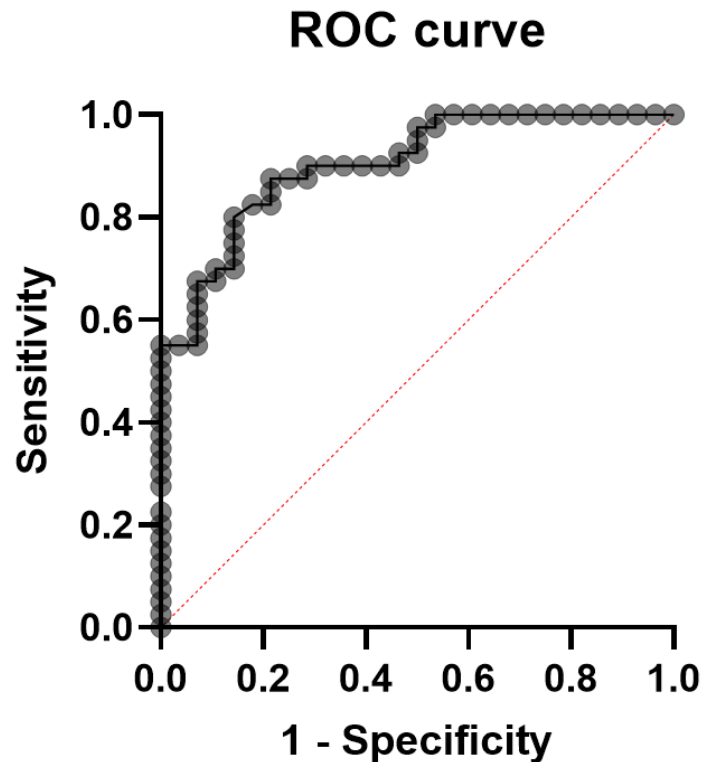


Рисунок 4.17 – ROC-крива для визначення чутливості та специфічності регресійної моделі

Таблиця 4.5 – Логістичний регресійний аналіз зв'язку між рівнем СРП та F/V співвідношенням

| Назва групи | Коефіцієнт регресії (B) ± стандартна похибка | P значення | Відношення шансів F/V > 1,0 (95 % ДІ) |
|--|--|------------|---------------------------------------|
| Пацієнти з COVID-19 без ЦД-2 | 0,79 ± 0,44 | 0,077 | 2,21 (1,17 – 8,23) |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 | 0,20 ± 0,15 | 0,177 | 1,23 (0,99 – 1,26) |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін | 1,19 ± 0,63 | 0,061 | 3,30 (1,26 – 16,07) |
| Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі не приймали метформін | У всіх пацієнтів цієї групи співвідношення F/V перевищувало 1,0. | | |
| Разом | 0,41 ± 0,11 | < 0,001 | 1,51 (1,26 – 1,99) |

Підсумовуючи в цьому розділі результати, можемо зробити такі висновки:

1. Проведений систематичний аналіз показав, що застосування метформіну може призводити до змін в кишковій мікробіоті на рівні бактеріальних родів та відділів (типів).

2. У відділі Bacteroidetes було спостережено як збільшення, так і зменшення чисельності роду *Bacteroides*. Чисельність *Parabacteroides* spp., збільшилася в одному дослідженні. Результати досліджень щодо кількості бактерій родів *Alistipes* та *Prevotella* також виявилися неоднозначними, залежно від конкретного дослідження. В окремих дослідженнях було зафіксоване зменшення кількості цих родів, тоді як у інших дослідженнях виявлено збільшення.

3. У відділі Firmicutes чисельність бактерій роду *Bacillus* зменшилася, а *Blautia* і *Butyrivibrio* збільшилися. Було виявлено також, зміни в чисельності бактерій родів *Faecalibacterium* та *Lactobacillus*. Деякі дослідження показали зменшення їх чисельності, тоді як інші виявили збільшення.

4. У відділі Proteobacteria було зафіксоване збільшення кількості *Escherichia*. У відділі Actinobacteria виявлено зміни в родах *Adlercreutzia* та *Bifidobacterium*.

5. У відділі Verrucomicrobia було зафіксоване як збільшення, так і зменшення чисельності роду *Akkermansia*, а у відділі Thermodesulfobacteriota кількість бактерій роду *Bilophila* достовірно збільшилася.

6. Загальна картина впливу метформіну на різноманіття кишкової мікробіоти є складною та розбіжною: деякі дослідження вказують на зміни у різноманітності та багатстві мікробіоти, в той час як інші не виявили статистично значущих змін.

7. Проведене мікробіологічне дослідження виявило що кишкова мікробіота пацієнтів із COVID-19, інфікованих у період домінування

варіанту Омікрон, характеризувалася переважанням нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*, збільшенням кількості нейроактивних, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus*, представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, а також збільшенням кількості представників групи ЛПС-вмісних бактерій родів *Klebsiella* та *Enterobacter*.

8. Кишкова мікробіота пацієнтів з COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію, характеризувалася збільшенням чисельності імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus*, дріжджеподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Clostridium*.

9. У пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 кишкова мікробіота характеризувалася зниженням чисельності нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* та лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus*, а також збільшенням кількості грибів роду *Candida*.

10. Кишкова мікробіота пацієнтів із ЦД-2 та COVID-19, які отримували цукрознижуючу терапію метформіном без лікування антибактеріальними лікарськими засобами, характеризувалася збільшенням чисельності представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та імуномодулювальної *E. coli*, а також зменшенням родів *Clostridium* та *Enterococcus* порівняно з групою, яка отримувала антибактеріальну терапію.

11. Було встановлено кореляційний зв'язок між чисельністю певних родів мікроорганізмів та рівнем СРП, а також тривалістю перебування пацієнтів у стаціонарі. Зокрема, у пацієнтів із COVID-19 без ЦД-2 чисельність бактерій родів *Klebsiella*, *Enterococcus* позитивно корелювала з рівнем СРП, тоді як кількість *Bifidobacterium* spp. негативно корелювала з цим показником. У пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 отримано позитивну кореляцію між чисельністю *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. та *Candida* spp. та рівнем СРП, а також негативну кореляцію з чисельністю

лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та нейроактивних і лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*.

12. Встановлено значні відмінності в індексах альфа-різноманітності (Shannon H' та Simpson 1/D) між досліджуваними групами.

13. Пацієнти з COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію, мали меншу альфа-різноманітність кишкової мікробіоти порівняно з тими пацієнтами, хто не приймав антибактеріальну терапію.

14. Наявність ЦД-2 у пацієнтів з COVID-19 не мала суттєвого впливу на альфа-різноманітність кишкової мікробіоти.

15. Пацієнти з ЦД-2 та COVID-19, які приймали антибактеріальну терапію та лікування метформіном, мали достовірно значущі відмінності у досліджуваних індексах альфа-різноманітності порівняно з тими пацієнтами, хто не отримував антибактеріальної терапії.

16. Досліджувані індекси альфа-різноманітності корелювали з кількістю ліжко-днів, С-реактивним протеїном та нейтрофільно-лімфоцитарним співвідношенням, що може вказувати на зв'язок між кишковою мікробіотою та запальними процесами.

17. Молекулярно-генетичним методом визначено співвідношення F/V, котре було вищим у пацієнтів із ЦД-2 порівняно з контрольною групою (без COVID-19 та ЦД-2). У групі пацієнтів із ЦД-2 без COVID-19 співвідношення F/V було значно підвищене, що свідчить про переважання Firmicutes над Bacteroidetes. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 мали вище F/V співвідношення порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2.

18. Виявлено, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які приймали метформін, мали більше Firmicutes та менше Bacteroidetes, ніж ті, хто не приймав метформін. Проте статистично значущих відмінностей між цими групами пацієнтів не виявлено.

19. Рівень С-реактивного протеїну був значно вищим у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2. Було

встановлено позитивний кореляційний зв'язок між співвідношенням F/V та рівнем С-реактивного протеїну у пацієнтів із ЦД-2, які приймали або не приймали метформін.

20. Логістичний регресійний аналіз показав, що співвідношення F/V вище 1,0 значною мірою пов'язане з підвищеним рівнем С-реактивного протеїну в усіх пацієнтів, які брали участь у дослідженні.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в наукових працях автора [169-174].

РОЗДІЛ 5
ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ *PRKAA1*, *SLC2A1* ТА *MTOR*
ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ COVID-19
ТА ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

У нашому дослідженні було проведено аналіз експресії мРНК генів – *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR* – у трьох групах пацієнтів із COVID-19: 1) Пацієнти, котрі не мали ЦД-2 та отримували антибактеріальну терапію; 2) Пацієнти з ЦД-2 типу та лікуванням інсуліном; 3) Пацієнти також з ЦД 2 типу та лікуванням метформіном. Для розрахунку експресії мРНК, як контрольну групу було використано пацієнтів з COVID-19 котрі не отримували антибактеріальної терапії та не мали ЦД-2. Показники відносної нормалізованої експресії були переведені в двійковий логарифм.

У групі пацієнтів, котрі отримували антибактеріальну терапію, не спостерігалось достовірно значущих змін в експресії генів досліджуваних генів ($p > 0,05$). У групі пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2, яка отримувала інсулінотерапію, рівень відносної нормалізованої експресії гену *PRKAA1* був знижений у 3,09 раза ($p < 0,01$), тоді як рівні експресії *SLC2A1* і *MTOR* були підвищеними у 31,7 раза ($p < 0,05$) і 19,6 раза ($p < 0,05$) відповідно. Пацієнти, котрі приймали метформін, мали підвищену експресію гену АМФ-активованої протеїнкінази *PRKAA1* в 400,9 раза ($p < 0,001$) в той час, як експресія мРНК генів *SLC2A1* і *MTOR* була знижена в 61,5 раза та 3,2 раза ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою (рис. 5.1).

Також у всіх чотирьох групах було визначено рівні біомаркерів запалення, як-от: С-реактивний протеїн (СРП), прокальцитонін, – та розраховано нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення (НЛС), а також визначено рівень глікемії.

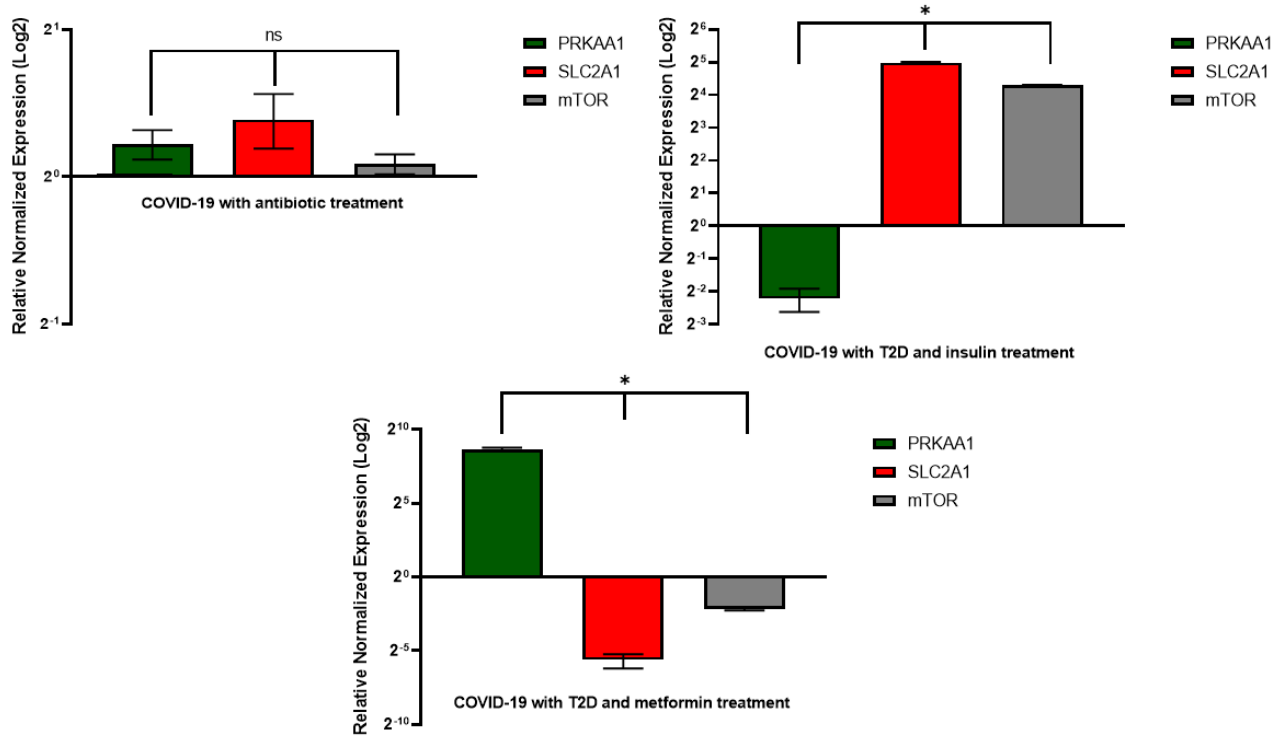


Рисунок 5.1 – Відносна нормалізована експресія (Log2) генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR* у досліджуваних групах

Результати показали, що пацієнти з COVID-19, котрі отримували антибактеріальну терапію, мали значно вищий середній показник НЛС ($8,00 \pm 4,85$) порівняно з пацієнтами з COVID-19, котрі не отримували антибактеріальної терапії ($3,13 \pm 1,23$, $p < 0,05$), та вище, ніж у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін ($4,13 \pm 0,88$, $p < 0,05$). Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які отримували інсулінотерапію, мали найвищий середній показник НЛС ($14,5 \pm 2,19$) серед усіх груп.

Щодо рівня СРП, то пацієнти з COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію, мали значно вищий рівень СРП ($11,8 \pm 8,11$) порівняно з пацієнтами з COVID-19, котрі не отримували антибактеріальної терапії ($3,66 \pm 3,37$, $p < 0,001$), та пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін ($4,21 \pm 1,99$, $p < 0,05$). Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі отримували інсулінотерапію, мали найвищий середній рівень СРП ($22,7 \pm 2,81$) серед усіх груп.

Рівень прокальцитоніну також виявився значно вищим у пацієнтів із COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію ($1,11 \pm 0,89$), порівняно з пацієнтами котрі не отримували антибактеріальної терапії та пацієнтами з COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін-терапію, $- 0,29 \pm 0,15$ та $0,32 \pm 0,24$ відповідно. Пацієнти з COVID-19, які отримували ЦД2 та інсулін, мали також найвищий середній рівень прокальцитоніну ($2,79 \pm 0,87$) серед усіх досліджуваних груп (рис. 5.2).

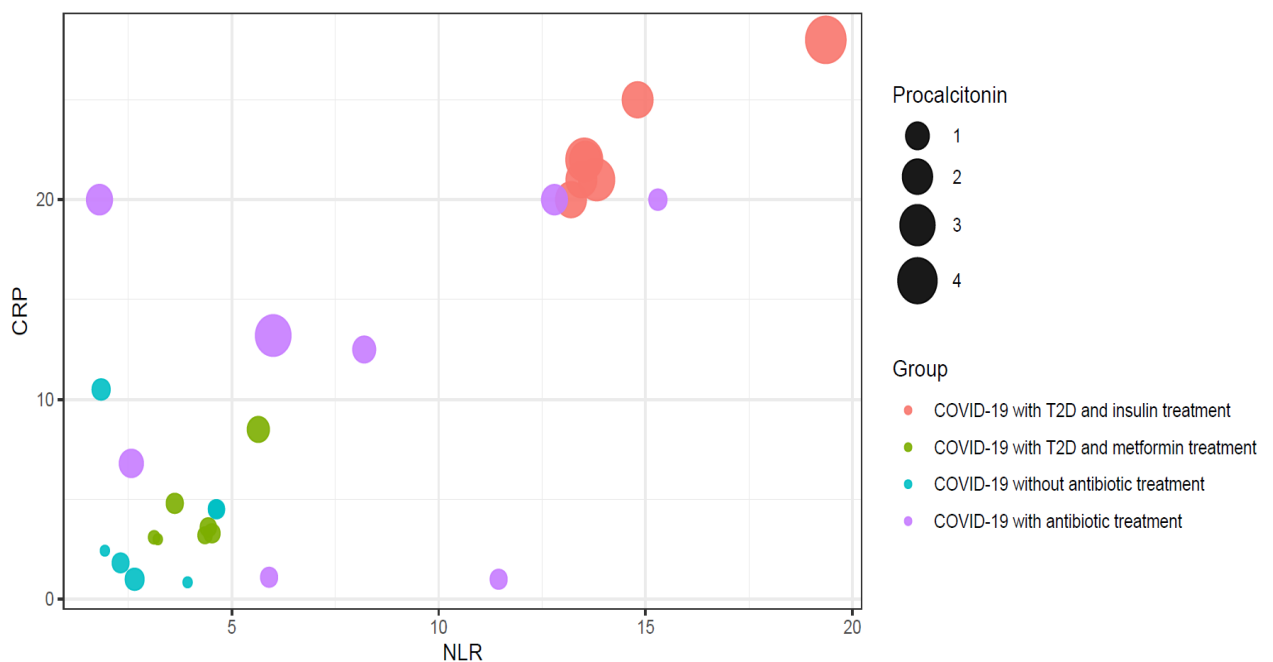


Рисунок 5.2 – Рівні С-реактивного протеїну, нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення та прокальцитоніну у пацієнтів із COVID-19:

Бульбашкова діаграма

Також було проведено кореляційний аналіз досліджуваних біомаркерів запалення та відносної нормалізованої експресії *PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR* для дослідження будь-яких потенційних взаємозв'язків між ними. Нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення мало значну позитивну кореляцію з СРП ($r=0,989$, $p<0,001$), прокальцитоніном ($r=0,956$, $p<0,001$) та рівнем сироваткової глюкози ($r=0,967$, $p<0,001$). СРП і прокальцитонін також мали

сильну позитивну кореляцію між собою ($r=0,940$, $p<0,001$). Сироваткова глюкоза також показала значну позитивну кореляцію з СРП ($r=0,983$, $p<0,001$) і прокальцитоніном ($r=0,902$, $p<0,001$) (рис. 5.3).

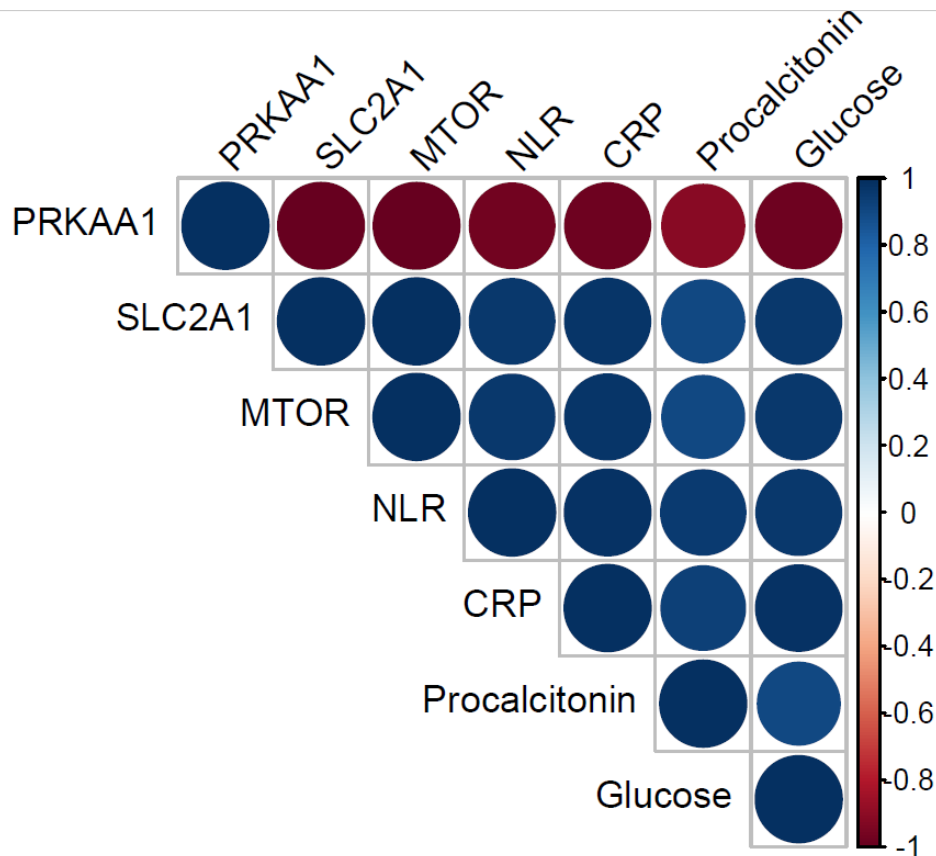


Рисунок 5.3 – Кореляційна матриця між рівнями відносної нормалізованої експресії генів *PRKAA1*, *SLC2A1* і *MTOR* та рівнями С-реактивного протеїну, нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення, прокальцитоніну та глюкози серед досліджуваних пацієнтів

Крім того, встановлено позитивну кореляцію між експресією мРНК *PRKAA1*, *SLC2A1*, *MTOR* та біомаркерами запалення. *PRKAA1* мав сильну негативну кореляцію з НЛС ($r=-0,963$, $p<0,001$), СРП ($r=-0,973$, $p<0,001$), прокальцитоніном ($r=-0,905$, $p<0,001$) та рівнем глюкози ($r=-0,977$, $p<0,001$). *SLC2A1* і *MTOR* мали сильні позитивні кореляції з рівнем С-реактивного білка, прокальцитоніном і глюкози, а також сильну негативну кореляцію з

НЛС. Експресія мРНК *SLC2A1* і *MTOR* мала значну негативну кореляцію з *PRKAA1*. Усі кореляції між цими генами та біомаркерами запалення були значущими ($p < 0,001$).

Підсумовуючи результати в цьому розділі, можемо зробити такі висновки:

1. Антибактеріальна терапія у пацієнтів з COVID-19, які не мали ЦД-2, не впливала на експресію генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR*.

2. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які отримували інсулінотерапію, мали знижену експресію гена *PRKAA1* та підвищену експресію генів *SLC2A1* і *MTOR* порівняно з контрольною групою.

3. У пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін, спостерігалася значно збільшена експресія гена *PRKAA1*, але знижені рівні експресії генів *SLC2A1* та *MTOR* порівняно з контрольною групою.

4. У групі пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2, які отримували інсулінотерапію, було виявлено значно вищі рівні нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення (НЛС), СРП та прокальцитоніну порівняно зі всіма іншими досліджуваними групами.

5. Кореляційний аналіз встановив зв'язок між експресією генів *PRKAA1*, *SLC2A1* і *MTOR* та біомаркерами запалення. Зокрема, виявлені негативні кореляційні зв'язки між експресією гена *PRKAA1* та показниками НЛС, СРП і прокальцитоніну, а також позитивні зв'язки між експресією генів *SLC2A1* та *MTOR*.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в наукових працях автора [175, 176].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пандемія коронавірусу SARS-CoV-2 спричинила безпрецедентний рівень захворюваності та смертності в XXI столітті і стала суттєвим викликом для системи охорони здоров'я навіть найбільш розвинених країн [177]. На сьогодні чітко встановлено, що цукровий діабет 2 типу є фактором ризику більш важкого перебігу, госпіталізації та смертності від коронавірусної хвороби. COVID-19 також збільшує ризик виникнення ЦД-2 у здорових пацієнтів [178-181].

ЦД-2 слід розглядати як фактор ризику важкого перебігу COVID-19 з декількох причин: поганий контроль глікемії, яка, як відомо, є незалежним фактором смертності при COVID-19 та впливає на рівні прозапальних цитокінів; імунна дисфункція та прозапальна імунна відповідь; супутні захворювання, котрі теж діють як незалежні фактори ризику важкого перебігу коронавірусної хвороби [182-185].

Зміни кишкового мікробіому беруть участь у перебігу багатьох інфекційних (наприклад, грип та COVID-19) та некомунікативних хвороб, зокрема ЦД-2 [186, 187]. Кишкова мікробіота та її метаболіти мають свій вплив, як з одного боку на контроль глікемії при ЦД-2, так і на перебіг COVID-19, через так звану вісь «кишківник-легеня» [188-190].

Ця дисертаційна робота спрямована на визначення відмінностей у складі кишкової мікробіоти та прозапальних біомаркерів у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 залежно від цукрознижуючої та антибактеріальної терапії, а також вплив гіпоглікемічної терапії на транскрипційну активність генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR*, які беруть участь у регуляції метаболізму лімфоцитів, а також їх зв'язок з біомаркерами запалення.

Пацієнти з ЦД-2 у період домінування варіанту Дельта мали достовірно вищі рівні лейкоцитів, лімфоцитів та прокальцитоніну, ніж у період

домінування варіанту Оміврон. Як відомо, варіант Оміврон пов'язаний із більш легким перебігом COVID-19, хоч і характеризується більшою контагіозністю та зв'язуванням з ACE2 [191-193].

У нашому дослідженні пацієнти з COVID-19, котрі отримували метформін, мали достовірні нижчі рівні СРП, ніж пацієнти, котрі отримували цукрознижуючу терапію інсуліном. Ці дані підтверджуються також іншими дослідженнями, де метформін впливав не лише на СРП, а й на IL-6, IL-2 та TNF- α [194-196]. Повідомляється, також і про противірусну дію метформіну, не тільки стосовно до SARS-CoV-2, а й до інших вірусів, таких, як вірус Зіка, гепатиту В, грипу [197-199]. У нових клінічних рандомізованих дослідженнях повідомлено також про зниження вірусного навантаження у пацієнтів із COVID-19, котрі приймали метформін [200, 201].

У цій дисертаційній роботі встановлено, що пацієнти, котрим було призначено інсулін в ролі цукрознижуючої терапії, мали вищі рівні лейкоцитів та гранулоцитів, що підтверджуються в дослідженні Во Yu et. al. [40]. Загалом використання інсуліну як цукрознижуючою ЛЗ пов'язане з більш важким перебігом захворювання та вищими рівнями прозапальних цитокінів [202].

Наступним етапом дослідження було проаналізувати зміни кишкової мікробіоти пацієнтів у період домінування варіантів Дельта та Оміврон. Кишкова мікробіота пацієнтів із COVID-19, інфікованих у період домінування варіанту Оміврон, характеризувалася переважанням нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*, збільшенням кількості нейроактивних, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus*, представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, а також збільшенням кількості представників групи ЛПС-вмісних бактерій родів *Klebsiella* та *Enterobacter*. Натомість, у пацієнтів, інфікованих у період домінування Дельта-варіанту, спостерігалось значне збільшення родів *Clostridium*, *Enterococcus* та *Candida*. Ймовірною причиною

збільшення родів цих мікроорганізмів слід вважати прийом антибактеріальної терапії, яка була особливо вживаною в період домінування цього варіанту. Є декілька досліджень, в яких було виявлено достовірне збільшення бактерій роду *Enterococcus* [203, 204]. У нашому дослідженні було встановлено позитивний кореляційний зв'язок між чисельністю бактерій цього роду з рівнем СРП, хоча, імовірно, цей зв'язок не є причинно-наслідковий і містить безліч інших факторів; існують декілька досліджень, які встановили певну роль цього роду у виникненні цитокінового шторму, який суттєво впливає на перебіг COVID-19 [116, 205, 206]. Одним із можливих механізмів, внаслідок якого ентерококи можуть сприяти цитокіновому шторму, як припускають, є активація Toll-подібних рецепторів (TLR) [207]. Також припускають, що ентерококи можуть збільшувати вироблення прозапальних цитокінів, таких як TNF- α та IL-6, які, як було показано, підвищені у пацієнтів з COVID-19 і пов'язані з важчим перебігом захворювання [208, 209].

У цьому дослідженні у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2 спостерігалось зниження чисельності бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і збільшення кількості грибів роду *Candida*. Даних, котрі спростовували чи підтверджували ці спостереження, немає, хоча встановлено, що пацієнти з ЦД-2 мають знижену чисельність бактерій, які продукують метаболіти триптофану (триптамін, індол, індолмолочна кислота, індолпропіонова кислота, індолоцтова кислота та інші), до яких належать роди *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* [127, 140, 210-212]. Ці мікробні метаболіти беруть участь у регуляції метаболізму, імунітеті, експресії генів і підтримці цілісності кишкового бар'єру [213-215]. У свіжому дослідженні, проведеному Лі Вао et. al., встановлено, що β -glucan з *C. albicans* відповідальний за розвиток інсулінорезистентності [216].

Стосовно змін кишкової мікробіоти, індукованої метформіном, то у цьому дослідженні пацієнти, які отримували цукрознижуючу терапію

метформіном без лікування антибактеріальними лікарськими засобами, мали більшу чисельність бактерій родів *Bacteroides*, *Lactobacillus* та *E. coli*, а також меншу чисельність бактерій родів *Clostridium* та *Enterococcus*. Подібні зміни кишкової мікробіоти спостерігали і в інших клінічних дослідженнях [142, 173]. Примітно, що збільшення росту *E. coli* пов'язане зі здуттям живота та діареєю приблизно у 30 % пацієнтів з ЦД-2 [138, 142]. Дослідження Jing Ouyang et.al. підтверджує можливість впливу метформіну на запальні біомаркери шляхом модуляції кишкової мікробіоти [217]. Heetae Lee et.al, встановили, що метформін знижує рівень IL-18 саме шляхом модуляції кишкової мікробіоти [218].

У цій дисертаційній роботі встановлено позитивний кореляційний зв'язок між чисельністю роду *Klebsiella* та рівнем СРП. На сьогодні повідомляється про декілька досліджень, у яких встановлена роль бактерій в індукванні запальної відповіді при пневмонії, виразковому коліті, ендoftальміті [219-222]. У контексті COVID-19 повідомляється про вищу чисельність бактерій цього роду в критично важких пацієнтів [9].

Наступним етапом дослідження було виявити не лише зміни чисельності кишкової мікробіоти між різними групами пацієнтів, а й встановити зміни її альфа-різноманітності. Було доведено, що лікування антибіотиками зменшує альфа-різноманітність при COVID-19. Хоча антибактеріальна терапія зазвичай не призначається пацієнтам із COVID-19, проте вона може мати місце, наприклад, при бактеріальній коінфекції [223]. Lucie Bernard-Raichon et.al. дослідили, що прийом антибактеріальних препаратів при COVID-19 пов'язаний із транслокацією кишкової мікробіоти, бактеріємією та зменшенням альфа-різноманітності [224]. Нами продемонстровано також, що індекси альфа-різноманітності не змінюються у пацієнтів із COVID-19 залежно від наявності чи відсутності ЦД-2. Деякі дослідження підтверджують, що ЦД-2 не впливає на альфа-різноманітність [225], хоча окремі мають протилежні результати [226].

Встановлена в цій дисертаційній роботі також і кореляційна залежність між індексами альфа-різноманіття та прозапальними біомаркерами, такими, як СРП та нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення. Дослідження такого типу проведене вперше на пацієнтах із COVID-19, хоча є аналогічні результати і при інших нозологіях *in vivo* та *in vitro* [227-229].

Також було проведено визначення співвідношення між двома основними бактеріальними відділами Firmicutes (нова назва Bacillota) та Bacteroidetes (нова назва Bacteroidota). Зміни співвідношення між Firmicutes та Bacteroidete широко досліджені при багатьох нозологіях, наприклад при доброякісній гіперплазії простати, неалкогольній жировій хворобі печінки, раку молочної залози, а також це співвідношення залежить від харчування, віку та індексу маси тіла [230-235].

У цій дисертаційній роботі було встановлено, що F/V співвідношення було вищим у пацієнтів із ЦД-2 порівняно з контрольною здоровою групою. Систематичний огляд, проведений Yulianto Kusnadi et al., вказав на неоднозначні результати стосовно змін F/V співвідношення у пацієнтів із ЦД-2 [236]. Наприклад, у дослідженні Babiker Saad Almuqadam et.al. не було встановлено достовірних змін між F/V співвідношенням у пацієнтів із ЦД-2 порівняно зі здоровими контролем [237]. Zhao et al. виявили вище F/V співвідношення у пацієнтів із ускладненим ЦД-2 [238].

Нами вперше доведено зв'язок F/V співвідношення з рівнем СРП у пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, що може мати практичну цінність для персоніфікованої діагностики та лікування цієї коморбідної групи пацієнтів. Що стосується змін F/V співвідношення у пацієнтів з COVID-19, деякі дослідження повідомили про суттєве зниження F/V співвідношення у пацієнтів із COVID-19 та можливих зв'язок із маркерами запалення [239, 240].

Кінцевим етапом дослідження було дослідити особливості імунометаболізму лімфоцитів визначенням рівня мРНК генів PRKAA1,

SLC2A1 та MTOR у пацієнтів із COVID-19, котрі отримували антибактеріальні ЛЗ або гіпоглікемічну терапію – метформіном чи інсуліном.

Вперше було встановлено, що антибактеріальна терапія не впливала на експресію досліджуваних генів (*PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR*) у пацієнтів із COVID-19 без ЦД-2. Натомість, пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі отримували інсулінотерапію, мали знижену експресію гена *PRKAA1* та підвищену експресію генів *SLC2A1* і *MTOR*.

Glut1 і MTOR відіграють важливу роль у регуляції метаболізму різних субпопуляцій лімфоцитів [241, 242].

Прозапальні субпопуляції Th1, Th2 та Th17 характеризуються високим рівнем експресії транспортера глюкози Glut 1 і надзвичайно високою здатністю до гліколізу, а для Т-регуляторних клітин, навпаки, характерний низький рівень експресії Glut 1 і висока швидкість окислювального метаболізму [242, 243].

Таким чином, зростання рівня транскрипційної активності Glut1 пов'язане з впливом на рівень диференціювання прозапальних субпопуляцій CD4+Th1 і Th17 клітин та потенційно пояснює підвищені біомаркери запалення, такі як СРП, НЛС та прокальцитонін у цієї групи пацієнтів.

Пацієнти, котрі отримували метформін мали збільшену експресію гена *PRKAA1*, але знижені рівні експресії генів *SLC2A1* та *MTOR*. У практичній площині наша гіпотеза виглядає таким чином, що метформін пригнічує активність mTOR через АМФ-активовану протеїнкіназу (рис. 6.1). Низька активність mTOR в CD4+ клітинах впливає на їх диференціацію в протизапальні Т-регуляторні клітини [244, 245].

Протизапальна дія метформіну пов'язана також із впливом через АМФ-активовану протеїнкіназу на NF-κB [246], що також пояснює більш низькі рівні біомаркерів запалення у пацієнтів з COVID-19, котрі отримували метформін.

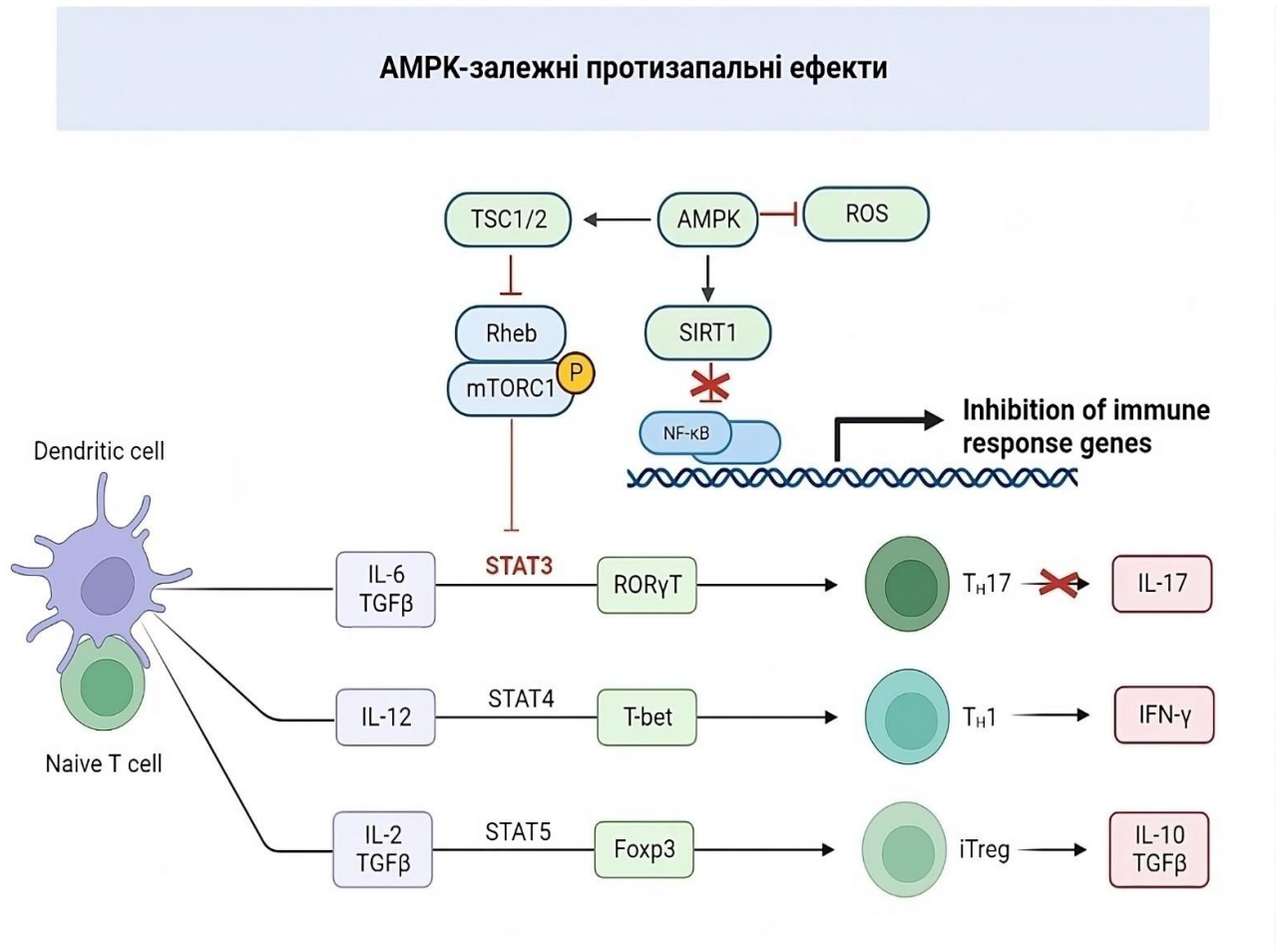


Рисунок 6.1 – Механізм протизапальної дії метформіну

Таким чином, наше дослідження підкреслює складні та багатогранні зв'язки, котрі можуть потенційно впливати на перебіг COVID-19 у пацієнтів із ЦД-2, а саме: вплив антибактеріальних засобів на кишкову мікробіоту; вплив кишкової мікробіоти на запальні біомаркери; модуляція кишкової мікробіоти метформіном; модуляція імунометаболізму лімфоцитів метформіном та інсуліном і їхній вплив на біомаркери запалення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено особливості кишкової мікробіоти, гематологічних показників, а також транскрипційної активності генів, котрі впливають на метаболізм лімфоцитів у пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу. У дисертаційній роботі також наведено вплив гіпоглікемічної та антимікробної терапії на склад кишкової мікробіоти та їх зв'язок з прозапальними біомаркерами.

1. Встановлено, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 у період домінування варіанту Дельта мали достовірно вищі рівні прокальцитоніну та моноцитів, ніж у період домінування варіанту Омікрон. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, котрі отримували метформін, мали достовірно нижчий рівень С-реактивного протеїну.
2. Кишкова мікробіота пацієнтів із COVID-19, які отримували антибактеріальну терапію, характеризується збільшенням чисельності імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus*, дріжджеподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Clostridium*, а також меншою альфа-різноманітністю.
3. У пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 кишкова мікробіота характеризувалася зниженням чисельності нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* та лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus*, а також збільшенням кількості грибів роду *Candida*, причому не встановлено суттєвого впливу наявного цукрового діабету на альфа-різноманіття.
4. Кишкова мікробіота пацієнтів із ЦД-2 та COVID-19, які отримували цукрознижуючу терапію метформіном, характеризувалася збільшенням чисельності представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та імуномодулювальної *E. coli*, а також зменшення родів

Clostridium та *Enterococcus* порівняно з групою, яка отримувала антибактеріальну терапію.

5. Проведений систематичний аналіз підтвердив, що метформін може модулювати склад кишкового мікробіому на рівні бактеріальних родів, а також може мати вплив на мікробне різноманіття.
6. Встановлено кореляційний зв'язок між чисельністю певних родів мікроорганізмів та рівнем СРП, а також тривалістю перебування пацієнтів у стаціонарі. Зокрема, у пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2 встановлено позитивний кореляційний зв'язок між чисельністю *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. та *Candida* spp. та рівнем СРП, а також негативний зв'язок між чисельністю лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* та нейроактивних і лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*. Досліджувані індекси альфа-різноманіття корелювали з кількістю ліжко-днів, С-реактивним протеїном та нейтрофільно-лімфоцитарним співвідношенням.
7. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2 мали вище F/V співвідношення порівняно з пацієнтами з COVID-19 без ЦД-2. Виявлено, що пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які приймали метформін, мали більше Firmicutes та менше Bacteroidetes, ніж ті, хто не приймав метформін. Проте статистично значущих відмінностей між цими групами пацієнтів не виявлено. Було встановлено позитивний кореляційний зв'язок між співвідношенням F/V та рівнем С-реактивного протеїну у пацієнтів з ЦД-2, які приймали або не приймали метформін.
8. Антибактеріальна терапія у пацієнтів не впливала на експресію генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR*. Пацієнти з COVID-19 та ЦД-2, які отримували інсулінотерапію, мали знижену експресію гена *PRKAA1* та підвищену експресію генів *SLC2A1* і *MTOR* порівняно з контрольною групою. У пацієнтів з COVID-19 та ЦД-2, які отримували метформін, спостерігалася значно збільшена експресія гена *PRKAA1*, але знижені

рівні експресії генів *SLC2A1* та *MTOR* порівняно з контрольною групою.

9. Кореляційний аналіз встановив зв'язок між експресією генів *PRKAA1*, *SLC2A1* та *MTOR* і біомаркерами запалення. Зокрема, виявлені негативні кореляційні зв'язки між експресією гена *PRKAA1* та показниками НЛС, СРП та прокальцитоніну, а також позитивні зв'язки між експресією генів *SLC2A1* та *MTOR*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. COVID-19 Coronavirus Pandemic [Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (дата звернення: 16.08.2023).
2. Шульгай А, Теренда Н, Сатурська Г, Панчишин Н, Литвинова О, Слободян Н. Епідеміологічні особливості Covid-19: огляд перебігу та прогнозування. Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України. (1):5-10.
3. Elamari S, Motaib I, Zbiri S, Elaidaoui K, Chadli A, Elkettani C. Characteristics and outcomes of diabetic patients infected by the SARS-CoV-2. The Pan African medical journal. 2020;37:32.
4. Галушко О, Лоскутов О, Тріщинська М, Кучинська І, Болюк М. Аналіз причин ускладненого перебігу COVID-19 у пацієнтів із цукровим діабетом. *Журнал Медицина невідкладних станів*. 2021(17,№ 4):23-31.
5. Barron E, Bakhai C, Kar P, Weaver A, Bradley D, Ismail H, et al. Associations of type 1 and type 2 diabetes with COVID-19-related mortality in England: a whole-population study. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2020;8(10):813-22.
6. Gao R, Zhu C, Li H, Yin M, Pan C, Huang L, et al. Dysbiosis signatures of gut microbiota along the sequence from healthy, young patients to those with overweight and obesity. *Obesity*. 2018;26(2):351-61.
7. Lv L, Jiang H, Chen Y, Gu S, Xia J, Zhang H, et al. The faecal metabolome in COVID-19 patients is altered and associated with clinical features and gut microbes. *Analytica Chimica Acta*. 2021;1152:338267.
8. Keely S, Talley NJ, Hansbro PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal immunology*. 2012;5(1):7-18.
9. Tang L, Gu S, Gong Y, Li B, Lu H, Li Q, et al. Clinical significance of the correlation between changes in the major intestinal bacteria species and COVID-19 severity. *Engineering*. 2020;6(10):1178-84.

10. She J, Jiang J, Ye L, Hu L, Bai C, Song Y. 2019 novel coronavirus of pneumonia in Wuhan, China: emerging attack and management strategies. *J Clinical translational medicine*. 2020;9(1):1-7.

11. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*. 2020;5(4):536-44.

12. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2020;91(1):157-60.

13. Маньковський Б, Галушко О. Чому хворі на цукровий діабет мають гірші результати в лікуванні COVID 19?(аналітичний огляд і практичні рекомендації). *Здоров'я суспільства*. 2020:37-45.

14. Hafidh K, Abbas S, Khan A, Kazmi T, Nazir Z, Aldaham T. The Clinical Characteristics and Outcomes of COVID-19 Infections in Patients with Diabetes at a Tertiary Care Center in the UAE. *Dubai Diabetes and Endocrinology Journal*. 2021;26(4):158-63.

15. Li H, Tian S, Chen T, Cui Z, Shi N, Zhong X, et al. Newly diagnosed diabetes is associated with a higher risk of mortality than known diabetes in hospitalized patients with COVID-19. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2020;22(10):1897-906.

16. Shi Q, Zhang X, Jiang F, Zhang X, Hu N, Bimu C, et al. Clinical Characteristics and Risk Factors for Mortality of COVID-19 Patients With Diabetes in Wuhan, China: A Two-Center, Retrospective Study. *Diabetes Care*. 2020;43(7):1382-91.

17. Shrestha DB, Budhathoki P, Raut S, Adhikari S, Ghimire P, Thapaliya S, et al. New-onset diabetes in COVID-19 and clinical outcomes: A systematic review and meta-analysis. *World journal of virology*. 2021;10(5):275-87.

18. Chatterjee S, Ghosh R, Biswas P, Dubey S, Guria RT, Sharma CB, et al. COVID-19: the endocrine opportunity in a pandemic. *Minerva endocrinologica*. 2020;45(3):204-27.

19. Ждан ВМ, Бабаніна МЮ, Боряк ХР, Кир'ян ОА, Ткаченко МВ. Особливості патогенезу, перебігу і терапії пневмонії при COVID-19. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2022.
20. Чабан Т, Бочаров В, Солтик С. Порушення судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу у хворих на COVID-19 із супутнім цукровим діабетом. Одеський медичний журнал. 2022;50.
21. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Henry BM. Response to: Is newly diagnosed diabetes a stronger risk factor than pre-existing diabetes for COVID-19 severity? *J Diabetes*. 2021;13(2):179-80.
22. Ceriello A. Hyperglycemia and COVID-19: What was known and what is really new? *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;167:108383.
23. Chen J, Wu C, Wang X, Yu J, Sun Z. The Impact of COVID-19 on Blood Glucose: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:574541.
24. Guo W, Li M, Dong Y, Zhou H, Zhang Z, Tian C, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2020;36(7):e3319.
25. Al-Salameh A, Lanoix JP, Bennis Y, Andrejak C, Brochot E, Deschasse G, et al. Characteristics and outcomes of COVID-19 in hospitalized patients with and without diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2021;37(3):e3388.
26. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(6):102537.
27. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *The Journal of infection*. 2020;81(1):e6-e12.

28. Bornstein SR, Rubino F, Khunti K, Mingrone G, Hopkins D, Birkenfeld AL, et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19. *J The lancet Diabetes endocrinology*. 2020;8(6):546-50.

29. Shang J, Wang Q, Zhang H, Wang X, Wan J, Yan Y, et al. The Relationship Between Diabetes Mellitus and COVID-19 Prognosis: A Retrospective Cohort Study in Wuhan, China. *The American journal of medicine*. 2021;134(1):e6-e14.

30. Roca-Ho H, Riera M, Palau V, Pascual J, Soler MJ. Characterization of ACE and ACE2 Expression within Different Organs of the NOD Mouse. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(3).

31. Bode B, Garrett V, Messler J, McFarland R, Crowe J, Booth R, et al. Glycemic Characteristics and Clinical Outcomes of COVID-19 Patients Hospitalized in the United States. *Journal of diabetes science and technology*. 2020;14(4):813-21.

32. Zhu L, She ZG, Cheng X, Qin JJ, Zhang XJ, Cai J, et al. Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2020;31(6):1068-77.e3.

33. Smith SM, Boppana A, Traupman JA, Unson E, Maddock DA, Chao K, et al. Impaired glucose metabolism in patients with diabetes, prediabetes, and obesity is associated with severe COVID-19. *Journal of medical virology*. 2021;93(1):409-15.

34. Gupta R, Ghosh A, Singh AK, Misra A. Clinical considerations for patients with diabetes in times of COVID-19 epidemic. *J Diabetes metabolic syndrome*. 2020;14(3):211.

35. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2008;358(24):2545-59.

36. McCoy RG, Lipska KJ, Yao X, Ross JS, Montori VM, Shah ND. Intensive Treatment and Severe Hypoglycemia Among Adults With Type 2 Diabetes. *JAMA internal medicine*. 2016;176(7):969-78.
37. Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *The New England journal of medicine*. 2009;360(13):1283-97.
38. Haltmeier T, Benjamin E, Beale E, Inaba K, Demetriades D. Insulin-Treated Patients with Diabetes Mellitus Undergoing Emergency Abdominal Surgery Have Worse Outcomes than Patients Treated with Oral Agents. *World journal of surgery*. 2016;40(7):1575-82.
39. Brundage SI, Kirilcuk NN, Lam JC, Spain DA, Zautke NA. Insulin increases the release of proinflammatory mediators. *The Journal of trauma*. 2008;65(2):367-72.
40. Yu B, Li C, Sun Y, Wang DW. Insulin treatment is associated with increased mortality in patients with COVID-19 and type 2 diabetes. *J Cell metabolism*. 2021;33(1):65-77. e2.
41. Salvatore T, Pafundi PC, Morgillo F, Di Liello R, Galiero R, Nevola R, et al. Metformin: An old drug against old age and associated morbidities. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;160:108025.
42. Romero R, Erez O, Hüttemann M, Maymon E, Panaitescu B, Conde-Agudelo A, et al. Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2017;217(3):282-302.
43. Piskovatska V, Storey KB, Vaiserman AM, Lushchak O. The Use of Metformin to Increase the Human Healthspan. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020;1260:319-32.
44. Schuiveling M, Vazirpanah N, Radstake T, Zimmermann M, Broen JCA. Metformin, A New Era for an Old Drug in the Treatment of Immune Mediated Disease? *Curr Drug Targets*. 2018;19(8):945-59.

45. Ba W, Xu Y, Yin G, Yang J, Wang R, Chi S, et al. Metformin inhibits pro-inflammatory responses via targeting nuclear factor- κ B in HaCaT cells. *Cell biochemistry and function*. 2019;37(1):4-10.
46. Ouyang J, Isnard S, Lin J, Fombuena B, Marette A, Routy B, et al. Metformin effect on gut microbiota: insights for HIV-related inflammation. *AIDS research and therapy*. 2020;17(1):10.
47. Yew WW, Chang KC, Chan DP, Zhang Y. Metformin as a host-directed therapeutic in tuberculosis: Is there a promise? *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2019;115:76-80.
48. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(8):1167-74.
49. Bendib I, de Chaisemartin L, Granger V, Schlemmer F, Maitre B, H \ddot{u} e S, et al. Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome. *Anesthesiology*. 2019;130(4):581-91.
50. Menegazzo L, Scattolini V, Cappellari R, Bonora BM, Albiero M, Bortolozzi M, et al. The antidiabetic drug metformin blunts NETosis in vitro and reduces circulating NETosis biomarkers in vivo. *Acta diabetologica*. 2018;55(6):593-601.
51. Bangi S, Barve R, Qamar A. Protective Effects of CVD and DM Medications in SARS-CoV-2 Infection. *SN comprehensive clinical medicine*. 2020;2(9):1296-8.
52. Zhang J, Dong J, Martin M, He M, Gongol B, Marin TL, et al. AMP-activated Protein Kinase Phosphorylation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Endothelium Mitigates Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2018;198(4):509-20.
53. Sharma L, Chang D, Dela Cruz CS. Does inflammation help during COVID-19? *ERJ open research*. 2020;6(4).

54. Eaton AF, Merkulova M, Brown D. The H(+)-ATPase (V-ATPase): from proton pump to signaling complex in health and disease. *American journal of physiology Cell physiology*. 2021;320(3):C392-c414.
55. Esam Z. A proposed mechanism for the possible therapeutic potential of Metformin in COVID-19. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;167:108282.
56. Scheen AJ. [Obesity and risk of severe COVID-19]. *Revue medicale suisse*. 2020;16(695):1115-9.
57. Parthasarathy H, Tandel D, Siddiqui AH, Harshan KH. Metformin suppresses SARS-CoV-2 in cell culture. *Virus research*. 2022;323:199010.
58. Bramante CT, Beckman KB, Mehta T, Karger AB, Odde DJ, Tignanelli CJ, et al. Metformin reduces SARS-CoV-2 in a Phase 3 Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. 2023:2023.06.06.23290989.
59. Ventura-López C, Cervantes-Luevano K, Aguirre-Sánchez JS, Flores-Caballero JC, Alvarez-Delgado C, Bernaldez-Sarabia J, et al. Treatment with metformin glycinate reduces SARS-CoV-2 viral load: An in vitro model and randomized, double-blind, Phase Iib clinical trial. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2022;152:113223.
60. Reis G, Dos Santos Moreira Silva EA, Medeiros Silva DC, Thabane L, Cruz Milagres A, Ferreira TS, et al. Effect of early treatment with metformin on risk of emergency care and hospitalization among patients with COVID-19: The TOGETHER randomized platform clinical trial. *Lancet regional health Americas*. 2022;6:100142.
61. Kamyshnyi O, Matskevych V, Lenchuk T, Strilbytska O, Storey K, Lushchak O. Metformin to decrease COVID-19 severity and mortality: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;144:112230.
62. Putilin DA, Evchenko SY, Fedoniuk LY, Tokarsky OS, Kamyshny OM, Migenko LM, et al. The Influence of Metformin to the Transcriptional

Activity of the mTOR and FOX3 Genes in Parapancreatic Adipose Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Life*. 2020;13(1):50-5.

63. Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, et al. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*. 2013;154(10):3552-64.

64. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(9):1345-60.

65. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(6):3299-303.

66. Palmer CS, Hussain T, Duette G, Weller TJ, Ostrowski M, Sada-Ovalle I, et al. Regulators of Glucose Metabolism in CD4(+) and CD8(+) T Cells. *International reviews of immunology*. 2016;35(6):477-88.

67. Камишний О, Путілін Д, Сухомлінова І, Камишна В. Імунометаболізм лімфоцитів і його зміни при експериментальному цукровому діабеті. *Патологія*. 2016(3):102-8.

68. Basu S, Hubbard B, Shevach EM. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97(2):279-83.

69. Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, et al. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(5):2090-108.

70. Pollizzi KN, Powell JD. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends in immunology*. 2015;36(1):13-20.

71. Hardie DG, Ashford ML. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2014;29(2):99-107.

72. Liu Y, Zhang DT, Liu XG. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *International reviews of immunology*. 2015;34(1):50-66.
73. Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1295-311.
74. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65-74.
75. Blander JM, Longman RS, Iliev ID, Sonnenberg GF, Artis D. Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nature immunology*. 2017;18(8):851-60.
76. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*. 2006;312(5778):1355-9.
77. Khan I, Ullah N, Zha L, Bai Y, Khan A, Zhao T, et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. *Pathogens*. 2019;8(3):126.
78. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331(6015):337-41.
79. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*. 2011;34(5):794-806.
80. Wyss M, Brown K, Thomson CA, Koegler M, Terra F, Fan V, et al. Using precisely defined in vivo microbiotas to understand microbial regulation of IgE. *Frontiers in immunology*. 2020;10:3107.
81. Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens*. 2013;5(1):1-8.

82. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232-6.

83. Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* produces butyrate to maintain Th17/Treg balance and to ameliorate colorectal colitis by inhibiting histone deacetylase 1. *Inflammatory bowel diseases*. 2018;24(9):1926-40.

84. Ferreira-Halder CV, de Sousa Faria AV, Andrade SS. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2017;31(6):643-8.

85. Quévrain E, Maubert M, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*. 2016;65(3):415-25.

86. Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, et al. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- κ B pathway. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:114.

87. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, et al. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39⁺ Foxp3⁺ T cells and Treg function. *Gut microbes*. 2015;6(4):234-42.

88. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, et al. MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells. *Science*. 2015;349(6251):993-7.

89. Kuczma MP, Szurek EA, Cebula A, Chassaing B, Jung Y-J, Kang S-M, et al. Commensal epitopes drive differentiation of colonic Tregs. *Science advances*. 2020;6(16):eaaz3186.

90. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine*. 2017;23(1):107-13.
91. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, et al. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ + regulatory T cells. *Science*. 2015;349(6251):993-7.
92. Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*. 2017;358(6361):359-65.
93. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019;565(7741):600-5.
94. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-98.
95. Lee J-Y, Hall JA, Kroehling L, Wu L, Najar T, Nguyen HH, et al. Serum amyloid A proteins induce pathogenic Th17 cells and promote inflammatory disease. *Cell*. 2020;180(1):79-91. e16.
96. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell*. 2015;163(2):367-80.
97. Ansaldo E, Slayden LC, Ching KL, Koch MA, Wolf NK, Plichta DR, et al. *Akkermansia muciniphila* induces intestinal adaptive immune responses during homeostasis. *Science*. 2019;364(6446):1179-84.
98. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2020;17(4):223-37.

99. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-50.
100. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73.
101. Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, et al. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity*. 2015;43(4):817-29.
102. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2008;455(7214):808-12.
103. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107-18.
104. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 2008;453(7195):620-5.
105. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(27):12204-9.
106. Shen Y, Torchia MLG, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell host & microbe*. 2012;12(4):509-20.
107. Dasgupta S, Erturk-Hasdemir D, Ochoa-Reparaz J, Reinecker H-C, Kasper DL. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell host & microbe*. 2014;15(4):413-23.

108. Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AH, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*. 2016;352(6289):1116-20.
109. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M, et al. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity*. 2009;30(4):471-2; author reply 2-3.
110. Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, et al. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *The Journal of Immunology*. 2012;189(6):2869-78.
111. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab*. 2013;17(2):225-35.
112. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*^{-/-} mice. *Nature*. 2012;487(7405):104-8.
113. Kunisawa J, Hashimoto E, Ishikawa I, Kiyono H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PloS one*. 2012;7(2):e32094.
114. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128-39.
115. Xu K, Cai H, Shen Y. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*. 1–12.
116. Zuo T, Zhang F, Lui GC, Yeoh YK, Li AY, Zhan H, et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology*. 2020;159(3):944-55. e8.

117. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021;70(4):698-706.
118. Dumas A, Bernard L, Poquet Y, Lugo-Villarino G, Neyrolles O. The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases. *Cellular microbiology*. 2018;20(12):e12966.
119. Candela M, Biagi E, Soverini M, Consolandi C, Quercia S, Severgnini M, et al. Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *British Journal of Nutrition*. 2016;116(1):80-93.
120. Sedighi M, Razavi S, Navab-Moghadam F, Khamseh ME, Alaei-Shahmiri F, Mehrtash A, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microbial pathogenesis*. 2017;111:362-9.
121. Le TKC, Hosaka T, Nguyen TT, Kassu A, Dang TO, Tran HB, et al. Bifidobacterium species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine profile in diabetic mice. *Biomedical Research*. 2015;36(1):63-70.
122. Moya-Pérez A, Neef A, Sanz Y. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet-fed mice. *PLoS one*. 2015;10(7):e0126976.
123. Kikuchi K, Othman MB, Sakamoto K. Sterilized bifidobacteria suppressed fat accumulation and blood glucose level. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;501(4):1041-7.
124. Aoki R, Kamikado K, Suda W, Takii H, Mikami Y, Suganuma N, et al. A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.

125. Yang J, Lee Y, Kim Y, Lee S, Ryu S, Fukuda S, et al. Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. *Mucosal immunology*. 2017;10(1):104-16.
126. Gauffin Cano P, Santacruz A, Moya Á, Sanz Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. 2012.
127. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PloS one*. 2013;8(8):e71108.
128. Greer RL, Dong X, Moraes AC, Zielke RA, Fernandes GR, Peremyslova E, et al. *Akkermansia muciniphila* mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. *Nat Commun*. 2016;7:13329.
129. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*. 2005;308(5728):1635-8.
130. Lê K-A, Li Y, Xu X, Liu T, Yang W, He F, et al. Alterations in fecal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in type 2 diabetic patients in Southern China population. *Frontiers in physiology*. 2013;3:496.
131. Ma Q, Li Y, Li P, Wang M, Wang J, Tang Z, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;117:109138.
132. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015;7(4):2839-49.
133. Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, et al. Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016;534(7606):213-7.

134. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014;9(7):e100778.
135. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*. 2010;5(2):e9085.
136. Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, O'Toole PW, et al. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes*. 2012;3(3):186-202.
137. Louis S, Tappu RM, Damms-Machado A, Huson DH, Bischoff SC. Characterization of the Gut Microbial Community of Obese Patients Following a Weight-Loss Intervention Using Whole Metagenome Shotgun Sequencing. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149564.
138. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nature medicine*. 2017;23(7):850-8.
139. Elbere I, Kalnina I, Silamikelis I, Konrade I, Zaharenko L, Sekace K, et al. Association of metformin administration with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers. *PloS one*. 2018;13(9):e0204317.
140. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99-103.
141. Bryrup T, Thomsen CW, Kern T, Allin KH, Brandslund I, Jørgensen NR, et al. Metformin-induced changes of the gut microbiota in healthy young men: results of a non-blinded, one-armed intervention study. *Diabetologia*. 2019;62(6):1024-35.

142. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528(7581):262-6.
143. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 2016;167(5):1339-53.e21.
144. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872-83.
145. Zhang H, Sparks JB, Karyala SV, Settlage R, Luo XM. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME journal*. 2015;9(3):770-81.
146. Collado MC, Derrien M, Isolauri E, de Vos WM, Salminen S. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(23):7767-70.
147. Caspary WF, Creutzfeldt W. Inhibition of bile salt absorption by blood-sugar lowering biguanides. *Diabetologia*. 1975;11(2):113-7.
148. Scarpello JH, Hodgson E, Howlett HC. Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(8):651-6.
149. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Corrales-Agudelo V, Velásquez-Mejía EP, Carmona JA, Abad JM, et al. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes Care*. 2017;40(1):54-62.
150. Huang F, Nilholm C, Roth B, Linninge C, Höglund P, Nyman M, et al. Anthropometric and metabolic improvements in human type 2 diabetes after

introduction of an Okinawan-based Nordic diet are not associated with changes in microbial diversity or SCFA concentrations. *International journal of food sciences and nutrition*. 2018;69(6):729-40.

151. Lee H, Lee Y, Kim J, An J, Lee S, Kong H, et al. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes*. 2018;9(2):155-65.

152. Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(19):5935-43.

153. Ryan PM, Patterson E, Carafa I, Mandal R, Wishart DS, Dinan TG, et al. Metformin and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Differentially Modulate the Intestinal Microbiota and Plasma Metabolome of Metabolically Dysfunctional Mice. *Canadian journal of diabetes*. 2020;44(2):146-55.e2.

154. Zheng J, Li H, Zhang X, Jiang M, Luo C, Lu Z, et al. Prebiotic Mannan-Oligosaccharides Augment the Hypoglycemic Effects of Metformin in Correlation with Modulating Gut Microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2018;66(23):5821-31.

155. Shin N-R, Lee J-C, Lee H-Y, Kim M-S, Whon TW, Lee M-S, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. 2014;63(5):727-35.

156. Scells H, Zuccon G, Koopman B, Deacon A, Azzopardi L, Geva S. Integrating the Framing of Clinical Questions via PICO into the Retrieval of Medical Literature for Systematic Reviews. *Proceedings of the 2017 ACM on Conference on Information and Knowledge Management*; Singapore, Singapore: Association for Computing Machinery; 2017. p. 2291–4.

157. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. 2021;372:n71.

158. McGuinness LA, Higgins JPT. Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. 2021;12(1):55-61.

159. Petakh P, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyiy A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina). 2022;76(5):329-32.

160. Petakh P, Loshak K, Kamyshnyi A. Hematological features of patients with type 2 diabetes depending on the variant of SARS-COV-2. Fiziologichnyi Zhurnal. 2023;69(1):35-42.

161. Petakh P. Laboratory characteristics among patients with type two diabetes (T2D) who were hospitalized with SARS-COV-2 infection during periods of DELTA and OMICRON variant predominance in the Transcarpatian region of Ukraine. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against Russian invaders Kyiv (15 -17June)-20222022. p. 73.

162. Tong X, Xu J, Lian F, Yu X, Zhao Y, Xu L, et al. Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a Multicenter, Randomized, Open Label Clinical Trial. mBio. 2018;9(3).

163. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. Nature medicine. 2018;24(12):1919-29.

164. Barendolts E, Green SJ, Eisenberg Y, Akbar A, Reddivari B, Layden BT, et al. Gut microbiota varies by opioid use, circulating leptin and oxytocin in African American men with diabetes and high burden of chronic disease. PLoS One. 2018;13(3):e0194171.

165. Ejtahed HS, Tito RY, Siadat SD, Hasani-Ranjbar S, Hoseini-Tavassol Z, Rymenans L, et al. Metformin induces weight loss associated with gut

microbiota alteration in non-diabetic obese women: a randomized double-blind clinical trial. *Eur J Endocrinol.* 2019;180(3):165-76.

166. Mueller NT, Differding MK, Zhang M, Maruthur NM, Juraschek SP, Miller ER, 3rd, et al. Metformin Affects Gut Microbiome Composition and Function and Circulating Short-Chain Fatty Acids: A Randomized Trial. *Diabetes Care.* 2021;44(7):1462-71.

167. Pastor-Villaescusa B, Plaza-Díaz J, Egea-Zorrilla A, Leis R, Bueno G, Hoyos R, et al. Evaluation of the gut microbiota after metformin intervention in children with obesity: A metagenomic study of a randomized controlled trial. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2021;134:111117.

168. Molina-Vega M, Picón-César MJ, Gutiérrez-Repiso C, Fernández-Valero A, Lima-Rubio F, González-Romero S, et al. Metformin action over gut microbiota is related to weight and glycemic control in gestational diabetes mellitus: A randomized trial. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2022;145:112465.

169. Petakh P. Gut microbiota changes in COVID-19 patients with Type 2 Diabetes: Potential Impact on Disease Progression. *Матеріали XX Міжнародної науково-практичної студентської конференції «Uzhhorod Medical Students Conference» 26-29 квітня 2023 Ужгород, 2023.* p. 138–9.

170. Petakh P. Exploring the link between gut microbiome and inflammation in Type 2 Diabetes and COVID-19: the potential of F/B ratio and metformin treatment. *Матеріали XXVII конгрес студентів та молодих учених «майбутнє за наукою» 10-12 квітня 2023.* p. 268.

171. Petakh P, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of metformin on the gut microbiota: A systematic review. *Molecular Metabolism.* 2023;77:101805.

172. Petakh P, Kamyshna I, Oksenysh V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19

Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2023;16(6):904.

173. Petakh P, Kobyliak N, Kamyshnyi A. Gut microbiota in patients with COVID-19 and type 2 diabetes: A culture-based method. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13.

174. Petakh P, Oksenysh V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;163:114892.

175. Petakh P, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Gene expression of protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (PRKAA1), solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1) and mechanistic target of rapamycin (MTOR) in metformin-treated type 2 diabetes patients with COVID-19: impact on inflammation markers. *Inflammopharmacology*. 2023.

176. Петак П. Експресія генів (PRKAA1, SLC2A1, MTOR) та маркери запалення у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та COVID-19: роль метформіну. Матеріали LXVI науково-практичної конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», 16-17 червня 2023 року. р. 133 – 4.

177. Leung TYM, Chan AYL, Chan EW, Chan VKY, Chui CSL, Cowling BJ, et al. Short- and potential long-term adverse health outcomes of COVID-19: a rapid review. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):2190-9.

178. Long H, Li J, Li R, Zhang H, Ge H, Zeng H, et al. Plasma glucose levels and diabetes are independent predictors for mortality in patients with COVID-19. *Epidemiology and infection*. 2022;150:e106.

179. Sharma P, Behl T, Sharma N, Singh S, Grewal AS, Albarrati A, et al. COVID-19 and diabetes: Association intensify risk factors for morbidity and mortality. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;151:113089.

180. Singh AK, Singh R. Hyperglycemia without diabetes and new-onset diabetes are both associated with poorer outcomes in COVID-19. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;167:108382.

181. Naveed Z, Velásquez García HA, Wong S, Wilton J, McKee G, Mahmood B, et al. Association of COVID-19 Infection With Incident Diabetes. *JAMA Network Open.* 2023;6(4):e238866-e.

182. Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *The New England journal of medicine.* 2021;384(8):693-704.

183. Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Yan J, Luna BM, Dekitani K, Bruhn K, et al. Diabetes Exacerbates Infection via Hyperinflammation by Signaling through TLR4 and RAGE. *mBio.* 2017;8(4).

184. Lisco G, De Tullio A, Giagulli VA, Guastamacchia E, De Pergola G, Triggiani V. Hypothesized mechanisms explaining poor prognosis in type 2 diabetes patients with COVID-19: a review. *Endocrine.* 2020;70(3):441-53.

185. Zhou T, Hu Z, Yang S, Sun L, Yu Z, Wang G. Role of adaptive and innate immunity in type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes research.* 2018;2018.

186. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. 2022;13.

187. Hou K, Wu Z-X, Chen X-Y, Wang J-Q, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2022;7(1):135.

188. Barlow GM, Mathur R. Type 2 Diabetes and the Microbiome. *Journal of the Endocrine Society.* 2022;7(2).

189. Zhou Z, Sun B, Yu D, Zhu C. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12.

190. Allali I, Bakri Y, Amzazi S, Ghazal H. Gut-lung axis in COVID-19. *J Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* 2021;2021.

191. Lui DTW, Chung MSH, Lau EHY, Lau KTK, Au ICH, Lee CH, et al. Analysis of All-Cause Hospitalization and Death Among Nonhospitalized Patients With Type 2 Diabetes and SARS-CoV-2 Infection Treated With Molnupiravir or Nirmatrelvir-Ritonavir During the Omicron Wave in Hong Kong. *JAMA Netw Open*. 2023;6(5):e2314393.

192. Halfmann PJ, Iida S, Iwatsuki-Horimoto K, Maemura T, Kiso M, Scheaffer SM, et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature*. 2022;603(7902):687-92.

193. Meng B, Abdullahi A, Ferreira I, Goonawardane N, Saito A, Kimura I, et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature*. 2022;603(7902):706-14.

194. Postler TS, Peng V, Bhatt DM, Ghosh S. Metformin selectively dampens the acute inflammatory response through an AMPK-dependent mechanism. *Scientific Reports*. 2021;11(1):18721.

195. Chen Y, Yang D, Cheng B, Chen J, Peng A, Yang C, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with diabetes and COVID-19 in association with glucose-lowering medication. *J Diabetes care*. 2020;43(7):1399-407.

196. Cheng X, Liu YM, Li H, Zhang X, Lei F, Qin JJ, et al. Metformin Is Associated with Higher Incidence of Acidosis, but Not Mortality, in Individuals with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2020;32(4):537-47.e3.

197. Farfan-Morales CN, Cordero-Rivera CD, Osuna-Ramos JF, Monroy-Muñoz IE, De Jesús-González LA, Muñoz-Medina JE, et al. The antiviral effect of metformin on zika and dengue virus infection. *Sci Rep*. 2021;11(1):8743.

198. Wiernsperger N, Al-Salameh A, Cariou B, Lalau JD. Protection by metformin against severe Covid-19: An in-depth mechanistic analysis. *Diabetes & metabolism*. 2022;48(4):101359.

199. Justice JN, Gubbi S, Kulkarni AS, Bartley JM, Kuchel GA, Barzilai N. A geroscience perspective on immune resilience and infectious diseases: a potential case for metformin. *GeroScience*. 2021;43(3):1093-112.
200. Carolyn TB, Kenneth BB, Tanvi M, Amy BK, David JO, Christopher JT, et al. Metformin reduces SARS-CoV-2 in a Phase 3 Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *medRxiv*. 2023:2023.06.06.23290989.
201. Bramante CT, Huling JD, Tignanelli CJ, Buse JB, Liebovitz DM, Nicklas JM, et al. Randomized Trial of Metformin, Ivermectin, and Fluvoxamine for Covid-19. 2022;387(7):599-610.
202. Assaad M, Hekmat-Joo N, Hosry J, Kassem A, Itani A, Dahabra L, et al. Insulin use in Type 2 diabetic patients: a predictive of mortality in covid-19 infection. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2022;14(1):85.
203. Toc DA, Mihaila RM, Botan A, Bobohalma CN, Ristoiu GA, Simut-Cacuci BN, et al. Enterococcus and COVID-19: The Emergence of a Perfect Storm? *J International Journal of Translational Medicine*. 2022;2(2):220-9.
204. Giacobbe DR, Labate L, Tutino S, Baldi F, Russo C, Robba C, et al. Enterococcal bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19: a case series. *Annals of medicine*. 2021;53(1):1779-86.
205. Gago J, Filardo TD, Conderino S, Magaziner SJ, Dubrovskaya Y, Inghima K, et al. Pathogen Species Is Associated With Mortality in Nosocomial Bloodstream Infection in Patients With COVID-19. *Open forum infectious diseases*. 2022;9(6):ofac083.
206. Righi E, Lambertenghi L, Gorska A, Sciammarella C, Ivaldi F, Mirandola M, et al. Impact of COVID-19 and Antibiotic Treatments on Gut Microbiome: A Role for Enterococcus spp. *J Biomedicine*. 2022;10(11):2786.
207. Guiton PS, Hannan TJ, Ford B, Caparon MG, Hultgren SJ. Enterococcus faecalis overcomes foreign body-mediated inflammation to establish urinary tract infections. *Infection and immunity*. 2013;81(1):329-39.

208. Strickertsson JAB, Desler C, Martin-Bertelsen T, Machado AMD, Wadstrøm T, Winther O, et al. Enterococcus faecalis Infection Causes Inflammation, Intracellular Oxphos-Independent ROS Production, and DNA Damage in Human Gastric Cancer Cells. *PLOS ONE*. 2013;8(4):e63147.
209. Sparo M, Delpech G, Batistelli S, Basualdo J. Immunomodulatory properties of cell wall extract from Enterococcus faecalis CECT7121. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2014;18(5):551-5.
210. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60.
211. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BA, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535(7612):376-81.
212. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The gut microbiota in prediabetes and diabetes: a population-based cross-sectional study. *Cell Metabolism*. 2020;32(3):379-90. e3.
213. Chen ML, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L, Yang J, et al. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*. 2016;7(2):e02210-15.
214. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009;9(4):311-26.
215. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. 2011;17(4):448-53.

216. Bao L, Zhang Y, Zhang G, Jiang D, Yan D. Abnormal proliferation of gut mycobiota contributes to the aggravation of Type 2 diabetes. *Commun Biol.* 2023;6(1):226.
217. Ouyang J, Isnard S, Lin J, Fombuena B, Murette A, Routy B, et al. Metformin effect on gut microbiota: insights for HIV-related inflammation. *AIDS research and therapy.* 2020;17(1):10.
218. Lee H, Kim J, An J, Lee S, Choi D, Kong H, et al. Downregulation of IL-18 Expression in the Gut by Metformin-induced Gut Microbiota Modulation. *Immune network.* 2019;19(4):e28.
219. Zhang Q, Su X, Zhang C, Chen W, Wang Y, Yang X, et al. *Klebsiella pneumoniae* Induces Inflammatory Bowel Disease Through Caspase-11–Mediated IL18 in the Gut Epithelial Cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2023;15(3):613-32.
220. Motta C, Salmeri M, Anfuso CD, Amodeo A, Scalia M, Toscano MA, et al. *Klebsiella pneumoniae* induces an inflammatory response in an in vitro model of blood-retinal barrier. *Infection and immunity.* 2014;82(2):851-63.
221. Lee IA, Kim DH. *Klebsiella pneumoniae* increases the risk of inflammation and colitis in a murine model of intestinal bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2011;46(6):684-93.
222. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 β ; Stabilization during Pneumonia. 2016;7(5):10.1128/mbio.01397-16.
223. Dueñas-Castell C, Polanco-Guerra CJ, Martínez-Ávila MC, Almanza Hurtado AJ, Rodríguez Yanez T, Gutiérrez-Ariza JC, et al. When to Use Antibiotics in COVID-19: A Proposal Based on Questions. *Cureus.* 2022;14(7):e27398.
224. Bernard-Raichon L, Venzon M, Klein J, Axelrad JE, Zhang C, Sullivan AP, et al. Gut microbiome dysbiosis in antibiotic-treated COVID-19

patients is associated with microbial translocation and bacteremia. *Nature Communications*. 2022;13(1):5926.

225. Leite AZ, Rodrigues NdC, Gonzaga MI, Paiolo JCC, de Souza CA, Stefanutto NAV, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. 2017;8.

226. Al-Muhanna FA, Dowdell AK, Al Eleq AH, Albaker WI, Brooks AW, Al-Sultan AI, et al. Gut microbiota analyses of Saudi populations for type 2 diabetes-related phenotypes reveals significant association. *BMC microbiology*. 2022;22(1):301.

227. Jørgensen SF, Trøseid M, Kummen M, Anmarkrud JA, Michelsen AE, Osnes LT, et al. Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunology*. 2016;9(6):1455-65.

228. Stadlbauer V, Horvath A, Ribitsch W, Schmerböck B, Schilcher G, Lemesch S, et al. Structural and functional differences in gut microbiome composition in patients undergoing haemodialysis or peritoneal dialysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):15601.

229. Zouiouich S, Loftfield E, Huybrechts I, Viallon V, Louca P, Vogtman E, et al. Markers of metabolic health and gut microbiome diversity: findings from two population-based cohort studies. *Diabetologia*. 2021;64(8):1749-59.

230. Takezawa K, Fujita K, Matsushita M, Motooka D, Hatano K, Banno E, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human gut microbiota is associated with prostate enlargement. *The Prostate*. 2021;81(16):1287-93.

231. Jasirwan COM, Muradi A, Hasan I, Simadibrata M, Rinaldi I. Correlation of gut Firmicutes/Bacteroidetes ratio with fibrosis and steatosis stratified by body mass index in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Bioscience of microbiota, food and health*. 2021;40(1):50-8.

232. An J, Kwon H, Kim YJ. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Risk Factor of Breast Cancer. *Journal of clinical medicine*. 2023;12(6).
233. Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms*. 2020;8(11).
234. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC microbiology*. 2017;17(1):120.
235. Vaiserman A, Romanenko M, Piven L, Moseiko V, Lushchak O, Kryzhanovska N, et al. Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population. *BMC microbiology*. 2020;20(1):221.
236. Kusnadi Y, Saleh MI, Ali Z, Hermansyah H, Murti K, Hafy Z, et al. Firmicutes/Bacteroidetes Ratio of Gut Microbiota and Its Relationships with Clinical Parameters of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2023;11(F):67-72.
237. Almagadam BS, Liu Y, Chen S-m, Wang C-h, Shao C-y, Ren B-w, et al. Alterations of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes Individuals and the Confounding Effect of Antidiabetic Agents. *Journal of Diabetes Research*. 2020;2020:7253978.
238. Zhao L, Lou H, Peng Y, Chen S, Zhang Y, Li X. Comprehensive relationships between gut microbiome and faecal metabolome in individuals with type 2 diabetes and its complications. *Endocrine*. 2019;66(3):526-37.
239. Mańkowska-Wierzbicka D, Zuraszek J, Wierzbicka A, Gabryel M, Mahadea D, Batur A, et al. Alterations in Gut Microbiota Composition in Patients with COVID-19: A Pilot Study of Whole Hypervariable 16S rRNA Gene Sequencing. 2023;11(2):367.

240. Moreira-Rosário A, Marques C, Pinheiro H, Araújo JR, Ribeiro P, Rocha R, et al. Gut Microbiota Diversity and C-Reactive Protein Are Predictors of Disease Severity in COVID-19 Patients. 2021;12.

241. Karmaus PWF, Herrada AA, Guy C, Neale G, Dhungana Y, Long L, et al. Critical roles of mTORC1 signaling and metabolic reprogramming for M-CSF-mediated myelopoiesis. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(9):2629-47.

242. Mafi S, Mansoori B, Taeb S, Sadeghi H, Abbasi R, Cho WC, et al. mTOR-Mediated Regulation of Immune Responses in Cancer and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2021;12:774103.

243. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(5):325-38.

244. Lang F, Singh Y, Salker MS, Ma K, Pandya AA, Lang PA, et al. Glucose transport in lymphocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2020;472(9):1401-6.

245. Di Dedda C, Vignali D, Piemonti L, Monti P. Pharmacological Targeting of GLUT1 to Control Autoreactive T Cell Responses. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19).

246. Okayasu T, Tomizawa A, Suzuki K, Manaka K, Hattori Y. PPARalpha activators upregulate eNOS activity and inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation through AMP-activated protein kinase activation. *Life sciences*. 2008;82(15-16):884-91.

ДОДАТОК А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Petakh P**, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*. 2022;76(5):329-32. DOI: 10.5455/medarh.2022.76.329-332 (**Scopus; CiteScore 2.2; SCImago Q3 – Medicine (miscellaneous)**)
2. **Petakh P**, Loshak K, Kamyshnyi A. Hematological features of patients with type 2 diabetes depending on the variant of SARS-COV-2. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2023;69(1):35-42. DOI: 10.15407/fz69.01.035 (**Scopus; CiteScore 0.4; SCImago Q4 – Physiology**)
3. **Petakh P**, Kobyliak N, Kamyshnyi A. Gut microbiota in patients with COVID-19 and type 2 diabetes: A culture-based method. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Feb 9;13:1142578. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1142578 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 6.4; IF 5.7; SCImago Q1 – Infectious Diseases**)
4. **Petakh P**, Kamyshna I, Oksenyich V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Jun 20;16(6):904 DOI: 10.3390/ph16060904 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 4.7; IF 4.6; SCImago Q1 – Pharmaceutical Science**)
5. **Petakh P**, Oksenyich V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;163:114892. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114892 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 12.6; IF 7.5; SCImago Q1 – Medicine (miscellaneous)**)
6. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of metformin on the gut microbiota: A systematic review. *Mol Metab*. 2023 Sep 9;77:101805. DOI:

- 10.1016/j.molmet.2023.101805 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 12.6; IF 8.1; SCImago Q1 – Cell Biology**)
7. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Gene expression of protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (*PRKAA1*), solute carrier family 2 member 1 (*SLC2A1*) and mechanistic target of rapamycin (*MTOR*) in metformin-treated type 2 diabetes patients with COVID-19: impact on inflammation markers. *Inflammopharmacology*. 2023:1-7. DOI: 10.1007/s10787-023-01341-7 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 8.1; IF 5.8; SCImago Q1 – Pharmacology**)
 8. **Petakh P**, Kamyshna I, Nykyforuk A, Yao R, Imbery J, Oksenysh V, Korda M, Kamyshnyi A. Immunoregulatory Intestinal Microbiota and COVID-19 in Patients with Type Two Diabetes: A Double-Edged Sword. *Viruses* 2022, 14, 477. DOI: 10.3390/v14030477 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 7.1; IF 4.7; SCImago Q1 – Infectious Diseases**)
 9. **Petakh P**, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Unveiling the Potential Pleiotropic Effects of Metformin in Treating COVID-19: A Comprehensive Review. *Front. Mol. Biosci.* 2023;10:1260633. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1260633 (**Scopus & Web of Science; CiteScore 4.8; IF 5.0; SCImago Q1 – Biochemistry**)
 10. Petakh P. Laboratory characteristics among patients with type two diabetes (T2D) who were hospitalized with SARS-COV-2 infection during periods of DELTA andOMICRON variant predominance in the Transcarpatian region of Ukraine. In: Proceedings of all-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against Russian invaders; 2022 June 15-17; Kyiv. Kyiv. p. 73.
 11. Petakh P. Gut microbiota changes in COVID-19 patients with Type 2 Diabetes: Potential Impact on Disease Progression. В: Матеріали XX Міжнародної науково-практичної студентської конференції «Uzhhorod Medical Students Conference»; 2023 квітня 26-29; Ужгород. Ужгород; 2023, с. 138–9.

12. Petakh P. Exploring the link between gut microbiome and inflammation in Type 2 Diabetes and COVID-19: the potential of F/B ratio and metformin treatment. В: Матеріали XXVII конгрес студентів та молодих учених «майбутнє за наукою»; 2023 квітня 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2023, с.268.
13. Петах П.В. Експресія генів (PRKAA1, SLC2A1, MTOR) та маркери запалення у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та COVID-19: роль метформіну. В: Матеріали LXVI науково-практичної конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини»; 2023 черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль; 2023, с. 133-4.

ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against Russian invaders.(Kyiv, 15 -17 June 2022) (*публікація*).
2. LXVI науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 16-17 червня 2023 року). (*доповідь і публікація*).
3. XXVII конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023) (*публікація*).
4. XX Міжнародна науково-практична студентська конференція «Uzhhorod Medical Students Conference» (м. Ужгород, 26-29 квітня 2023) (*публікація*).

ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ДВНЗ «Ужгородський національний
університет»
професор Іван МИРОНІЮК

« 21 » вересня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** спосіб використання F/B (Firmicutes/Bacteroidetes) співвідношення для прогнозування рівнів С-реактивного протеїну в пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, майдан Волі 1, 46001;
3. **Джерело інформації:**
 - a) Petakh P, Kobyliak N, Kamyshnyi A. Gut microbiota in patients with COVID-19 and type 2 diabetes: A culture-based method. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Feb 9;13:1142578. doi: 10.3389/fcimb.2023.1142578.
 - b) Petakh P, Kamyshna I, Nykyforuk A, Yao R, Imbery JF, Oksenyich V, Korda M, Kamyshnyi A. Immunoregulatory Intestinal Microbiota and COVID-19 in Patients with Type Two Diabetes: A Double-Edged Sword. Viruses. 2022 Feb 25;14(3):477. doi: 10.3390/v14030477.
 - c) Petakh P, Oksenyich V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. Biomed Pharmacother. 2023 Jul;163:114892. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114892.
 - d) Pavlo Petakh, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin on the Gut Microbiota: A Systematic Review. Mol Metab. 2023 Sep 9:101805. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101805.
 - e) Petakh P, Kamyshna I, Oksenyich V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Jun 20;16(6):904. doi: 10.3390/ph16060904.
 - f) Petakh P, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyiy A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. Med Arch. 2022 Oct;76(5):329-332. doi: 10.5455/medarh.2022.76.329-332.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра біохімії та фармакології ДВНЗ «Ужгородський національний університет».
5. **Терміни впровадження:** вересень 2023 р. – червень 2024 р.
6. **Форма впровадження:** у наукову роботу (застосування методики), навчальний процес (матеріали лекцій, практичних занять, самостійної роботи).
7. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань здобувачів вищої освіти стосовно плейотропних ефектів метформіну та його використання у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу.

Завідувачка кафедри
біохімії та фармакології
ДВНЗ «Ужгородський національний
університет»,
к.мед.н., доцентка

Лариса РОСТОКА

ДОДАТОК В.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 ДВНЗ «Ужгородський національний
 університет»
 професор Іван МИРОШКО
 « 21 » вересня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** використання плейотропних властивостей метформіну (вплив на імунометаболізм лімфоцитів та модулювання кишкової мікробіоти) для лікування COVID-19 у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, майдан Волі 1, 46001;
3. **Джерело інформації:**
 - a) Petakh P, Kobyliak N, Kamyshnyi A. Gut microbiota in patients with COVID-19 and type 2 diabetes: A culture-based method. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Feb 9;13:1142578. doi: 10.3389/fcimb.2023.1142578.
 - b) Petakh P, Kamyshna I, Nykyforuk A, Yao R, Imbery JF, Oksenysh V, Korda A, Kamyshnyi A. Immunoregulatory Intestinal Microbiota and COVID-19 in Patients with Type Two Diabetes: A Double-Edged Sword. *Viruses.* 2022 Feb 25;14(3):477. doi: 10.3390/v14030477.
 - c) Petakh P, Oksenysh V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. *Biomed Pharmacother.* 2023 Jul;163:114892. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114892.
 - d) Pavlo Petakh, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin on the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Mol Metab.* 2023 Sep 9:101805. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101805.
 - e) Petakh P, Kamyshna I, Oksenysh V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Jun 20;16(6):904. doi: 10.3390/ph16060904.
 - f) Petakh P, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. *Med Arch.* 2022 Oct;76(5):329-332. doi: 10.5455/medarh.2022.76.329-332.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра факультетської терапії ДВНЗ «Ужгородський національний університет».
5. **Терміни впровадження:** вересень 2023 р. – червень 2024 р.
6. **Форма впровадження:** навчальний процес (матеріали лекцій, практичних занять, самостійної роботи).
7. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань здобувачів вищої освіти стосовно плейотропних ефектів метформіну та їх використання у пацієнтів з COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу.

Завідувачка кафедри
 факультетської терапії
 ДВНЗ «Ужгородський національний
 університет»,
 д.мед.н., професорка



Марія ДЕРБАК

ДОДАТОК В.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о Директора КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня» Закарпатської обласної ради
Михайло ПОЛЯК

«24» жовтня 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Пропозиції для впровадження:** призначення метформіну в стандартній дозі 1000 мг на добу для лікування пацієнтів із COVID-19 та цукровим діабетом 2-го типу (ЦД-2)
- Заклад, що його розробив, поштова адреса:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, майдан Волі 1, 46001;
Автори: Петак Павло Владиславович
- Джерело інформації:**
 - Petakh P, Oksenykh V, Kamyshnyi A. The F/B ratio as a biomarker for inflammation in COVID-19 and T2D: Impact of metformin. Biomed Pharmacother. 2023 Jul;163:114892. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114892.
 - Pavlo Petakh, Kamyshna I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin on the Gut Microbiota: A Systematic Review. Mol Metab. 2023 Sep 9:101805. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101805.
 - Petakh P, Kamyshna I, Oksenykh V, Kainov D, Kamyshnyi A. Metformin Therapy Changes Gut Microbiota Alpha-Diversity in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes: The Role of SARS-CoV-2 Variants and Antibiotic Treatment. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Jun 20;16(6):904. doi: 10.3390/ph16060904.
 - Petakh P, Griga V, Mohammed IB, Loshak K, Poliak I, Kamyshnyi A. Effects of Metformin, Insulin on Hematological Parameters of COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes. Med Arch. 2022 Oct;76(5):329-332. doi: 10.5455/medarh.2022.76.329-332.

4. **Де впроваджено:** КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня» Закарпатської обласної ради5. **Терміни впровадження:** вересень 2023 р. – грудень 2023 р.6. **Загальна кількість спостережень:** 32

7. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, як закладені в джерелі інформації:** Метформін – гіпоглікемічний лікарський засіб із плейотропними властивостями, фармакологічні ефекти, якого далеко виходять за межі зниження рівня глюкози та включають в себе – модуляцію кишкової мікробіоти, вплив на імунометаболізм лімфоцитів, що потенційно має вплив на більш швидке одужання пацієнтів із COVID-19 та ЦД-2. Згідно з нашим дослідженням, пацієнти із COVID-19 та ЦД-2, котрі приймали метформін у дозі 1000 мг на добу мали в 2 рази нижчі рівні С-реактивного протеїну ніж пацієнти котрі приймали іншу цукрознижчучу терапію.

| Показники | За даними авторів | За даними організації, що впроваджує |
|---------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Зменшення рівня СРП | 2,1 рази | 1,8 рази |

8. **Зауваження, пропозиції – немає**

Відповідальний за впровадження: В.о директора КНП «Обласна клінічна інфекційна лікарня» Закарпатської обласної ради



Михайло ПОЛЯК

«24» жовтня 2023 р.

ПОДЯКА

Під час написання цієї дисертації, я хочу висловити щиру подяку українським воїнам, які роблять усе можливе заради нашої перемоги та створили сприятливі умови для завершення написання цієї кваліфікаційної праці. Ваша сміливість і відважність є невичерпним джерелом натхнення для всіх нас.

Також я хочу висловити глибоку вдячність моїм батькам за їх безмежну підтримку, розуміння і любов, які завжди були поруч під час цього важкого наукового шляху. Ваша підтримка завжди мене надихала.

Зокрема, велика подяка моїм друзям за їх безмежну віру в мене та їх невтомну підтримку. Ваша дружба завжди була моїм найціннішим надбанням, і я безмежно вдячний за вашу присутність в моєму житті. Ви завжди були моїми найважливішими радниками і джерелом натхнення, і ця дисертація також належить вам. Дякую, що завжди вірили в мене і підтримували.

Спеціальна подяка висловлюється також моїм дорогим колегам з мікробіологічної лабораторії за їх неоціненну підтримку на моєму науковому шляху.

Не менш важливою була підтримка мого наукового керівника, якому я вдячний за свою наукову мудрість і наставництво. Ви допомогли мені визначити напрямки моєї роботи і вдосконалити свої навички як дослідника.

Також, величезна вдячність доктору Валентину Оксеничу (Бергенський університет) за його цінну підтримку і вклад у дослідження.

Наприкінці, я хочу висловити глибоку подяку Тернопільському національному медичному університету за неоціненну можливість наукового розвитку, що дало мені можливість реалізувати свій науковий потенціал та розвинутись як науковець.

Ця дисертація – результат колосальних зусиль, і я вдячний кожному, хто допомагав мені на цьому складному науковому шляху.