

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Soole mikroobikoosluse erinevused põletikulise soolehaigusega
patsientidel**

Magistritöö 30 EAP

Lisann Adamson

Juhendajad MSc Annabel Klemets

PhD Elin Org

TARTU 2024

INFOLEHT

Soole mikroobikoosluse erinevused põletikulise soolehaigusega patsientidel

Inimese soole mikrobioom on mitmekesine mikroorganismide kogum. Mikrobioom avaldab olulist mõju tervisele ja on seotud mitmete haiguste tekkega. Põletikuline soolehaigus (IBD) on seedetrakti krooniline põletikuline seisund, mille levimus on viimaste aastakümnete jooksul suurenenud. IBD puhul on oluline uurida soole mikrobioomi, et paremini mõista haiguse patogeneesi ja leida uusi ravimeetodeid. Töö käigus analüüsiti IBD-ga uuritavate ja tervete kontrollgrupi liikmete väljaheiteproovide mikroobikoosluse erinevusi. Tulemustest selgus, et uuritavate soole mikrobioomi mitmekesisus on sarnane, kuid esinevad mõned taksonoomilised erinevused IBD-ga patsientide ja kontrollide vahel. Paremate järelduste tegemiseks tuleks läbi viia metagenoomne analüüs, mis võimaldaks tuvastada täpsemaid mikroobikoosluste muutusi.

Märksõnad: mikrobioom, mikrobioota, põletikuline soolehaigus, 16S rRNA sekveneerimine

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Differences in gut microbiota in patients with inflammatory bowel disease

The human gut microbiome is a diverse collection of microorganisms, containing thousands of bacterial species. The microbiome significantly impacts human health and is associated with the development of various diseases. Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic condition of the gastrointestinal tract, and its prevalence has increased in recent decades. To understand the pathogenesis of IBD and find new treatment methods, it is important to study the gut microbiome. In this study, the composition of the microbiome in fecal samples from individuals with IBD was analyzed and compared with the healthy controls. The results revealed that while the overall gut microbiome diversity of the subjects is similar, there are some statistically significant differences between the IBD group and the controls. To draw more detailed conclusions it would be possible to carry out a metagenome analysis for identifying more specific changes in the gut microbiome.

Keywords: microbiome, microbiota, Inflammatory Bowel Disease, 16S rRNA sequencing

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Põletikuline soolehaigus (IBD)	7
1.2 Soolestiku mikrobiom.....	9
1.3 Mikrobioomi analüüsimine.....	11
1.4 Soolestiku mikrobiom ja IBD.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjal ja meetodika.....	15
2.2.1 Uuringu valimi moodustamine	15
2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA sekveneerimine.....	17
2.2.3 Mikroobikoosluse määramine	17
2.2.4 Andmete statistiline analüüs.....	18
2.3 Tulemused	19
2.3.1 Soole mikroobikoosluse erinevused uuringugruppide vahel.....	19
2.3.2 Mikrobioomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uuringugruppide vahel	21
2.3.3 Soole mikrobioomis leiduvate bakteriperekondade võrdlus uuringugruppide vahel ..	23
2.4 Arutelu	24
KOKKUVÕTE	27
RESÜMEE / SUMMARY	28
TÄNUSÕNAD	30

KIRJANDUSE LOETELU.....	31
KASUTATUD VEEBIAADDRESSID.....	44
LISAD	45
LISA 1	45
LISA 2	48
LISA 3	49
LISA 4	50
LISA 5	51
LISA 6	52
LISA 7	53
LISA 8	54
LISA 9	55
LIHTLITSENTS.....	56

KASUTATUD LÜHENDID

ASV – ampliconjärjestuste variandid (ingl k *amplicon sequence variant*)

CD – Crohni tõbi (ingl k *Crohn's disease*)

UC – haavandiline koliit (ingl k *ulcerative colitis*)

IBD – põletikuline soolehaigus (ingl k *inflammatory bowel disease*)

5-ASA – 5-aminosalitsüülhape (ingl k *aminosalicylic acid*)

SCFA – lühikese ahelaga rasvhapped (ingl k *short chain fatty acid*)

PCA – peakomponentanalüüs (ingl k *principal component analysis*)

CLR – keskmistatud logaritmiline suhe (ingl k *centered log ratio*)

SISSEJUHATUS

Mikrobioom on mitmekesine kooslus mikroorganismidest, mis paikneb inimese soolestikus ja mitmetes teistes kehapiirkondades. Soole mikrobioom hõlmab baktereid, viiruseid, seeni ja eukarüoote. Soole mikroobikooslusesse kuulub tuhandeid erinevaid bakteriliike. Iga inimese mikrobioom on unikaalne, kuid see võib ajas muutuda mitmete sise- ja väliskeskkonna tegurite mõjul. Mikrobioom on oluline, kuna mõjutab tervist mitmel viisil (Qiu *et al.*, 2022).

Põletikuline soolehaigus (IBD) on seedetrakti krooniline põletikuline seisund, mis tuleneb muuhulgas ka soolestiku mikroobide ja immuunsüsteemi vahelisest muutunud interaktsioonist. Kaks peamist IBD alatüüpi, haavandiline koliit (UC) ja Crohni tõbi (CD), paiknevad vastavalt jäme- ja peensooles. Põletikuline soolehaigus on komplekshaigus, mille esinemist mõjutavad nii geneetiline eelsoodumus kui ka elu- ja keskkonnatingimused. IBD levimus on viimaste aastakümnete jooksul maailmas suurenenud, mõjutades järjest rohkem nooremaid inimesi (Konidari *et al.*, 2021) ning suurenenud haigestumist seostatakse muutunud elukeskkonna ja elustiiliga. Põletikulise soolehaiguse väljakujunemist mõjutab ka soolestiku mikrobioom, kuna soolestiku mikroorganismidel on oluline roll immuunsüsteemi arengule ja talitlusele. Eelnevalt on põletikulise soolehaiguse puhul tuvastatud soole mikroobide mitmekesisuse vähenemist kui ka spetsiifiliste mikroobide arvukuse muutusi (Franzosa *et al.*, 2019). IBD erinevaid alatüüpe (UC ja CD) iseloomustavad ainulaadsed mikroobsed tunnused (Malik, 2015). Põletikulise soolehaiguse täpsem uurimine on vajalik, et leida uusi aspekte haiguse diagnoosimisel ja saavutada paremaid ravitulemusi.

Sellest tulenevalt oli magistritöö eesmärgiks analüüsida põletikulise soolehaigusega uuritavate väljaheiteproovide mikroobikooslust, kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 regiooni sekveneerimist ning võrrelda põletikulise soolehaiguste patsientide ja tervete kontrollgrupi liikmete soole mikrobioomi koosluste erinevusi.

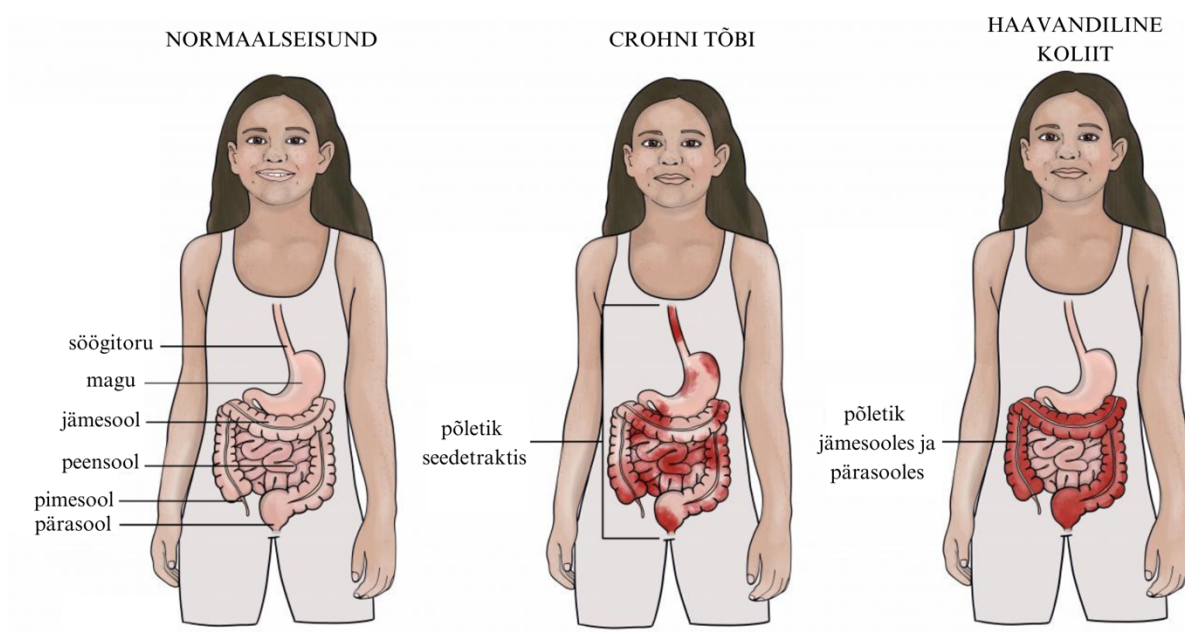
Käesolev töö on valminud biomeditsiini magistriõppekava raames Tartu Ülikooli loodus- ja täppiseaduste valdkonna genoomika instituudi Eesti geenivaramu teaduskeskuse mikrobioomika uurimisgrupis. Uuringule on antud nõusolek TÜ inimuuringute eetikakomiteest (taotluse nr 337/T-26).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Põletikuline soolehaigus (IBD)

Põletikuline soolehaigus (ingl k *inflammatory bowel diseases*, IBD) on krooniline soolt haarav autoimmuunhaigus, kus inimorganismi immuunsüsteem ründab enda kudesid (Kaistha & Levine, 2014). Tegemist on ülemaailmse terviseprobleemiga, mille esinemissagedus järjest suureneb (Zhang & Li, 2014). Krooniline põletik võib mõjutada erinevaid sooleosi alates peensoolest kuni jämesoole ja päarakuni (Qiu *et al.*, 2022). Haiguse tekkepõhjus ei ole veel lõplikult selge. Patogeneesi keskseks mehhanismiks loetakse peremeesorganismi geneetilist eelsoodumust, soolestiku mikrobiomi ja väliskeskkonnategureid (Lakatos & Burisch, 2015). Põletikulist soolehaigust peetakse peremeesorganismi ja mikroorganismide koostoime tulemuseks. Mikroobse homöostaasi häirimine põhjustab oportunistlike patogeenide koloniseerumist ja invasiooni soolestikus, mis suurendab peremeesorganismi immuunvastuse riski ja soodustab IBD arengut (Qiu *et al.*, 2022).

Crohni tõbi (ingl k *Crohn's disease*, CD) ja haavandiline koliit (ingl k *ulcerative colitis*, UC) on kroonilised soolepõletikud, mis kuuluvad põletikuliste soolehaiguste alarühma (Ng *et al.*, 2017). Crohni tõbi ja haavandiline koliit on kliiniliselt eristatavad haigused, mõlema haiguse kliiniline pilt on väga varieeruv. Crohni tõvele on iseloomulik, et haigus/seisund võib kahjustada kogu sooletrakti, aga haavandiline koliit mõjutab pigem jämesoolt ja pärasoolt (**Joonis 1**). CD ja UC võivad organismis esineda nii eraldi kui ka koos (Mulder *et al.*, 2014). CD ja UC sümptomid on väga sarnased, sagedasti esinevad mõlema haiguse puhul kõhulahtisus, verine väljaheide, kaalulangus, kõhuvalu ja palavik. UC puhul esineb sagedasti ka dehüdratsiooni (vedeliku puudust) (U.S. Department of Health & Human Services, 2022). Tavaliselt diagnoositakse neid haiguseid 20ndates kuni 40ndates eluaastates, aga harvadel juhtudel võivad ilmnedagi lapse- või vanemas eas (Flynn & Eisenstein, 2019).



Joonis 1. Põletikulise soolehaiguse kliiniline pilt (illustreerivad kujutised <https://www.kidshealth.org.nz/inflammatory-bowel-disease>).

IBD on maailmas laialt levinud, näiteks 2019. aastal diagnoositi ligikaudu 4,9 miljonit IBD juhtu kogu maailmas. Kõige rohkem esines IBD juhtumeid Hiinas ja USA-s (Dharni *et al.*, 2023) ning IBD all kannatab ligikaudu 2,5 miljonit Euroopa elanikku. Haiguse levimus on kasvamas igal pool maailmas (Kaplan, 2015). Varem arvati, et haiguste esinemine on iseloomulik arenenud riikides, aga viimasel ajal on tähele pandud haiguste sagenemist ka Lõuna- ja Ida-Euroopas, kus varem oli haigestumine madal (Burisch & Munkholm, 2013). Euroopa Crohni tõve ja haavandilise koliidi organisatsiooni (European Crohn's and Colitis Organisation, ECCO) alakomitee (The Epidemiology Committee, EpiCom) korraldas 2010. aastal kohortuuringu, mille eesmärk oli hinnata põletikulise soolehaiguse levimust Euroopas. Selles uuringus osales ka Tartu Ülikooli Kliinikum. Tuli välja, et Eestis oli haigestumus nii haavandilisse koliiti kui ka Crohni tõppe 5,2 juhtu 100 000 inimese kohta (Arst, 2016). Varasematel aastatel (1993-1998) läbi viidud uuringus olid need numbrid palju madalamad, haavandilisse koliiti haigestus 1,7 ja Crohni tõppe 1,4 juhtu 100 000 inimese kohta. See näitab, et ka Eestis on haigestumine põletikulisse soolehaigusesse kasvanud (Salupere, 2001).

IBD diagnoositakse kliiniliste sümptomite, vereanalüüside, pildiagnostika, endoskoopia ja soolebiopsia histoloogiliste uuringute alusel, näiteks kalprotektiini analüüs väljaheites võimaldab hinnata sooles esinevat põletikku (Arst, 2022). Kalprotektiin on valk, mis seob

kaltsiumi ja tsinki ning peamiselt pärineb neutrofiilsete granulotsüütide tsütoplasmas, kuid esineb ka vähesel määral aktiveerunud monotsüütide ja makrofaagide tsütoplasmas. Sooletrakti põletiku korral eritub kalprotektiin, mis on pärit sooleseina migreerunud aktiveerunud põletikurakkudest ja selle kogus väljaheites suureneb (Perearst, 2014). Haigussümptomid on patsientidele kurnavad ja need nõuavad eluaegset ravi, mis omakorda mõjutab elukvaliteeti. Praeguste teadmiste järgi pole põletikulist soolehaigust võimalik täielikult välja ravida, kuna tegemist on kroonilise haigusega. Ravi eesmärk on seega ennetada hilisemaid komplikatsioone (Arst, 2022).

IBD ravis kasutatakse 5-aminosalitsüülhappe preparaate (5-ASA), glükokortikosteroide, immunomodulaatoreid, bioloogilisi ravimeid ja harva ka kirurgilist ravi. 5-ASA preparaate kasutatakse kerge haavandilise koliidi ning Crohni tõve ägenemise korral (Perearst, 2014). Eestis on üha sagedamini kasutusel ka bioloogiline ravi, mis põhineb peamiselt monoklonaalsetel antikehade või liitvalkude, näiteks TNF- α vastased ained, kasutamisel. Tänu ravivõimaluste laienemisele on vähenenud patsientide arv, kellel on näidustatud kirurgiline ravi (de Mattos *et al.*, 2015).

1.2 Soolestiku mikroobioom ja seda mõjutavad tegurid

Inimese soolestikus leidub mitmekesine mikroobikooslus, mida nimetatakse soole mikroobioomiks (Brody, 2020; Cani, 2018). Soolestiku mikroobioomiks loetakse mikroorganismide ökosüsteemi ja geneetilist materjali, aga mikrobioota viitab mikroorganismide kogumile konkreetsetes kehapiirkondades, nagu nahk, suu või sooled (Gomaa, 2020). Kõige mitmekesisem mikrobioomi kooslus esineb inimesel soolestikus (Quigley, 2013). Seedetrakti erinevates osades on bakterite arv erinev, näiteks maos ja peensoole ülaosas on bakterite arvukus väike, aga suurem osa leidub tühisoollest käärsooleni (Nishida *et al.*, 2018). Soole mikroobioom mõjutab oma talitlusega inimorganismi mitmel viisil, näiteks on pidevas interaktsioonis füsioloogiliste protsesside ja immuunsüsteemi mehhanismidega (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018; Schmidt *et al.*, 2018). Inimese soole mikroobioom/mikroobikooslus koosneb erinevast mikroobsest organismist. Sinna kuuluvad bakterid, viirused, seened ja muud mikroorganismid, mis moodustavad mikrobioota (Kuziel & Rakoff-Nahoum, 2022). On leitud, et enam kui 99% soolebakteritest kuulub nelja hõimkonda – Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ja Actinobacteria, millest domineerivamad on Bacteroidetes ja Firmicutes (Gomaa, 2020; Nishida *et al.*, 2018).

Soolestiku mikrobiom on pidevas muutumises. Peamiselt mõjutavad mikrobiomi mitmekesisust elukeskkond, elustiil, toitumine, stress ja ravimid (Maier *et al.*, 2018; Maier & Typas, 2017). Kõik need tegurid võivad muuta soolestiku mikrobiomi kooslust, mis omakorda võib mõjutada meie edasist tervist.

Ravimitest mõjutavad soolestiku mikrobiomi antibiootikumid, mittesteroidsed põletikuvastased ained, kontratseptiivid, statiinid ja paljud teised (Maier *et al.*, 2018). Nende ravimite tarbimine võib põhjustada muutusi bakterikoosluses ja funktsioonis (Flynn & Eisenstein, 2019). Antibiootikumravi mõjutab tugevalt soolestiku mikrobiomi, mistõttu võivad esineda ka tugevad kõrvaltoimed. Igal antibiootikumklassil on erinevad omadused, mille tulemuseks on mikrobiomi muutumise mustrid. Erinevat tüüpi antibiootikumid põhjustavad soole mikrobiomis erinevaid muutusi nii mikroobikoosluses kui -funktsioonis (Fenneman *et al.*, 2023). Makroliidid on tänapäeval üks enim kasutatud antibiootikumide grupe (Iizumi *et al.*, 2017). Soomes viidi 2016. aastal läbi uuring, mis näitas, et makroliidide tarbimine lastel põhjustas muutusi soolestiku mikrobiomis, vähendades aktinobakterite hulka ning suurendades bakteroidide ja proteobakterite arvu (Korpela *et al.*, 2016). Muuhulgas vähendab vankomütsiini ja penitsilliini tarvitamine hõimkonna Firmicutes'e arvukust ja suurendab proteobakterite kasvu (Vrieze *et al.*, 2014). Lisaks antibiootikumidele võivad mitmed laialt levinud ravimid nagu prootonpumba inhibiitorid ja diabeediravimid (metformiin) muuta mikroobide kooslust (Forslund *et al.*, 2015; Imhann *et al.*, 2016). Prootonpumba inhibiitorite tarvitamine vähendab soolestikus kommensaalsete bakterite arvukust (Weersma *et al.*, 2020). Nende ravimite toimel suurenevad perekondade *Enterococcus*, *Streptococcus* ja *Staphylococcus* arvukused (Imhann *et al.*, 2016). Teist tüüpi diabeedi ravis kasutatav metformiin muudab soolebakterite üldhulka, kuid on oluline eristada, kas soolestiku mikrobiomi muutused tulenevad ravimi kasutamisest või tekivad hoopis diabeediga kaasnevatest muutustest (Forslund *et al.*, 2015). Lisaks sellele, et ravimid mõjutavad mikrobiomi kooslust võib ka soolestiku mikrobiom mõjutada inimese vastust ravimile, muutes ensümaatilist ravimi struktuuri ning selle biosaadavust, bioaktiivsust või toksilisust (Zimmermann *et al.*, 2019, 2021). Ka bioloogilises ravis on oluline mikrobiomi uurimine, kuna see annab aimu, kuidas patsient võib ravile reageerida. Näiteks bakteri *Faecalibacterium prausnitzii* suurem osakaal soolestikus on seostatud parema ravivastusega (Sokol *et al.*, 2008). Soolestiku mikroobikooslust mõjutavad väga suuresti inimese toitumisharjumused ja -eelistused. Näiteks suurendab kiudainerikas toit selliste bakteriperekondade arvukust, kelle

elutegevuse tulemusena moodustuvad lühikese ahelaga rasvhapped (ingl k *short chain fatty acids* SCFA). Nende hulka kuuluvad butüraat ehk võihape, atsetaat ja propionaat, mida toodetakse soolestiku bakterite poolt toidu lagundamisel (Kim *et al.*, 2014; E. R. Lane *et al.*, 2017). Need ühendid on vajalikud, kuna aitavad organismi kaitsta soolepõletiku ehk koliidi eest, toimides energiaallikana sooleseina epiteelrakkudele, reguleerides regulatoorsete T-rakkude aktiivsust ja suurendades makrofaagide antibakteriaalset aktiivsust (Franzosa *et al.*, 2019). Lisaks eelnevalt kirjeldatud teguritele võib olla soolestiku mikrobiom erinev lähtudes inimese geograafilisest asukohast ja sellega seotud keskkonnatingimustest (Donaldson *et al.*, 2016; Suzuki & Worobey, 2014). Näiteks on leitud, et maal elavate inimeste mikrobiom erineb nende omast, kes elavad linnas. Linnas elavatel inimestel domineerivad soolestikus sageli bakteriperekonnad *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ja *Firmicutes*. Keskkonnategurid nagu kokkupuude kemikaalidega või saastatud veega, võivad samuti mõjutada mikrobiomi koostlust ja talitlust (Gupta *et al.*, 2017). Lääne- ja muu maailma vahel on tuvastatud mikrobiomi erinevusi. Uuringus, kus võrreldi Aafrika maapiirkonnas Hadza hõimudes elavate inimeste mikrobiomi Itaalia linnas elavate inimeste mikrobiomiga, leiti, et traditsioonilise eluviisiga Hadza populatsioonis oli inimeste mikrobiom mitmekesisem. Sellest tööst selgus, et mittelääne ühiskonnas domineerivad hõimkonnad nagu Bacteroidetes ja Proteobacteria ning läänemaailmas Actinobacteria ja Firmicutes. Bacteroidetes'i domineerimine Aafrika maapiirkonnas võib olla tingitud sellest, et sealne rahvas tarbib rohkem teraviljapõhiseid kiudaineterikkaid toite (Schnorr *et al.*, 2014).

1.3 Mikrobiomi analüüsimine

Mikrobiom mängib olulist rolli meie tervisliku seisundi ja haiguste tekkepõhjuste mõistmisel (Goodrich *et al.*, 2014). Tänapäeval on kasutuses erinevaid meetodeid soolestiku mikrobiomi uurimiseks. Kõige rohkem rakendatakse mikrobiomi analüüsimiseks sekveneerimisel põhinevaid meetodikaid, kuna need pakuvad põhjalikku teavet kogu mikrobiomikoosluse kohta ja võimaldavad määratleda ka selliseid mikroorganisme, keda on keeruline laboritingimustes kultiveerida (Riesenfeld *et al.*, 2004). Peamiselt kasutatakse bakteriaalse DNA järjestamist teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaga, kus analüüsitakse kas spetsiifilist geenipiirkonda, näiteks 16S rRNA geenijärjestusi, või kogu bakteriaalse DNA ehk shotgun metagenoomi sekveneerimist (Knight *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2018). 16S rRNA geenijärjestuse sekveneerimine on laialdaselt kasutatav meetod bakterite identifitseerimiseks ja

mikroorganismide fülogeneetiliseks analüüsimiseks (D. J. Lane *et al.*, 1985). Tegemist on ainult prokarüootidele omase geeniga, mis kodeerib bakteri 16S ribosomaalset RNA subühikut, mis on ribosoomi väikese (30S) alaühiku komponent bakterites ja arhedes. Analüüs hõlmab tavaliselt 16S rRNA geeni ühe hüpervariaabel piirkonna amplifitseerimist, seejärel selle sekveneerimist ja analüüsi. Tulemused võimaldavad tuvastada mikroobide taksonoomilist koosseisu (Iizumi *et al.*, 2017; Weersma *et al.*, 2020). Enim kasutatakse soolestiku bakteriperekondade tuvastamiseks ja määramiseks 16S rRNA geeni V3-V4 piirkonda, aga kasutusel on ka teised järjestused üheksa hüpervariaabelpiirkonna hulgas (Lozupone *et al.*, 2013). Kasutades erinevaid märgiseid (barkoode) on võimalik ühes katses järjestada 16S rRNA geenipiirkonda mitmetest proovidest ning analüüsida erinevate mikroobipopulatsioonide mitmekesisust ja kooslust. Võrreldes 16S rRNA geenijärjestuse analüüsiga olid varasemad nn klassikalised kultiveerimispõhised meetodid mikroobide isoleerimiseks aeganõudevamad ja ebatäpsed, samas kasutatakse neid meetodikad jätkuvalt erinevate soole mikroorganismide funktsioonide ja omaduste kirjeldamiseks (Caporaso *et al.*, 2011). 16S rRNA geenijärjestuse sekveneerimisel on samas ka mitmeid puudusi. 16S rRNA geeni sekveneerimine annab teavet ainult bakterite ja arhede kohta ning ei võimalda tuvastada teisi mikroorganisme, näiteks viirusi või seeni (Janda & Abbott, 2007). 16S rRNA võimaldab baktereid määratleda tavaliselt kuni perekonna tasemeni, harva liigi või tüve tasandini. 16S rRNA tuvastab, kes on hetkel soole mikroobikoosluses olemas, aga mitte seda, mis nende funktsioonid on (Caporaso *et al.*, 2011). Lisaks 16S rRNA geenijärjestuse analüüsile on hakatud viimastel aastatel peamiselt kasutama mikrobioomi analüüsimisel metagenoomi ehk kogu mikroobse DNA sekveneerimist (ingl *shotgun metagenome sequencing*), mis võimaldab tuvastada bakteritele lisaks ka viiruseid, algloomi ja seeni (Quince *et al.*, 2017). Lisaks taksonoomia määramisele on sellega võimalik tuvastada ka mikroobide funktsionaalset profiili. Metagenoomne sekveneerimine on kallim ning mitu korda suurem andme- ja töömaht (Qin *et al.*, 2010).

1.4 Soolestiku mikrobiom ja IBD

Soolestiku mikrobioomi ja IBD tekkimise vahel on näidatud olulisi seoseid. Soole mikrobiom, mis koosneb seal erinevatest mikroorganismidest, mängib olulist rolli soolestiku seisundi ja immuunsüsteemi reguleerimisel (Qiu *et al.*, 2022). Uuringud on näidanud, et soolestiku mikrobiom on tervetel inimestel ja IBD patsientidel erinev. Need muutused hõlmavad mikroobset mitmekesisust ja liigirikkust (Halfvarson *et al.*, 2017). IBD-ga inimestel on

täheldatud mikrobioomi düsbioosi, mis viitab mikroobide tasakaalu häiretele soolestikus, näiteks võib leida rohkem põletikku soodustavaid mikroobe ja vähem põletikuvastaseid mikroobe (Shaw *et al.*, 2016). Põletikulised protsessid organismis on tugevalt seotud düsbioosiga (Matsuoka & Kanai, 2015). Düsbioos võib põhjustada soole immuunsüsteemi talitluse häireid, mis omakorda soodustab IBD teket ja selle progresseerumist (Liang, 2021).

Soolestiku mikrobiom on IBD kui haiguse kontekstis tihedalt seotud toitumisega (Dorrestein *et al.*, 2014). Näiteks kui soolestiku bakterid käärivad taimseid polüsahhariide, siis kõrvalproduktideks on lühikese ahelaga rasvhapped (SCFA-d) nagu butüraat, atsetaat ja propionaat (Franzosa *et al.*, 2019). Peamiselt toodavad SCFA-sid *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.* ja *Faecalibacterium prausnitzii* (Caetano & Castelucci, 2022). *Faecalibacterium prausnitzii* on põletikuvastane kommensiaalne bakter, mille vähenemist on seostatud just IBD patsientidel (Matsuoka & Kanai, 2015; Sokol *et al.*, 2008). SCFA-d toimivad põletikuvastastes protsessides näiteks G-valgu retseptorite vahendusel. SCFA-d seonduvad G-valgu retseptoritega, nagu GPR41 ja GPR43, soodustades soolebarjääri tugevnemist ning põletikuvastast ja antioksüdantset toimet (Caetano & Castelucci, 2022). Butüraat ehk võihape võib kaitsta jämesoolepõletiku ehk koliidi eest, mõjutades reguleerivate T-rakkude tootmist ja suurendades makrofaagide antibakteriaalset aktiivsust (Smith *et al.*, 2013). Patsientidel, kellel on diagnoositud IBD, väheneb butüraadi sisaldus, mis on oluline immuunsüsteemi toimimiseks ja on energiaallikaks soole epiteelirakkudele (Franzosa *et al.*, 2019; Sokol *et al.*, 2008). Arvatakse, et vähenenud butüraadi tase soolestikus aitab muuhulgas esile kutsuda soolepõletikku (Matsuoka & Kanai, 2015).

Põletikulise soolehaiguse teket ja väljakujunemist mõjutavad mitmed põletikulisi protsesse soodustavad bakterid (Clemente *et al.*, 2018). Need bakterid võivad toota metaboliite, mis ärritavad soole limaskesta ja käivitavad sealseid põletikureaktsioonid immuunsüsteemi vahendusel (Qiu *et al.*, 2022). IBD korral on näidatud, et väheneb enamasti hõimkond *Bacillota* (endine Firmicutes), kuhu kuuluvad paljud põletikuvastase toimega bakteritaksonid. Samal ajal võib suurendada põletikku soodustavate bakterisugukondade arvukus, nagu *Enterobacteriaceae* ja *Fusobacteriaceae* (Korpela *et al.*, 2016). Põletikku soodustavad bakterid mõjutavad ka immuunsüsteemi aktiivsust ja tasakaalu. Näiteks võivad need mikroorganismid soodustada põletikuliste tsütokiinide (IL-1, IL-6, TNF- α) vabanemist, mis soodustab omakorda IBD teket ja ägenemist (Neurath, 2014). IBD-ga patsientidel on märgatud, et suureneb oluliselt bakteriliik *Ruminococcus gnavus* (Qiu *et al.*, 2022). *Ruminococcus gnavus* lagundab soole limaskestas

limavalke mutsiine ning aitab sellega teistel bakteritel elada limaskestas, andes toitainena mutsiinide laguprodukte (Matsuoka & Kanai, 2015). Selline protsess häirib soole limaskesta terviklikkust ja võimaldab sealsetel mikroorganismidel tungida soolevalendikust sügavamale epiteelkihi lähedale, suurendades soole põletikulisi protsesse (Hall *et al.*, 2017).

IBD ja soolestiku mikrobioomi vahelised seosed on keerulised ning seega nõuavad põhjalikumat uurimist. Siiski on selge, et mikrobiom aitab mõista soolestiku seisundit, haiguste tekke põhjuseid ja spetsiifilist ravi (Halfvarson *et al.*, 2017). Lisaks võib põletikulise soolehaiguse korral muutunud arvukusega bakteriperekondadest olla kasu kui võimalikest haiguse ja ravi biomarkeritest (Qiu *et al.*, 2022). Tabel 1 on välja toodud soolestiku mikrobiotasse kuuluvad bakterid, mida on seostatud põletikulise soolehaigusega.

Tabel 1. Põletikulise soolehaiguse uuringutes leitud muutused IBD patsientide soolestiku mikrobioomis

Analüüsimetod	Valimi suurus	Haigus või alatüüp	Muutunud perekonnad/hõimkonnad	Viide
Väljaheiteproovid, metagenoom	117 (n=59, n=34, n=24)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Vähenenud: <i>Faecalibacterium</i>	(Schirmer <i>et al.</i> , 2018)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	895 (n=313, n=582)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Vähenenud: <i>Roseburia</i>	(Imhann <i>et al.</i> , 2018)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	12 (n=6, n=6)	Crohni tõbi	Vähenenud: Firmicutes	(Manichanh <i>et al.</i> , 2006)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	52 (n=11, n=20, n=21)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Suurenenud: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	155 (n=68, n=53, n=34)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Vähenenud: Firmicutes Suureneud: Proteobacteria	(Franzosa <i>et al.</i> , 2019)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	30 (n=10, n=12, n=8)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Vähenenud: <i>Coriobacteriaceae</i> (Actinobacteria)	(Maukonen <i>et al.</i> , 2015)29.05.24 23:31:00
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	80 (n=30, n=46, n=4)	Crohni tõbi, haavandiline koliit	Suurenenud: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Collinsella</i> Vähenenud: <i>Hallella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Roseburia</i> Suurenenud: <i>un Porphyromonadaceae</i>	(Willing <i>et al.</i> , 2010)
Väljaheiteproovid, 16S rRNA	24 (n=12, n=12)	Crohni tõbi	Vähenenud: <i>Eubacterium rectale</i> (Firmicutes)	(Knoll <i>et al.</i> , 2017)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev töö on osa projektist „Mikrobioomi mõju põletikuliste soolehaiguste kujunemisele ning ravile“ (eetikakomitee taotluse nr 337/T-26), mis uurib mikrobioomi seoseid põletikuliste soolehaiguste patogeneesiga ning hindab nende haiguste ravi efektiivsust seoses indiviidi mikrobioomi profiiliga.

Antud töö eesmärgid olid järgmised:

1. Määrata põletikulise soolehaiguste patsientide ja tervete kontrollgrupi liikmete soole mikroobide kooslus, kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist;
2. Võrrelda põletikulise soolehaiguste patsientide ja tervete kontrollgrupi liikmete soole mikroobikoosluste erinevusi.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Uuringu valimi moodustamine

Töö analüüsiks vajalikud proovid koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi vähemalt 18. aastastelt sisekliiniku patsientidelt, kellel oli diagnoositud Crohni tõbi või haavandiline koliit. IBD diagnoosiga patsientide proove kogusid patsientide raviarstid – gastroenteroloogid aastatel 2021–2022. Uuringu koguvalimi moodustas 176 isikut, kellest 77 on patsiendid ja 99 kontrollrühma isikud.

Uuringu valimisse kuulumise välistasid järgmised kriteeriumid:

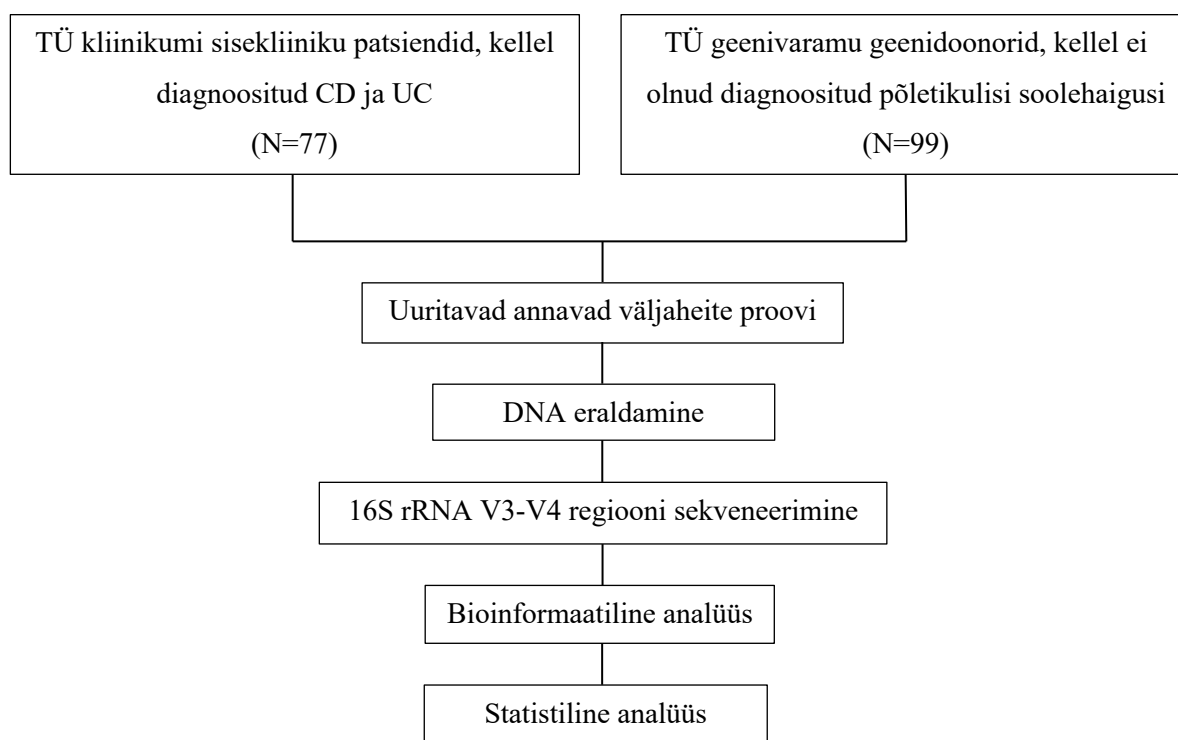
1. Patsient, kellel oli hetkel mõni äge infektsioon (kuseteede infektsioon, kopsupõletik jt);
2. Patsient, kellel esineb kaasuvaid haigusi (krooniline neeruhaigus, diabeet, jämesoolevähk jt);
3. Kontrollgrupi liige, kellel on varasemalt diagnoositud põletikulisi soolehaiguseid;
4. Kontrollgrupi liige, kellel on varasemalt tehtud soole resektsioon;
5. Kontrollgrupi liige, kellel on väikese juha primaarne skleroseeriv kolangiit ehk ahendav sapiteede põletik;

6. Kontrollgrupi liige, kellel on varasemalt diagnoositud kroonilisi maksahaigusi;
7. Kontrollgrupi liige, kes on eelneva 6 kuu jooksul tarvitanud antibiootikume;
8. Kontrollgrupi liige, kellele on viimase 2 nädala jooksul tehtud koloskoopiline uuring.

Lõplikult jäid valimisse 77 IBD diagnoosiga uuritavat, kellest 47 olid mehed ja 30 naised (vanus 37,64 +/- 12,26, vahemik 21-74; BMI 25,41 +/- 4,20, vahemik 19,05-37,26). Nendest 45 patsiendil oli diagnoositud Crohni tõbi ja 32 haavandiline koliit.

Kontrollgrupi moodustasid Tartu Ülikooli Geenivaramu doonorid ja Eesti Mikrobioomi kohordi (EstMB) uuritavad, kellel ei olnud diagnoositud põletikulisi soolehaigusi ning kes sobisid valimisse vanuse ja soo järgi. Uuringusse valiti aastatel 2017–2019 Eesti Mikrobioomi kohordiga liitunud geenidoonorid. Kontrollgruppi kuulus 99 isikut, kellest 63 olid mehed ja 36 naised (vanus 37,4 +/- 10,90, vahemik 23-73; BMI 25,17 +/- 4,06, vahemik 17,41-36,75).

Uuringus osalejad on andnud kirjaliku nõusoleku ja uuringu teostamiseks on antud Tartu Ülikooli inimuringute eetikakomitee poolt heakskiit (loa number 337/T-26). Töö metoodika etapid on toodud **Joonisel 2**.



Joonis 2. Töö metoodika etappide jaotus

Uuritavateelt paluti võtta väljaheiteproovid steriilsesse analüüsitopsi, mis saadeti postiga TÜ geenivaramusse. Labori jõudnud proovid asetati enne DNA eraldamist -80°C juurde külmkappi. Uuringus osalejad täitsid lisaks küsimustiku elukeskkonna ja elustiili kohta. Selles töös uuriti ainult väljaheiteproove ning muid andmeid analüüsi ei kaasatud.

2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA sekveneerimine

Uuringu käigus saadud väljaheiteproovidest eraldati bakteriaalne DNA 77 uuritava ning 99 kontrollgrupi proovilt, kasutades firma Qiagen DNA Dneasy PowerSoil PRO (Qiagen, Venlo, Madalmaad) eralduskomplekti. DNA eraldati ka negatiivselt kontrollilt, mis väljaheiteproovi ei sisaldanud, ning ka ühelt bioloogiliselt ehk positiivselt kontrollilt, mis oli uuritava IBD030 proovi kordus. DNA eraldamine käis eralduskomplektiga kaasas olnud protokoll järgi teatud muudatustega. Esiteks võeti väljaheiteproovid toatemperatuurile ja seejärel võeti eraldamiseks 250 mg proovi. Järgmiseks lisati lahus CD1 ja inkubeeriti proove 65°C juures 10 minutit, et tagada korralik lüüsimine ka raskesti lüüsitavatele bakteritele ja edaspidi kõrgem DNA kontsentratsioon. Sellele järgnes rakkude lõhustamine Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretinneux, Prantsusmaa) koepurustiga, mis oli seadistatud järgnevalt: 2500 rpm pöörded, kestvusega 2 x 30 sekundit, 30 sekundit pausi tsüklite vahel. Ülejäänud protokoll teostati vastavalt tootja juhistele. Viimasena saadud DNA kontsentratsiooni mõõdeti koguses 2 µl spektrofotomeetriga NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). DNA-d sisaldavaid proove säilitati -20°C juures. Proovide DNA kontsentratsioonid on välja toodud tabelis **Lisa 1**.

Proovidest eraldatud genoomse DNA sekveneerimine teostati Inglismaal firmas Novogene Bioinformatics 270 Technology Co., Ltd. Sekveneerimiseks ja 16S rRNA geeni paljundamiseks kasutati kaht päri- ja vastassuunalist praimerit 16S_F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') ja 16S_R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT -3'). Saadud lugemid läbisid kvaliteedikontrolli.

2.2.3 Mikroobikoosluse määramine

Sekveneerimisandmete bioinformaatilise analüüsi teostas TÜ genoomika instituudi mikrobiomika nooremteadur Annabel Klemets. Bioinformaatiline analüüs viidi läbi tarkvaraga QIIME2 (versioon 2021.11). Andmed viidi QIIME2 programmi formaadis PairedEndFastqManifestPhred33, kasutades q2-tools skripti.

Järgmiseks viidi läbi kvaliteedikontroll (QC, *quality control*), et eemaldada ja parandada mürarikkad lugemid. Selleks kasutati DADA2 tarkvara, mis andis tulemuseks lugemite kvaliteediskoori ning võimaldas valida välja ebasobivad piirkonnad väljalõikamiseks. Konsensusfiltriga eraldati veel lisaks kimäärid ehk osaliselt ühinenud lugemid. Selle eksperimentaalse osa tulemusena toimus lugemite ühendamine amplikonjärjestuste variantideks (ASV). Lugemite taksonoomiliseks klassifitseerimiseks kasutati QIIME2 programmi skripti q2-feature-table-classifier koos Bayes'i klassifitseerijaga, mis töötas referentsjärjestuse SILVA 16S V3–V4 v132_99 andmebaasidest 99% sarnasuslävendiga.

2.2.4 Andmete statistiline analüüs

Andmeanalüüsiks kasutati programmi Rstudio (versioon 2023.12.1+402) ja R baasprogrammi (versioon 4.3.2) koos lisapakettidega *dplyr* (versioon 1.1.4), *mia* (versioon 1.1.10), *miaViz* (versioon 1.1.10), *writexl* (versioon 1.5.0), *ALDEx2* (versioon 1.34.0). Jooniste tegemiseks kasutati *ggplot2* (versioon 3.4.4) paketti. Andmeanalüüs teostati 176 väljaheiteprooviga. Analüüsist jäeti välja positiivne kontrollproov D_030_2.

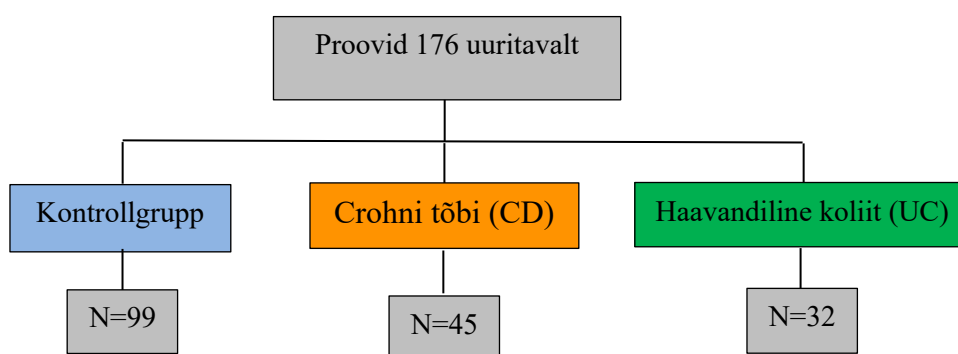
Väljaheiteproovide taksonoomilise mitmekesisuse kirjeldamiseks kasutati alfa- ja beetamitmekesisust. Alfamitmekesisus näitab proovisisest taksonoomilist mitmekesisust ning beetamitmekesisus annab ülevaate proovidevahelistest erinevustest mikrobioomi kooslustes. Alfamitmekesisuse kirjeldamiseks arvutati välja Shannoni mitmekesisuse indeks ja vaadeldud perekondade arvukus. Shannoni mitmekesisuse indeksi ja vaadeldud perekondade arvukuse väärtuseid võrreldi kontrollgrupi ja IBD patsientide väljaheiteproovide vahel. Need indeksid ja kõik teised väärtused arvutati bakteriperekondade tasemel. Beetamitmekesisuse puhul viidi läbi bakteriperekondade keskmistatud logaritmilise suhte väärtustega (CLR-väärtused, ingl k *centered log ratio*) peakomponentanalüüs (PCA, ingl k *principal component analysis*).

Lisaks võrreldi sagedasemate bakteriperekondade keskmistatud logaritmilise suhte väärtuseid (CLR-väärtused, ingl k *centered log ratio*), mis näitavad bakteriperekondade esinemissagedusi teiste perekondade suhtes uuritavas proovis. Võrdlused tehti kontrollgrupi ja Crohni tõvega uuritavate ning kontrollgrupi ja haavandilise koliidi uuritavate vahel. Võrdlusesse kaasati need perekonnad, mille esinemissagedus uuritavate proovides oli suurem kui 10%. Võrdlused viidi läbi kahepoolsete Welchi t-testidega. P-väärtuse korrigeerimiseks kasutati Benjamini-Hochbergi meetodit ($FDR < 0,05$).

2.3 Tulemused

Uuringus analüüsiti kokku 176 inimese väljaheiteproove. Kontrollgruppi kuulusid TÜ geenivaramu geenidoonorid Eesti Mikrobioomi kohordist (EstMB) (N = 99), kellel ei olnud diagnoositud põletikulisi soolehaigusi ja kes ei tarvitanud antibiootikume uuringule eelnenud kuue kuu jooksul. Uuritavate hulka kuulusid Tartu Ülikooli Kliinikumi patsiendid, kellel oli diagnoositud Crohni tõbi (N=45) või haavandiline koliit (N=32).

Kontrollgrupi uuritavate DNA kontsentratsiooni keskväärts oli 68,74 +/- 20,05 ng/µl (vahemik 12,12-130,3), Crohni tõvega patsientidel oli keskmine kontsentratsioon 50,73 +/- 23,25 ng/µl (vahemik 10,42-96,91) ja haavandilise koliidiga patsientidel 51,49 +/- 23,40 ng/µl (vahemik 11,33-90,55). Kõikides 177 sekveneeritud uuringuproovides (176 väljaheiteproovi ja positiivne kontroll D_030_2) leidis keskmiselt 143 557 +/- 73 576 DNA lugemit (vahemik 41 615-548 463). Pärast positiivse kontrolli välja jätmist leidis lugemeid proovides keskmiselt 134 985 +/- 70 277 (vahemik 39 018-529 918), millest kontrollgrupi uuringuproovide keskmine lugemite arv oli 135 561 +/- 56 242 (vahemik 42 734-290 314), Crohni tõvega patsientide proovidel 151 325 +/- 100 174 (vahemik 39 018-529 918) ja haavandilise koliidiga uuritavate proovidel 110 226 +/- 51 154 (vahemik 45110-262 362) lugemit. Positiivse kontrolli taksonoomiline jaotus oli identne prooviga D_030 ja see proov jäeti edasisest analüüsist välja. Analüüsi kaasatud uuritavate proovide jaotus on välja toodud **Joonisel 3**.

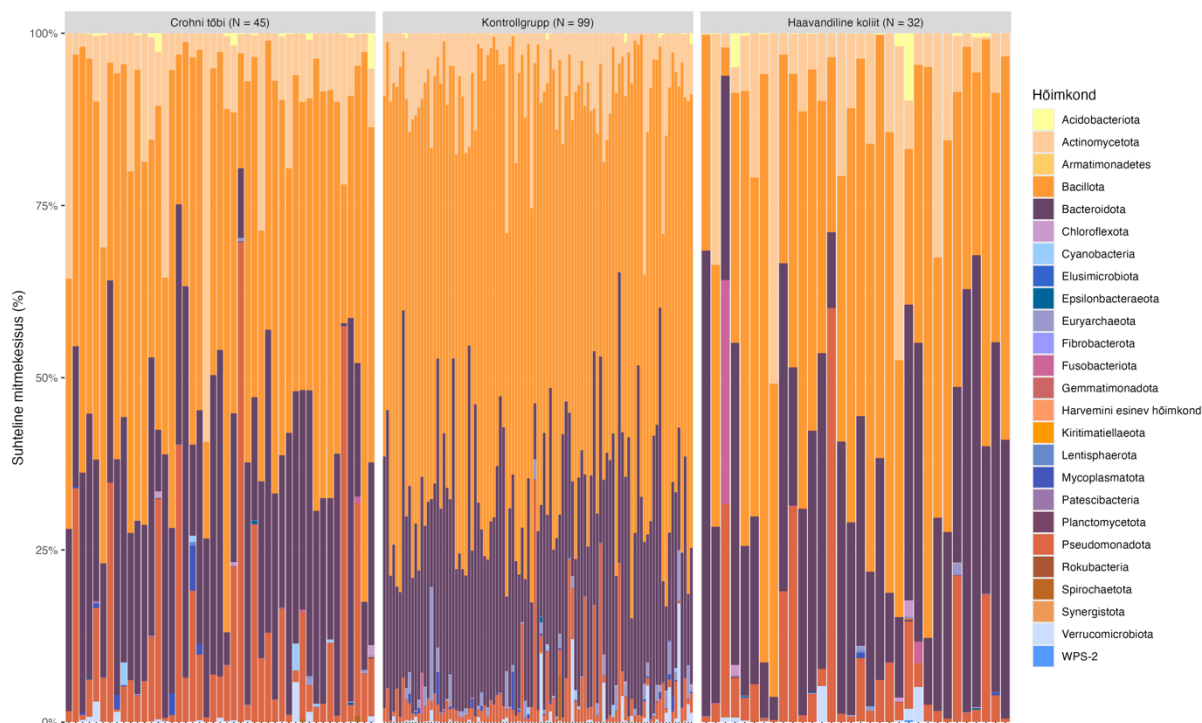


Joonis 3. Töös uuritavate proovide jaotus.

2.3.1 Soole mikroobikoosluse erinevused uuringugruppide vahel

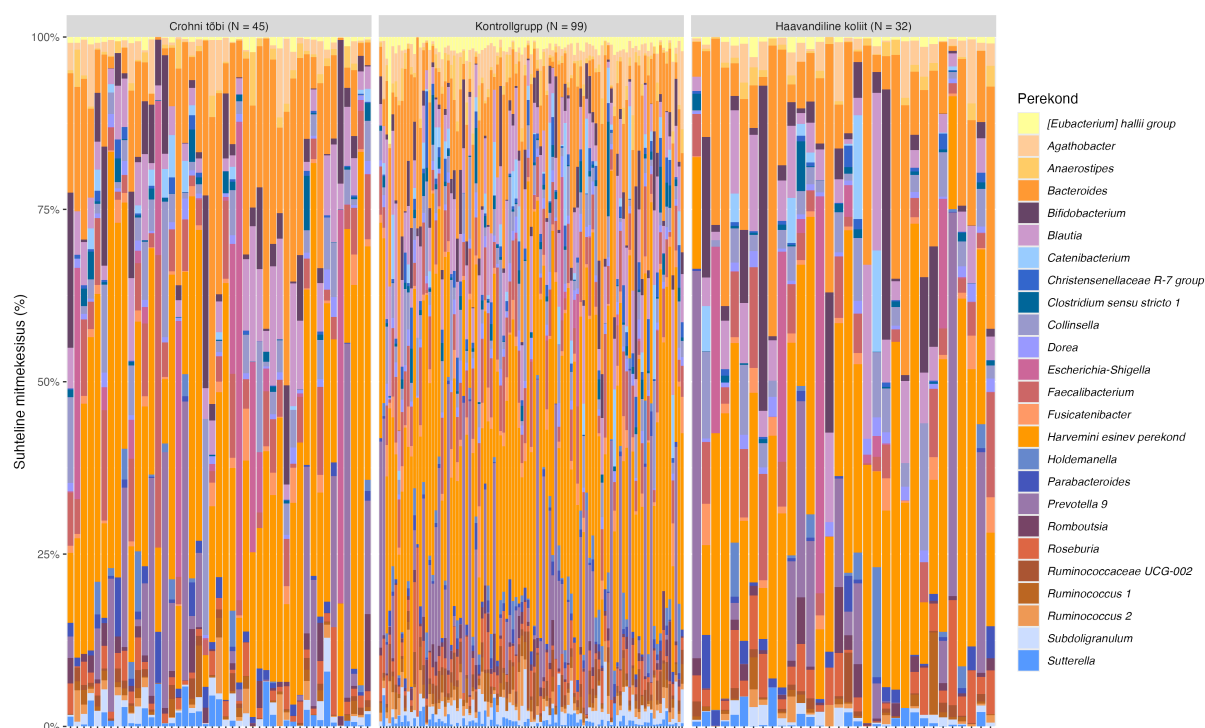
Kontrollgrupi uuritavate soole mikroobikoosluse analüüsimisel tuli välja, et kolm kõige sagedasemat hõimkonda on Bacillota (endine Firmicutes) (58,15%), Bacteroidota (endine Bacteroidetes) (27,62%) ja Actinomycetota (endine Actinobacteria) (8,24%). Crohni tõve

patsientide puhul domineerisid hõimkonnad Bacillota (46,58%), Bacteroidota (28,50%) ja Pseudomonadota (endine Proteobacteria) (12,66%). Haavandilise koliidiga patsientidel esines kõige rohkem bakterihõimkondi Bacillota (46,09%), Bacteroidota (31,56%) ja Actinomycetota (11,48%) (**Joonis 4, Lisa 2**).



Joonis 4. Hõimkondade suhtelised sagedused erinevates väljaheiteproovides (kontrollgrupp, Crohni tõbi, haavandiline koliit).

Crohni tõvega uuritavate soole mikroobikoosluses domineerisid bakteriperekonnad nagu *Bacteroides* (14,50%), *Prevotella 9* (7,44%) ja *Escherichia-Shigella* (6,58%). Uuritavatel, kellel oli diagnoositud haavandiline koliit, leidis soole mikroobikoosluses enim bakteriperekondi *Bacteroides* (16,17%), *Prevotella 9* (7,81%) ning *Blautia* (6,67%). Kontrollgrupi proovides esines kõige rohkem perekondi *Bacteroides* (12,36%), *Prevotella 9* (8,47%) ning *Blautia* (7,82%) (**Joonis 5, Lisa 3**).



Joonis 5. Perekondade suhtelised sagedused erinevates väljaheiteproovide tüüpides (kontrollgrupp, Crohni tõbi, haavandiline koliit).

2.3.2 Mikrobioomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uuringugruppide vahel

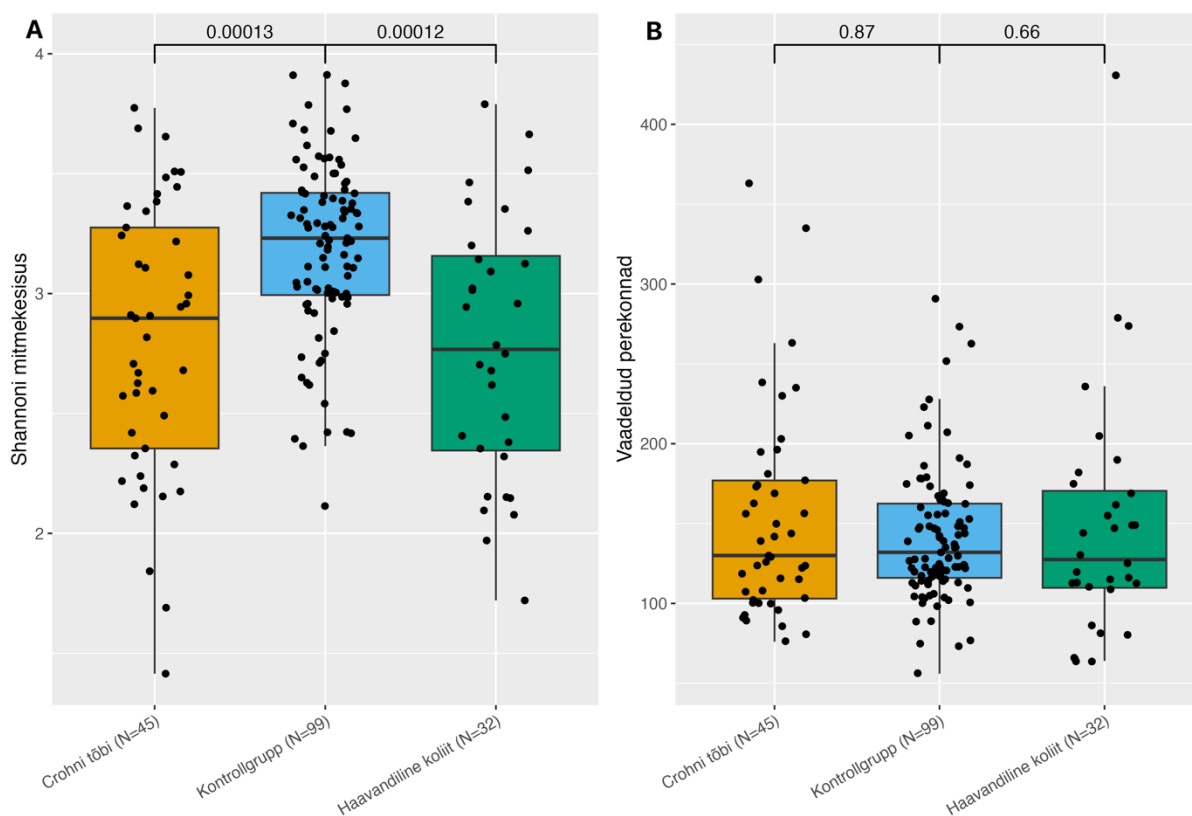
Tulemuste analüüsis vaadeldi alfamitmekesisust esiteks uuringugruppide kaupa ja järgmiseks võrreldi beetamitmekesisust. Alfamitmekesisust hinnati nii Shannoni mitmekesisuse indeksi kui ka vaadeldud perekondade arvu abil.

Kontrollgrupi proovide puhul oli Shannoni mitmekesisuse indeksi keskvärtus 3,19 +/- 0,36 (vahemik 2,11 – 3,91) (**Lisa 4**) ning vaadeldud perekondade arvukuse keskvärtus oli 141,67 +/- 41,79 (vahemik 56 – 291) (**Lisa 5**).

Crohni tõvega uuritavatel oli Shannoni mitmekesisuse indeksi keskvärtus 2,81 +/- 0,57 (vahemik 1,41 – 3,77). Vaadeldud perekondade keskvärtus oli Crohni tõvega patsientidel 153,82 +/- 66,96 (vahemik 76 – 363).

Haavandilise koliidiga uuritavatel puhul oli Shannoni mitmekesisuse väärtus 2,77 +/- 0,54 (vahemik 1,72 – 3,79). Vaadeldud perekondade väärtus oli 147,41 +/- 76,10 (vahemik 64 – 431).

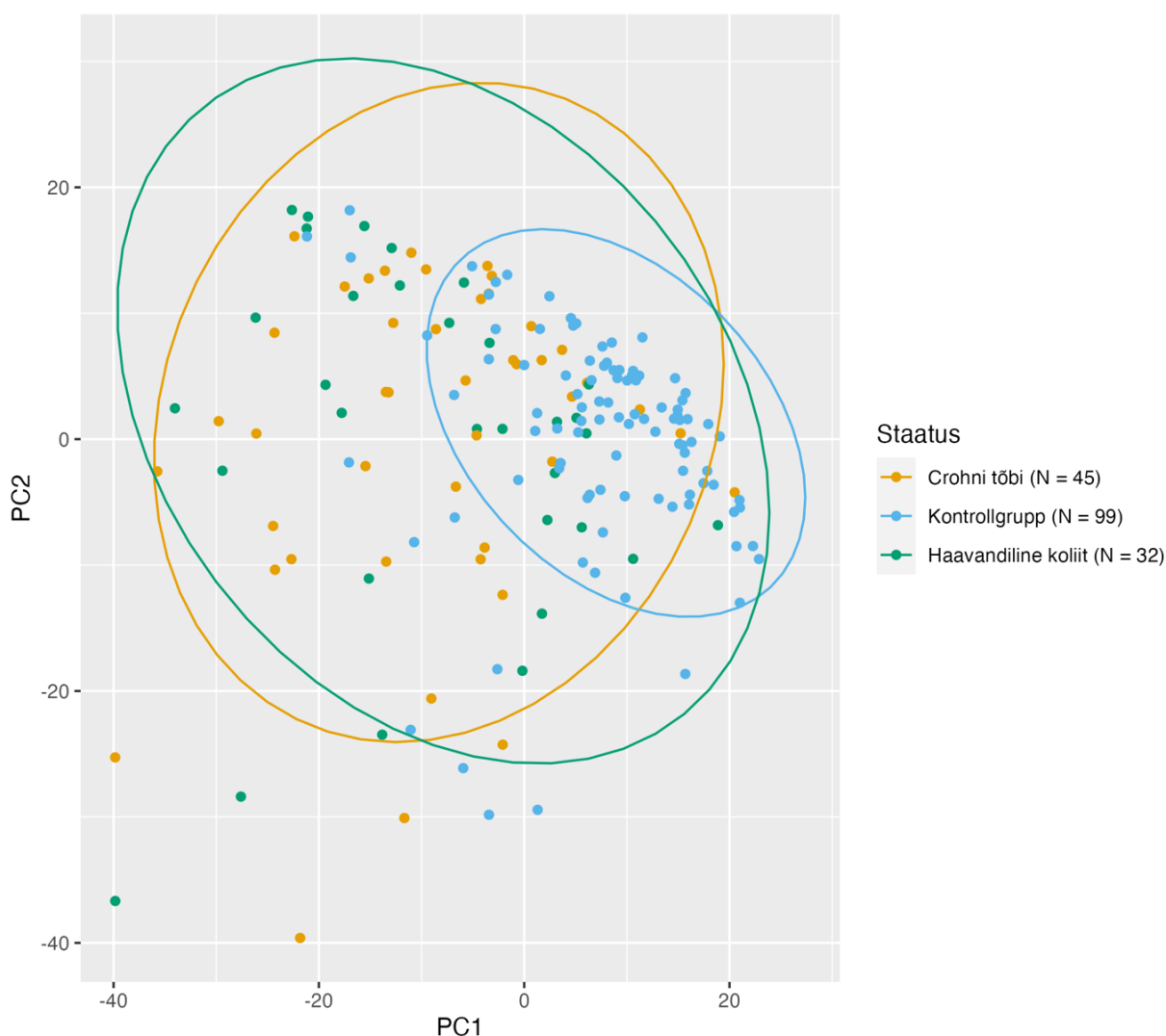
Shannoni mitmekesisus võrreldes kontrollgrupiga on nii Crohni tõve kui haavandilise koliidi puhul statistiliselt väiksem (**Joonis 6A, Lisa 6**). Vaadeldud perekondade arvukus võrreldes kontrollgrupiga ei näidanud statistiliselt olulist tulemust nii Crohni tõve kui haavandilise koliidi korral (**Joonis 6B, Lisa 7**).



Joonis 6. Alfamitmekesisust väljendavate väärtuse karpdiagrammid Crohni tõvega patsientide (N=45), kontrollgrupi (N=99) ja haavandilise koliidiga uuritavate (N=32) mikrobikoosluse puhul. A – uuritava staatuse ning Shannoni mitmekesisuse indeksi omavaheline seos; B – uuritava staatuse ja vaadeldud perekondade arvukuse omavaheline seos. Karpdiagrammi keskjoon väljendab kahe alfamitmekesisuse indeksi keskvaartust, uuringugruppe ühendavad jooned karpdiagrammide kohal näitavad alfamitmekesisuse väärtuste võrdlemisel saadud p-väärtuseid.

Alfamitmekesisuse analüüsis esines Shannoni mitmekesisuse indeksi puhul statistiliselt oluline erinevus tervete isikute (kontrollgrupp) ja Crohni tõve ning haavandilise koliidi vahel (CD: $p = 0,00013$, UC: $p = 0,00012$). Vaadeldud perekondade võrdlemisel ei leitud statistilist olulist erinevust tervete isikute ja Crohni tõve ning haavandilise koliidi patsientide puhul (CD: $p = 0,87$, UC: $p = 0,66$).

Beetamitmekesisuse analüüsiks viidi läbi peakomponentanalüüs, mille tulemused näitavad, et Crohni tõve ja haavandilise koliidiga uuritavate proovid klasterduvad kokku, kuid esineb nii Crohni tõve kui ka haavandilise koliidiga uuritavate proove, mis paiknevad eraldi kõikidest teistest proovidest (**Joonis 7**).



Joonis 7. Beetamitmekesisuse analüüsiks läbi viidud peakomponentanalüüs (PCA, ingl k *principal component analysis*). PC1 - esimene peakomponent, PC2 – teine peakomponent.

Kontrollgrupi uuritavate proovid on enamasti kokku klasterdunud, aga esineb ka selliseid kontrollide proove, mis on eraldunud teistest proovidest (**Joonis 7**).

2.3.3 Soole mikrobiomis leiduvate bakteriperekondade võrdlus uuringugruppide vahel

Järgmisena võrreldi erinevate bakteriperekondade arvukust erinevates uuringugruppides. Crohni tõvega patsientide (N = 45) ja tervete uuritavate proovide (N = 99) puhul olid statistiliselt olulised 46 bakteriperekonna mitmekesisuse erinevused (**Lisa 8**). Haavandilise koliidiga uuritavate (N = 32) ja tervete isikute proovide puhul olid olulised 39 erinevat bakteriperekonda. Nendest 33 perekonda olid ühised nii Crohni tõve kui ka haavandilise koliidi patsientidel (**Lisa 9**).

Crohni tõvega uuritavate ja kontrollide puhul olid statistiliselt olulised näiteks kolme bakteriperekonna suhtelise mitmekesisuse erinevused nagu *Lachnospiraceae* UCG-001 (korrigeeritud p väärtus = 0,00011), *Moryella* (korrigeeritud p väärtus = 0,00011), *Marvinbryantia* (korrigeeritud p väärtus = 0,00013) (**Lisa 8**).

Haavandilise koliidiga uuritavate ja kontrollide vahel leidsid statistiliselt olulised perekonnad nagu *Lachnospiraceae* FCS020 group (korrigeeritud p väärtus = 0,00013), *Family XIII AD3011* group (korrigeeritud p väärtus = 0,00025), *Marvinbryantia* (korrigeeritud p väärtus = 0,00183) (**Lisa 9**).

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli kindlaks määrata projekti „Mikrobioomi mõju põletikuliste soolehaiguste kujunemisele ning ravile“ raames kogutud põletikulise soolehaigusega uuritavatel kogutud väljaheiteproovidest soole mikroobikooslus. Selleks sekveneeriti bakteriaalse 16S rRNA geeni V3–V4 regioon. Töös sekveneeriti bakteriaalse 16S rRNA geeni V3–V4 regioon. Töös võrreldi soole mikroobiomi kooslust põletikulisi soolehaiguseid põdevate (Crohni tõbi ja haavandiline koliit) patsientide ning Eesti mikroobiomi kohordist pärit tervete kontrollgruppi kuuluvate uuritavate vahel.

Kontrollgrupi uuritavate proovides tulid esile suurima esinemissagedusega bakteriperekonnad nagu *Bacteroides*, *Prevotella 9* ning *Blautia*, mis domineerisid ka haavandilise koliidi patsientide proovides. Kuigi haavandilise koliidi ja kontrollide puhul olid kolm kõige sagedasemat perekonda sarnased, siis siiski tuvastati kokku 39 statistiliselt olulist muutust perekondade tasemel. Lisaks eespool nimetatutele domineeris Crohni tõve patsientide soole mikroobikoosluses ka perekond *Escherichia-Shigella*. Neid tulemusi vaadates on märgatav, et kuigi *Bacteroides* on domineeriv bakteriperekond kõigis kolmes uuringugrupis, on selle esinemissagedus veidi suurem nii Crohni tõvega kui ka haavandilise koliidiga patsientidel võrreldes tervete kontrollrühmaga. Need tulemused kattuvad varasemates uuringutes saadud tulemustega (Gophna *et al.*, 2006; Schirmer *et al.*, 2018; Vich Vila *et al.*, 2018). Bakteriperekond *Escherichia-Shigella*, mis on tuntud oma patogeensuse poolest, on suurema esinemissagedusega Crohni tõve ning haavandilise koliidiga patsientidel. See annab aimu *Escherichia-Shigella* rollile põletikulise soolehaiguse patogeneesis (Lee *et al.*, 2021). Põletikulise soolehaiguse korral on tuvastatud, et soolestikus väheneb bakteriperekondade *Faecalibacterium* ja *Roseburia* suhteline arvukus (Imhann *et al.*, 2016; Matsuoka & Kanai,

2015; Schirmer *et al.*, 2018; Sokol *et al.*, 2008; Vich Vila *et al.*, 2018). Seda kinnitavad ka käesoleva töö tulemused, kus oli märgata perekondade *Faecalibacterium*'i ja *Roseburia* arvukuse vähenemist võrreldes kontrollgrupiga. Varasemate teadustööde andmetel on tervete inimeste väljaheiteproovides tuvastatud, et suurima esinemissagedusega bakterihõimkondade hulka kuuluvad Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria ja Proteobacteria (Matsuoka & Kanai, 2015; Qin *et al.*, 2010; Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014). Antud töös olid kõige enam levinud bakteriperekonnad tervete patsientide soolestikus *Bacteroides* (hõimkond Bacteroidota, endine Bacteroidetes), *Prevotella 9* (hõimkond Bacteroidota) ja *Blautia* (hõimkond Bacillota, endine Firmicutes).

Soole mikrobiomi alfamitmekesisuse analüüs näitas olulisi erinevusi mikroobikoosluse mitmekesisuses Crohni tõve, haavandilise koliidi ja tervete isikute võrdluses. Crohni tõve ja haavandilise koliidiga patsientidel oli vaadeldud perekondade arvukus suurem ja kontrollgrupi uuritavatel väiksem. Shannoni mitmekesisus oli samuti IBD patsientidel väiksem ning tervetel uuritavatel suurem. Kuigi põletikulise soolehaigusega patsientidel oli vaadeldud perekondade arv suurem kui tervetel isikutel, ei olnud need erinevused statistiliselt olulised. Statistiliselt olulised olid ainult Shannoni mitmekesisuse indeksi erinevused. Need tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega, kus leiti samuti, et soole mikroobikoosluse mitmekesisus vähenes põletikulise soolehaigusega patsientidel (Franzosa *et al.*, 2019; Halfvarson *et al.*, 2017; Rajca *et al.*, 2014; Willing *et al.*, 2010; Wills *et al.*, 2014). Bakteriperekondade suurem absoluutarv ei peegelda alati suuremat ökoloogilist mitmekesisust (Wills *et al.*, 2014).

Beetamitmekesisuse analüüsimiseks läbi viidud peakomponentanalüüsi põhjal on näha, et Crohni tõve ja haavandilise koliidiga uuritavate proovid klasterduvad sarnaselt kokku. See viitab sellele, et nende mikrobiomi kooslused on sarnasemad. Need tulemused kinnitavad, et põletikulise soolehaigusega patsientidel on mikroobikoosluses ühiseid jooni, mis eristavad neid tervete inimeste mikroobikooslustest. Siiski leidis ka Crohni tõve ja haavandilise koliidiga patsientide proove, mis paiknesid eraldi kõikidest teistest proovidest. Need eraldunud proovid võivad viidata sellele, et mõnede patsientide mikrobiom on muutunud või erineb oluliselt haiguse raskusastme, ravi mõjude kui ka elustiili tõttu (Halfvarson *et al.*, 2017; Matsuoka & Kanai, 2015). Kontrollgrupi uuritavate proovid on suhteliselt kokku klasterdunud, aga esineb ka selliseid proove, mis on eraldunud üksteisest. Sarnast pilti on kirjeldatud ka teistes uuringutes, kus eristuvad tervete inimeste proovid haigete omadest. See vastab ootustele, kuna tervetel inimestel on soole mikrobiomi kooslus mitmekesisem (Qiu *et al.*, 2022). Täpsemat

infot proovide klasterdumise ja paiknemise kohta annab uuritavate elustiiliandmete kaasamine analüüsi, mida saab läbi viia järgnevatel uuringutes. Selleks et teha põhjalikumaid järeldusi ja näha selgemat eristumist uuringugruppide vahel, oleks vaja suuremat valimit ning täpsemat kliinilist analüüsi, mis võimaldab klassifitseerida Crohni tõve ja haavandilise koliidiga diagnoosituid täpsemateks alamtüüpideks (Halfvarson *et al.*, 2017; Pittayanon *et al.*, 2020).

Selles töös võrreldi soolestikus rohkem levinud bakteriperekondade arvukuse erinevusi Crohni tõve ja haavandilise koliidiga ning kontrollgrupi uuritavate vahel. Crohni tõvega patsientide ja kontrollgrupi puhul leiti 46 perekonda, mille mitmekesisuse erinevused olid statistiliselt olulised. Näiteks olid sellised bakteriperekonnad *Lachnospiraceae UCG-001*, *Moryella* ja *Marvinbryantia*. Võrreldes haavandilise koliidiga uuritavate ja tervete uuritavate proove leiti 39 bakteriperekonda, mille erinevused gruppide vahel olid statistiliselt olulised. Olulisemad erinevused esinesid näiteks perekondade *Lachnospiraceae FCS020 group*, *Family XIII AD3011 group* ning *Marvinbryantia* puhul. Crohni tõve ja haavandilise koliidi patsientidel oli 33 bakteriperekonda ühised võrreldes kontrollgrupiga. Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et Crohni tõve ja haavandilise koliidiga patsientide soolestiku mikrobiom erineb tervete omast. Mitmed varasemad põletikulise soolehaiguse ja mikrobioomi uuringud on seda ka kinnitanud (Mosca *et al.*, 2016; Oligschlaeger *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2022). Need leiud võivad olla kasulikud edasistes uuringutes, mis keskenduvad Crohni tõve ja haavandilise koliidi puhul esinevate mikroobsete markerite tuvastamisele.

Käesoleva töö tulemused kinnitavad varem tuvastatud seoseid soolestiku mikrobikoosluses. Sellest tulenevalt peaks edasi liikuma sügavama analüüsini, et teha kindlmaid järeldusi, näiteks millised bakteriliigid ja -tüved on erinevad ning mis on nende täpne funktsioon. Selleks peaks läbi viima metagenoomi analüüsi ning tegema edasisi funktsionaalseid katseid.

KOKKUVÕTE

Soolestiku mikrobiom on inimese seedetraktis elavate mikroorganismide kogum, mis mängib olulist rolli immuunsüsteemi kujunemisel ja selle reguleerimisel. Soole mikrobiom mõjutab erinevate haiguste teket. Põletikuline soolehaigus (IBD) võib olla üks sellistest haigustest. IBD on immuunsüsteemi poolt vahendatud haigus, mida iseloomustab krooniline põletik seedetrakti erinevates piirkondades. Põletikulise soolehaiguse alatüübid on Crohni tõbi ja haavandiline koliit. Crohni tõbi võib paikneda seedetrakti mis tahes osas, aga haavandiline koliit piirdub jämesoole ja pärasoole limaskestaga. IBD levimus on viimastel aastakümnetel tõusnud, mis viitab võimalikele keskkonnateguritele haiguse tekkes. IBD patsientidel on leitud olulisi erinevusi tervete inimeste soolestiku mikrobiomi koosseisuga. Selline düsbioos ehk mikroobse koosluse häiring võib mõjutada soolestiku tervist ja soodustada põletiku teket. IBD on keeruline haigus, mille diagnoosimine ja ravi nõuavad multidistsiplinaarset lähenemist. Pidev uurimistöö seoses ka soole mikrobiomiga on vajalik, et paremini mõista haiguse patogeneesi ja leida uusi ravimeetodeid.

Käesoleva magistr töö eesmärk oli määrata põletikulise soolehaigusega patsientide ja tervete kontrollgrupi liikmete väljaheiteproovidest soole mikroobikooslus, kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist. Lisaks võrreldi IBD patsientide ja tervete kontrollgrupi uuritavate soole mikroobikoosluste erinevusi. Töö tulemused näitasid, et soole mikroobikoosluses ning selle mitmekesisuses esinevad väiksed ja konkreetsed erinevused. Alfamitmekesisuse analüüsis esines Shannoni mitmekesisuse indeksi puhul statistiliselt oluline erinevus tervete uuritavate ja IBD uuritavate vahel, aga vaadeldud perekondade arvukuse võrdlemisel ei leitud statistiliselt olulist erinevust. Beetamitmekesisuse korral viidi läbi peakomponentanalüüs, mille tulemused näitavad, et põletikulise soolehaiguse patsientide proovid klasterduvad eraldi kokku kontrollidest. Crohni tõvega patsientide ja kontrollgrupi puhul leiti 46 bakteriperekonda ning haavandilise koliidi ja kontrollgrupi puhul 38 perekonda, mille mitmekesisuse erinevused olid statistiliselt olulised. Crohni tõve ja haavandilise koliidi patsientidel oli 33 bakteriperekonda ühised. Edasisteks uuringuteks oleks vaja läbi viia metagenoomi analüüs ja teha funktsionaalseid katseid.

RESÜMEE / SUMMARY

Differences in gut microbiota in patients with inflammatory bowel disease

Lisann Adamson

Summary

The gut microbiome is a collection of microorganisms living in the human gastrointestinal tract, playing a crucial role in the development and regulation of the immune system. The gut microbiome influences the development of various diseases. Inflammatory bowel disease (IBD) can be one of these diseases. IBD is an immune-mediated condition characterized by chronic inflammation in different parts of the gastrointestinal tract. The subtypes of inflammatory bowel disease are Crohn's disease and ulcerative colitis. Crohn's disease can occur in any part of the gastrointestinal tract, while ulcerative colitis is limited to the mucosa of the colon and rectum. IBD symptoms include abdominal pain, diarrhea, bloody stool, fatigue, and weight loss. IBD is usually diagnosed in young adults through symptoms, laboratory tests and endoscopic examinations. The prevalence of IBD has increased in recent decades, suggesting possible environmental factors in its development. Significant differences have been found in the gut microbiome composition of IBD patients compared to healthy individuals. The microbiome of patients shows a decrease in beneficial microbes and an increase in harmful ones. This dysbiosis can affect gut health and promote inflammation. IBD is a complex disease that requires a multidisciplinary approach for diagnosis and treatment. Ongoing research is necessary to better understand the pathogenesis of the disease and to discover new treatment methods.

The main purpose of this thesis was to determine the gut microbiota composition of the microbial community of IBD patients and healthy controls fecal samples based on sequencing of 16S rRNA gene (V3-V4 regions). In addition, the differences in gut microbial communities between IBD patients and healthy controls were compared. The results showed that there are small and specific differences in the gut microbiota composition and its diversity. In alpha diversity analysis, there was a statistically significant difference in the Shannon diversity index between healthy individuals and IBD subjects, but when comparing the observed genera, no statistically significant differences were found. In the beta diversity principal component analysis, the results indicate that samples from inflammatory bowel disease patients cluster separately from controls. In patients with Crohn's disease and the control group, 46 bacterial genus were found, and in patients with ulcerative colitis and the control group, 38 genus were

found, with statistically significant differences in diversity. Patients with Crohn's disease and ulcerative colitis shared 33 bacterial genera. Future studies it is necessary to conduct metagenomic analysis and perform functional assays to draw better conclusions and identify more precise changes in microbial communities.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Annabel Klemetsa ja Elin Orgi, kelle põhjalik tagasiside ja toetus aitas väga kaasa lõputöö kirjutamisele ja valmimisele. Lisaks tänan genoomika instituudi mikrobiomika töögrupi magistranti Annabel Toome ja Linda Sootakut, kes olid abiks laboritöös. Olen tänulik ka kõigile teistele meie uurimisgrupi liikmetele, kelle nõuanded olid toeks töö tegemisel.

KIRJANDUSE LOETELU

- Brody, H. (2020). The gut microbiome. *Nature*, 577(7792), S5–S5.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-00194-2>
- Burisch, J., & Munkholm, P. (2013). Inflammatory bowel disease epidemiology. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29(4), 357.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32836229fb>
- Caetano, M. A. F., & Castelucci, P. (2022). Role of short chain fatty acids in gut health and possible therapeutic approaches in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Clinical Cases*, 10(28), 9985–10003. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i28.9985>
- Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–1725. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316723>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Clemente, J. C., Manasson, J., & Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ*, 360, j5145. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5145>
- de Mattos, B. R. R., Garcia, M. P. G., Nogueira, J. B., Paiatto, L. N., Albuquerque, C. G., Souza, C. L., Fernandes, L. G. R., Tamashiro, W. M. da S. C., & Simioni, P. U. (2015).

Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation*, 2015, 493012. <https://doi.org/10.1155/2015/493012>

Dharni, K., Singh, A., Sharma, S., Midha, V., Kaur, K., Mahajan, R., Dulai, P. S., & Sood, A. (2023). Trends of inflammatory bowel disease from the Global Burden of Disease Study (1990-2019). *Indian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1007/s12664-023-01430-z>

Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>

Dorrestein, P. C., Mazmanian, S. K., & Knight, R. (2014). Finding the Missing Links among Metabolites, Microbes, and the Host. *Immunity*, 40(6), 824–832. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.015>

Fenneman, A. C., Weidner, M., Chen, L. A., Nieuwdorp, M., & Blaser, M. J. (2023). Antibiotics in the pathogenesis of diabetes and inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(2), 81–100. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00685-9>

Flynn, S., & Eisenstein, S. (2019). Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surgical Clinics of North America*, 99(6), 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.08.001>

- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., ... Pedersen, O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, *528*(7581), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>
- Franzosa, E. A., Sirota-Madi, A., Avila-Pacheco, J., ... Xavier, R. J. (2019). Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*, *4*(2), 293–305. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0306-4>
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: A review. *Antonie van Leeuwenhoek*, *113*(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R., & Ley, R. E. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell*, *158*(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W. F., & Veldhuyzen van Zanten, S. J. O. (2006). Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(11), 4136–4141. <https://doi.org/10.1128/jcm.01004-06>
- Halfvarson, J., Brislawn, C. J., Lamendella, R., ... Jansson, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *Nature microbiology*, *2*, 17004. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.4>

- Hall, A. B., Yassour, M., Sauk, J., ... Huttenhower, C. (2017). A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Medicine*, 9(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0490-5>
- Heintz-Buschart, A., & Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends in Microbiology*, 26(7), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>
- Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V., & Perez Perez, G. I. (2017). Gut Microbiome and Antibiotics. *Archives of Medical Research*, 48(8), 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.004>
- Imhann, F., Bonder, M. J., Vila, A. V., ... Zhernakova, A. (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*, 65(5), 740–748. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310376>
- Imhann, F., Vila, A. V., Bonder, M. J., ... Weersma, R. K. (2018). Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(1), 108–119. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312135>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07>
- Kaistha, A., & Levine, J. (2014). Inflammatory Bowel Disease: The Classic Gastrointestinal Autoimmune Disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 44(11), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2014.10.003>

- Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(12), 720–727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Kim, S., Kim, J.-H., Park, B. O., & Kwak, Y. S. (2014). Perspectives on the therapeutic potential of short-chain fatty acid receptors. *BMB Reports*, 47(3), 173–178. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.3.272>
- Knight, R., Jansson, J., Field, D., ... Gilbert, J. A. (2012). Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology*, 30(6), 513–520. <https://doi.org/10.1038/nbt.2235>
- Knoll, R. L., Forslund, K., Kultima, J. R., Meyer, C. U., Kullmer, U., Sunagawa, S., Bork, P., & Gehring, S. (2017). Gut microbiota differs between children with Inflammatory Bowel Disease and healthy siblings in taxonomic and functional composition: A metagenomic analysis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(4), G327–G339. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00293.2016>
- Konidari, A., Dickens, D., & Pirmohamed, M. (2021). Inflammatory Bowel Disease: A Personalized Approach. *Frontiers in Pediatrics*, 8, 620545. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.620545>
- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., Forslund, K., Bork, P., & de Vos, W. M. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-

- school children. *Nature Communications*, 7(1), 10410.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10410>
- Kuziel, G. A., & Rakoff-Nahoum, S. (2022). The gut microbiome. *Current Biology*, 32(6), R257–R264. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.02.023>
- Lakatos, P. L., & Burisch, J. (2015). Environment and environment in IBDs: Partners in crime. *Gut*, 64(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308460>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Lane, E. R., Zisman, T. L., & Suskind, D. L. (2017). The microbiota in inflammatory bowel disease: Current and therapeutic insights. *Journal of Inflammation Research*, 10, 63–73. <https://doi.org/10.2147/JIR.S116088>
- Lee, K.-S., Jeong, Y.-J., & Lee, M.-S. (2021). Escherichia coli Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions. *Toxins*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/toxins13060416>
- Liang, G. (2021). Altered gut bacterial and metabolic signatures and their interaction in inflammatory bowel disease. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(4), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.10.003>

- Lozupone, C. A., Stombaugh, J., Gonzalez, A., Ackermann, G., Wendel, D., Vázquez-Baeza, Y., Jansson, J. K., Gordon, J. I., & Knight, R. (2013). Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Research*, 23(10), 1704–1714. <https://doi.org/10.1101/gr.151803.112>
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., ... Typas, A. (2018). Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*, 555(7698), 623–628. <https://doi.org/10.1038/nature25979>
- Maier, L., & Typas, A. (2017). Systematically investigating the impact of medication on the gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 39, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.001>
- Malik, M. A. (2015). MDR1C3435T Polymorphism and Inflammatory Bowel Disease. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 21(2), 121. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.153843>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., ... Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Matsuoka, K., & Kanai, T. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology*, 37(1), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4>
- Maukonen, J., Kolho, K.-L., Paasela, M., Honkanen, J., Klemetti, P., Vaarala, O., & Saarela, M. (2015). Altered Fecal Microbiota in Paediatric Inflammatory Bowel Disease.

Journal of Crohn's and Colitis, 9(12), 1088–1095. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv147>

Mosca, A., Leclerc, M., & Hugot, J. P. (2016). Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>

Mulder, D. J., Noble, A. J., Justinich, C. J., & Duffin, J. M. (2014). A tale of two diseases: The history of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(5), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.09.009>

Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>

Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., ... Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet (London, England)*, 390(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)

Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>

Oligschlaeger, Y., Yadati, T., Houben, T., Condello Oliván, C. M., & Shiri-Sverdlov, R. (2019). Inflammatory Bowel Disease: A Stressed „Gut/Feeling“. *Cells*, 8(7), 659. <https://doi.org/10.3390/cells8070659>

- Pittayanon, R., Lau, J. T., Leontiadis, G. I., Tse, F., Yuan, Y., Surette, M., & Moayyedi, P. (2020). Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Gastroenterology*, *158*(4), 930-946.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.294>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qiu, P., Ishimoto, T., Fu, L., Zhang, J., Zhang, Z., & Liu, Y. (2022). The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 733992. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.733992>
- Quigley, E. M. M. (2013). Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, *9*(9), 560–569.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Rajca, S., Grondin, V., Louis, E., ... Seksik, P. (2014). Alterations in the Intestinal Microbiome (Dysbiosis) as a Predictor of Relapse After Infliximab Withdrawal in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *20*(6), 978–986. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000036>

- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review of Genetics*, 38(Volume 38, 2004), 525–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>
- Salupere, R. (2001). Inflammatory bowel disease in Estonia: A prospective epidemiologic study 1993-1998. *World Journal of Gastroenterology*, 7(3), 387–388. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i3.387>
- Schirmer, M., Franzosa, E. A., Lloyd-Price, J., ... Huttenhower, C. (2018). Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nature Microbiology*, 3(3), 337–346. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0089-z>
- Schmidt, T. S. B., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, 172(6), 1198–1215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., ... Crittenden, A. N. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 5(1), 3654. <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>
- Shaw, K. A., Bertha, M., Hofmekler, T., ... Kugathasan, S. (2016). Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: A longitudinal study of pediatric subjects with newly

- diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*, 8(1), 75.
<https://doi.org/10.1186/s13073-016-0331-y>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
<https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., ... Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Song, E.-J., Lee, E.-S., & Nam, Y.-D. (2018). Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *Journal of Microbiology*, 56(10), 693–705.
<https://doi.org/10.1007/s12275-018-8238-5>
- Suzuki, T. A., & Worobey, M. (2014). Geographical variation of human gut microbial composition. *Biology Letters*, 10(2), 20131037. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.1037>
- Zhang, Y.-Z., & Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>
- Zimmermann, M., Patil, K. R., Typas, A., & Maier, L. (2021). Towards a mechanistic understanding of reciprocal drug–microbiome interactions. *Molecular Systems Biology*, 17(3), e10116. <https://doi.org/10.15252/msb.202010116>

- Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R., & Goodman, A. L. (2019). Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*, *570*(7762), 462–467. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1291-3>
- Vich Vila, A., Imhann, F., Collij, V., ... Weersma, R. K. (2018). Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Science Translational Medicine*, *10*(472), eaap8914. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8914>
- Vrieze, A., Out, C., Fuentes, S., ... Nieuwdorp, M. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology*, *60*(4), 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.034>
- Wang, W., Chen, L., Zhou, R., Wang, X., Song, L., Huang, S., Wang, G., & Xia, B. (2020). Increased Proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(2), 398–406. <https://doi.org/10.1128/jcm.01500-13>
- Weersma, R. K., Zhernakova, A., & Fu, J. (2020). Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut*, *69*(8), 1510–1519. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320204>
- Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J. K., & Engstrand, L. (2010). A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease

Phenotypes. *Gastroenterology*, 139(6), 1844-1854.e1.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.049>

Wills, E. S., Jonkers, D. M. A. E., Savelkoul, P. H., Masclee, A. A., Pierik, M. J., & Penders,

J. (2014). Fecal Microbial Composition of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease

Patients in Remission and Subsequent Exacerbation. *PLOS ONE*, 9(3), e90981.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090981>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

U.S. Department of Health & Human Services. (2022). Inflammatory bowel disease (IBD). Kasutatud 30.03.2024, <https://www.cdc.gov/ibd/what-is-IBD.htm>

Arst. (2016). Põletikuline soolehaigus, haavandiline koliit ja Crohni tõbi, paljutahuline nii Eestis kui ka Euroopas. Kasutatud 30.03.2024, <https://eestiarst.ee/poletikuline-soolehaigus-haavandiline-koliit-ja-crohni-tobi-paljutahuline-nii-eestis-kui-ka-euroopas/>

Arst. (2022). Põletikuline soolehaigus. Kasutatud 19.02.2024, <https://arst.ee/haigused-ja-seisundid/poletikuline-soolehaigus/>

Perearst. (2014). Põletikulise soolehaiguse epidemioloogiast, kliinilisest leiust, soolevälistest ilmingutest, diagnostikast ja ravist. Kasutatud 19.02.2024, <https://www.med24.ee/ajakirjad/perearst/oktoober-2014/poletikulise-soolehaiguse-epidemioloogiast-kliinilisest-leiust>

LISAD

LISA 1

Tabel 1. Väljaheiteproovide mõõdetud DNA kontsentratsioonid

Proovi kood	Staat	DNA kontsentratsioon (ng/µl)	Proovi kood	Staat	DNA kontsentratsioon (ng/µl)
D 001	IBD	18,67	D 048	IBD	26,04
D 002	IBD	69,17	D 049	IBD	66,8
D 003	IBD	47,62	D 050	IBD	96,91
D 004	IBD	43,24	D 053	IBD	61,85
D 005	IBD	47,66	D 054	IBD	56,31
D 007	IBD	42,47	D 055	IBD	18,27
D 008	IBD	34,89	D 056	IBD	43,92
D 009	IBD	51,46	D 058	IBD	14,8
D 010	IBD	45,41	D 059	IBD	43,16
D 011	IBD	51,47	D 060	IBD	24,76
D 012	IBD	68,83	D 061	IBD	66,3
D 013	IBD	35,79	D 062	IBD	34,88
D 014	IBD	45,23	D 063	IBD	63,85
D 015	IBD	83,58	D 066	IBD	15,72
D 017	IBD	80,36	D 067	IBD	37,21
D 020	IBD	52,31	D 069	IBD	40,35
D 022	IBD	57,25	D 071	IBD	76,93
D 023	IBD	41,39	D 072	IBD	11,33
D 024	IBD	86,48	D 074	IBD	41,94
D 025	IBD	22,28	D 075	IBD	81,13
D 026	IBD	75,75	D 076	IBD	45,08
D 028	IBD	25,42	D 077	IBD	48,74
D 029	IBD	11,83	D 078	IBD	42,77
D 030	IBD	65,38	D 079	IBD	74,07
D 030 2	IBD	65,38	D 080	IBD	90,55
D 031	IBD	47,52	D 081	IBD	79,54
D 032	IBD	70,51	D 082	IBD	59,56
D 034	IBD	75,01	D 083	IBD	49,63
D 035	IBD	11,65	D 085	IBD	49,09
D 036	IBD	16,15	D 086	IBD	41,6
D 037	IBD	16,86	D 089	IBD	68,78
D 039	IBD	11,66	D 090	IBD	59,54
D 043	IBD	89,35	D 092	IBD	54,26
D 044	IBD	10,42	D 093	IBD	86,14
D 045	IBD	82,42	D 094	IBD	48,45
D 046	IBD	82,42	D 095	IBD	86,27
D 047	IBD	67,52	D 096	IBD	10,83

Proovi kood	Staatus	DNA kontsentratsioon (ng/µl)	Proovi kood	Staatus	DNA kontsentratsioon (ng/µl)
D_098	IBD	54,02	VDP9LB	Kontroll	57,97
D_099	IBD	58,94	VDUOAE	Kontroll	44,34
D_101	IBD	54,06	VF7XWT	Kontroll	57,97
D_102	IBD	36,1	VFHVX3	Kontroll	86,15
V0IQLM	Kontroll	90,8	VFR59D	Kontroll	78,46
V110PY	Kontroll	90,11	VGHF2J	Kontroll	34,3
V16X45	Kontroll	80,7	VH24V1	Kontroll	69,5
V1SUTZ	Kontroll	28,75	VHA7EA	Kontroll	67,42
V1ZCZ8	Kontroll	62,72	VHFWD7	Kontroll	93,91
V218Q5	Kontroll	57,89	VHGSNF	Kontroll	71,15
V2Y9TX	Kontroll	42,92	VHWRAO	Kontroll	37,82
V36VGE	Kontroll	12,12	V14OSB	Kontroll	85,06
V3LK6T	Kontroll	55,02	V19BD1	Kontroll	45,75
V4OU5B	Kontroll	58,26	VIUZLM	Kontroll	47,81
V53FDC	Kontroll	59,04	VIZ7JY	Kontroll	89,08
V5ULXX	Kontroll	66,29	VJ5211	Kontroll	130,3
V63S5Q	Kontroll	42,6	VKWK8O	Kontroll	65,39
V6SF50	Kontroll	45,97	VM14J6	Kontroll	24
V6X50U	Kontroll	89,33	VMIPDW	Kontroll	90,58
V7LAPG	Kontroll	64,81	VNIMGS	Kontroll	80
V7RW2S	Kontroll	64,02	VNNCHP	Kontroll	99,28
V887SA	Kontroll	46,99	VOAQZY	Kontroll	83,42
V88HBJ	Kontroll	60,31	VON1OO	Kontroll	76,34
V8F1JC	Kontroll	61,41	VP8PV0	Kontroll	64,09
V8NRLG	Kontroll	86,13	VPI3HC	Kontroll	53,55
V8ODQ7	Kontroll	71,7	VPJKHK	Kontroll	116,7
V8RU1D	Kontroll	51,66	VQ6PCX	Kontroll	100,4
V8SP4T	Kontroll	44,42	VQ8K41	Kontroll	86,14
V96QEP	Kontroll	66,08	VQFHUE	Kontroll	56,42
V9DHHW	Kontroll	84,4	VQ16N0	Kontroll	81,76
V9GP2F	Kontroll	92,12	VQQ90U	Kontroll	66,54
VA1T4X	Kontroll	70,81	VR67U6	Kontroll	60,69
VA8XPB	Kontroll	83,52	VREE6Z	Kontroll	54,37
VAJ380	Kontroll	80,37	VS0ATU	Kontroll	60,18
VAYQK7	Kontroll	71,55	VS0RGM	Kontroll	72,3
VCCQE4	Kontroll	41,29	VS1ZST	Kontroll	75,88
VCEVC7	Kontroll	59,02	VS9EPY	Kontroll	113,1
VCG3ZR	Kontroll	42,47	VSGFUT	Kontroll	55,19
VCM7SL	Kontroll	47,2	VSHD6H	Kontroll	58,65
VCTAHJ	Kontroll	87,29	VSQ8XR	Kontroll	59,06
VCTJFG	Kontroll	67,34	VSSWWX	Kontroll	87,23
VCUT60	Kontroll	40,73	VT4OXO	Kontroll	74,23
VD3ZPR	Kontroll	86,87	VT8EKH	Kontroll	66,01

Proovi kood	Staatus	DNA kontsentratsioon (ng/µl)	Proovi kood	Staatus	DNA kontsentratsioon (ng/µl)
VU4OMZ	Kontroll	79,33			
VU5PYH	Kontroll	70,79			
VUCVXM	Kontroll	74,74			
VUYRU9	Kontroll	65,01			
VV0MRX	Kontroll	105,2			
VVAE9L	Kontroll	68,41			
VVOBA0	Kontroll	95,48			
VWG960	Kontroll	77,69			
VWX93I	Kontroll	66,41			
VWXSYY	Kontroll	55,59			
VX38WF	Kontroll	81,58			
VX6G26	Kontroll	60,32			
VXGCCZ	Kontroll	56,52			
VYJY1Q	Kontroll	82,58			
VYN8HQ	Kontroll	63,52			
VZ24LG	Kontroll	77,83			
VZK77E	Kontroll	90,57			

LISA 2

Tabel 2. Suurima esinemissagedusega hõimkonnad kolme uuritava grupi (Crohni tõbi, haavandiline koliit, kontrollgrupp) vahel.

Proovitüüp	Hõimkonnad	Suhteline esinemissagedus (%)
Crohni tõbi (N = 45)	<i>Bacillota</i>	46,58
	<i>Bacteroidota</i>	28,50
	<i>Pseudomonadota</i>	12,66
	<i>Actinomycetota</i>	10,73
	<i>Verrucomicrobiota</i>	0,37
	<i>Mycoplasmata</i>	0,34
	<i>Acidobacteriota</i>	0,33
	<i>Cyanobacteria</i>	0,20
	<i>Chloroflexota</i>	0,08
	<i>Euryarchaeota</i>	0,06
Haavandiline koliit (N = 32)	<i>Bacillota</i>	46,09
	<i>Bacteroidota</i>	31,56
	<i>Actinomycetota</i>	11,48
	<i>Pseudomonadota</i>	8,27
	<i>Fusobacteriota</i>	1,13
	<i>Acidobacteriota</i>	0,60
	<i>Verrucomicrobiota</i>	0,45
	<i>Chloroflexota</i>	0,15
	<i>Euryarchaeota</i>	0,11
	<i>Mycoplasmata</i>	0,05
Kontrollgrupp (N = 99)	<i>Bacillota</i>	58,15
	<i>Bacteroidota</i>	27,62
	<i>Actinomycetota</i>	8,24
	<i>Pseudomonadota</i>	3,62
	<i>Euryarchaeota</i>	0,99
	<i>Verrucomicrobiota</i>	0,79
	<i>Mycoplasmata</i>	0,25
	<i>Cyanobacteria</i>	0,08
	<i>Acidobacteriota</i>	0,07
	<i>Spirochaetota</i>	0,07

LISA 3

Tabel 3. Suurima esinemissagedusega perekonnad kolme uuritava grupi (Crohni tõbi, haavandiline koliit, kontrollgrupp) vahel.

Proovitüüp	Perekond	Suhteline esinemissagedus (%)
Crohni tõbi (N = 45)	<i>Bacteroides</i>	14,50
	<i>Prevotella 9</i>	7,44
	<i>Escherichia-Shigella</i>	6,58
	<i>Faecalibacterium</i>	6,38
	<i>Blautia</i>	6,21
	<i>Bifidobacterium</i>	5,17
	<i>Collinsella</i>	4,65
	<i>Agathobacter</i>	2,30
	<i>Asteroleplasma</i>	2,07
	<i>Roseburia</i>	1,92
Haavandiline koliit (N = 32)	<i>Bacteroides</i>	16,17
	<i>Prevotella 9</i>	7,81
	<i>Blautia</i>	6,67
	<i>Bifidobacterium</i>	6,31
	<i>Faecalibacterium</i>	5,10
	<i>Escherichia-Shigella</i>	4,57
	<i>Collinsella</i>	4,05
	<i>Roseburia</i>	3,55
	<i>Agathobacter</i>	2,39
	<i>Catenibacterium</i>	1,60
Kontrollgrupp (N = 99)	<i>Bacteroides</i>	12,36
	<i>Prevotella 9</i>	8,47
	<i>Blautia</i>	7,82
	<i>Faecalibacterium</i>	6,58
	<i>Collinsella</i>	4,01
	<i>Agathobacter</i>	3,01
	<i>Roseburia</i>	2,90
	<i>Bifidobacterium</i>	2,82
	<i>Catenibacterium</i>	2,04
	<i>Subdoligranulum</i>	1,93

LISA 4

Tabel 4. Shannoni mitmekesisuse keskväärtused erinevates uuringugruppides.

Proovitüüp	Shannoni mitmekesisuse keskväärtus	Vahemik (min - max)
Kontrollgrupp (N = 99)	3,19	2,11 – 3,91
Crohni tõbi (N = 45)	2,81	1,41 – 3,77
Haavandiline koliit (N = 32)	2,77	1,72 – 3,79

LISA 5

Tabel 5. Vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtused erinevates uuringugruppides.

Proovitüüp	Vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtus	Vahemik (min - max)
Kontrollgrupp (N = 99)	141,67	56 – 291
Crohni tõbi (N = 45)	153,82	76 – 363
Haavandiline koliit (N = 32)	147,41	64 – 431

LISA 6

Tabel 6. Shannoni mitmekesisuse erinevused IBD patsientidel võrreldes tervete uuritavatega.

Proovitüüp	Keskvärtus	Usaldusintervalli vahemik (min - max)
Crohni tõbi (N = 45)	-0,379	-0,564 – -0,195
Haavandiline koliit (N = 32)	-0,416	-0,624 – -0,208

LISA 7

Tabel 7. Vaadeldud perekondade erinevused IBD patsientidel võrreldes tervete uuritavatega.

Proovitüüp	Keskvärtus	Usaldusintervalli vahemik (min - max)
Crohni tõbi (N = 45)	12,2	-9,50 – 33,8
Haavandiline koliit (N = 32)	5,75	-22,8 – 34,3

LISA 8

Tabel 8. Bakteriperekondade suhtelise esinemissageduse võrdlused Crohni tõve ja kontrollgrupi puhul. * on tähistatud ühised bakteriperekonnad, mille muutused esinesid nii Crohni tõve kui ka haavandilise koliidi puhul.

Perekond	Efekti suurus (Crohni tõbi vs kontrollgrupp)	P-väärtus (korrigeeritud, FDR < 0,05)
<i>Escherichia-Shigella</i> *	-0,503213841	0,006824151
<i>Fusicatenibacter</i>	0,224380168	0,012739799
[<i>Eubacterium</i>] <i>hallii</i> group*	0,626984088	0,002688359
<i>Subdoligranulum</i> *	0,272881039	0,023733399
<i>Lachnospiraceae</i> <i>NK4A136</i> group*	0,387576486	0,034395179
<i>Methanobrevibacter</i> *	0,461886198	0,001808568
[<i>Ruminococcus</i>] <i>gnavus</i> group*	-0,459048803	0,018593672
<i>Holdemanella</i>	0,419724818	0,010754659
<i>Lachnospiraceae</i> <i>ND3007</i> group*	0,266736777	0,011500339
<i>Ruminococcaceae</i> <i>UCG-002</i> *	0,435977746	0,002496612
<i>Streptococcus</i> *	-0,377936717	0,020871999
<i>Coprococcus</i> 1*	0,548119495	0,001323159
<i>Ruminococcus</i> 2*	0,408548407	0,002561062
<i>Lactobacillus</i> *	-0,590986655	0,001457827
<i>Ruminococcus</i> 1*	0,345080134	0,018030183
<i>Christensenellaceae</i> <i>R-7</i> group*	0,601155623	0,000445079
<i>uncultured</i> *	0,646682012	0,000150907
<i>Coprococcus</i> 2	0,447493741	0,007042469
<i>Paraprevotella</i> *	0,347828729	0,025069129
<i>Ruminiclostridium</i> 6*	0,487553291	0,005272965
<i>Ruminococcaceae</i> <i>UCG-005</i> *	0,565820047	0,000625385
[<i>Eubacterium</i>] <i>xylanophilum</i> group*	0,403826872	0,008410285
<i>Butyricoccus</i>	0,35934579	0,026119647
<i>Intestinimonas</i> *	0,520545187	0,00195771
<i>Ruminococcaceae</i> <i>NK4A214</i> group*	0,574811961	0,000370812
<i>Enterorhabdus</i> *	0,541082205	0,001280275
<i>Ruminococcaceae</i> <i>UCG-014</i>	0,452786281	0,004684578
<i>Lachnospiraceae</i> <i>UCG-001</i> *	0,679371944	0,0001135
<i>Ralstonia</i>	-0,551889949	0,006875568
<i>GCA-900066575</i>	0,296432353	0,031219044
<i>Flavonifractor</i>	-0,480398077	0,010317114
<i>Marvinbryantia</i> *	0,680535111	0,000128531
<i>Howardella</i>	0,46982037	0,005864886
<i>Ruminococcaceae</i> <i>UCG-010</i> *	0,573117138	0,00059677
<i>Peptococcus</i>	0,601508261	0,000368748
<i>Family XIII</i> <i>UCG-001</i> *	0,593453961	0,000676087
<i>Family XIII</i> <i>AD3011</i> group*	0,607276043	0,00020396
<i>Eggerthella</i>	-0,491472154	0,017369707
<i>Moryella</i> *	0,696291584	0,00011495
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i> *	0,481171756	0,003470719
<i>Lachnospiraceae</i> <i>FCS020</i> group*	0,677476261	0,000230112
<i>Ruminococcaceae</i> <i>UCG-009</i> *	0,485869328	0,005472714
<i>Defluviitaleaceae</i> <i>UCG-011</i> *	0,524255331	0,00247955
<i>Oxalobacter</i>	0,448038494	0,009332014
<i>uncultured</i> 18*	0,519410493	0,003543597

LISA 9

Tabel 9. Bakteriperekondade suhtelise esinemissageduse võrdlused haavandilise koliidi ja kontrollgrupi puhul. * on tähistatud ühised bakteriperekonnad, mille muutused esinesid nii haavandilise koliidi kui ka Crohni tõve puhul.

Perekond	Efekti suurus	P-väärtus (korrigeeritud)
<i>Escherichia-Shigella</i> *	0,442094197	0,046766511
[<i>Eubacterium</i>] <i>hallii</i> group*	-0,500533679	0,025032076
<i>Subdoligranulum</i> *	-0,587943146	0,005273021
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i> group*	-0,475699713	0,011156435
<i>Methanobrevibacter</i> *	-0,407604174	0,027109658
[<i>Ruminococcus</i>] <i>gnavus</i> group*	0,474993124	0,04725394
<i>Lachnospiraceae ND3007</i> group*	-0,395708998	0,012600867
<i>Ruminococcaceae UCG-002</i> *	-0,593044402	0,006674897
<i>Streptococcus</i> *	0,499574139	0,013391111
<i>Coprococcus 1</i> *	-0,579775637	0,006182247
<i>Ruminococcus 2</i> *	-0,474687319	0,00940922
<i>Lactobacillus</i> *	0,410132153	0,026656485
<i>Ruminococcus 1</i> *	-0,452168242	0,011356481
<i>Christensenellaceae R-7</i> group*	-0,512984349	0,006159062
uncultured*	-0,595746858	0,004962035
<i>Paraprevotella</i> *	-0,498206129	0,01254767
[<i>Eubacterium</i>] <i>coprostanoligenes</i> group	-0,473674511	0,042775258
<i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	-0,522978108	0,010776434
<i>Ruminiclostridium 6</i> *	-0,625553535	0,005097262
<i>Ruminococcaceae UCG-005</i> *	-0,654586416	0,003681646
[<i>Eubacterium</i>] <i>xylanophilum</i> group*	-0,395037874	0,033607209
<i>Intestinimonas</i> *	-0,449813221	0,021879264
<i>Ruminococcaceae NK4A214</i> group*	-0,525833781	0,006594761
<i>Ruminococcaceae UCG-003</i>	-0,322890517	0,039023855
<i>Enterorhabdus</i> *	-0,472561827	0,019653826
<i>Lachnospiraceae UCG-001</i> *	-0,509926499	0,01809715
<i>Ruminiclostridium 9</i>	-0,47918952	0,010014516
<i>Marvinbryantia</i> *	-0,688267926	0,001826233
<i>Ruminococcaceae UCG-010</i> *	-0,561615964	0,007012912
Family XIII UCG-001*	-0,586462458	0,005155795
<i>Adlercreutzia</i>	-0,449528458	0,044867167
Family XIII AD3011 group*	-0,855233664	0,000251118
<i>Moryella</i> *	-0,499549232	0,018473754
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i> *	-0,541547404	0,009803826
<i>Lachnospiraceae FCS020</i> group*	-0,922398802	0,000134851
<i>Ruminococcaceae UCG-009</i> *	-0,49168008	0,016831172
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i> *	-0,585649955	0,006041055
GCA-900066225	-0,50868182	0,015202354
uncultured 18*	-0,527211984	0,017378566

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lisann Adamson (sünniaeg 28.08.1999),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Soole mikroobikoosluse erinevused põletikulise soolehaigusega patsientidel“, mille juhendajad on Annabel Klemets ja Elin Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lisann Adamson

30.05.2024