

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

**Eesti jämesoolevähi sõeluuringu patsientide mikrobioomi koosluste erinevused soole
koeproovides**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Annabel Raudsepp

Juhendajad MSc Kertu Liis Krigul
PhD Elin Org

TARTU 2021

Eesti jämesoolevähi sõeluuringu patsientide mikrobioomi koosluste erinevused soole koeproovides

Inimese soolestiku mikrobioota on mitmekesine mikroorganismide kooslus, mis mõjutab meie organismi erinevaid füsioloogilisi protsesse ja tervist. Samas võivad soolestiku mikrobioota muutused mõjutada erinevate komplekshaiguste väljakujunemist. Üks nendest haigustest on jämesoolevähk (CRC), kus mikrobioomi analüüsimine varajases staadiumis esinevatest healoomulistest polüüpidest võib anda olulist teavet jämesoolevähi varajaseks diagnoosimiseks. Töö käigus analüüsiti Eesti jämesoolevähi sõeluuringu raames kogutud jämesoole koeproovide mikrobioomi koosseisu. Tulemustena selgus, et enimesinevad hõimkonnad ja perekonnad on samasugused kõikides koetüüpides peale vähkkoe ning mikroobne mitmekesisus terve epiteel- ja polüübikoe suhtes ei erine. Täpsemate mikroobikoosluste muutuste tuvastamiseks tuleb edaspidi kaasata uuringusse suurem valim koos erinevat tüüpi kogutud proovidega.

Märksõnad: mikrobiom, mikrobioota, jämesoolevähk, 16S rRNA sekveneerimine

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Gut tissue microbiome profile in Estonian colorectal cancer screening patients

The human gut microbiota is a diverse community of microorganisms, which has a significant influence on the physiological processes and health. The microbiota can strengthen the human organism or facilitate the development of various complex diseases, of which one is colorectal cancer (CRC). Changes in microbial composition in the case of healthy polyps or at early stages of cancer may help to prevent the development of tumorigenesis. The aim of this thesis was to analyze the microbial composition of samples collected during the Estonian colorectal cancer screening program. The results indicate no differentially abundant genera or phyla throughout different tissue samples, except for cancer tissue, and show no variances in microbial richness of the samples. Future studies should consider larger sample sizes with greater amount of samples to analyze.

Keywords: microbiome, microbiota, colorectal cancer, 16S rRNA sequencing

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Inimese soolestiku mikrobiota ja mikrobiom	7
1.2. Inimese mikrobiota varieeruvust mõjutavad faktorid	8
1.3. Mikrobiota ja mikrobiomi analüüsimeetodid	9
1.4. Jämesoolevähk	11
1.5. Jämesoolevähi sõeluuring	13
1.6. Soolestiku mikrobiomi seos jämesoolevähi tekkega	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika	21
2.2.1. Proovide kogumine ja hoiustamine	21
2.2.2. DNA eraldamine ja sekveneerimine	23
2.2.3. Mikroobikoosluse määramine	24
2.2.4. Andmete analüüs	24
2.3. Tulemused	25
2.3.1. Terve soole epiteelkoe mikroobikooslus	26
2.3.2. Polüüpidega patsientide soole epiteelkoe mikroobikoosluse analüüs	27
2.3.3. Patsientide polüüübikoe ja kontrollgrupi epiteelkoe mikrobiomi võrdlus	28

2.3.4. Patsientide ja kontrollgrupi epiteelkudede mikrobioomi võrdlus	30
2.3.5. Mikroobikooslus vähikoes ja terves epiteelkoes	31
2.4. Arutelu	32
KOKKUVÕTE	35
RESÜMEE / SUMMARY	36
TÄNUSÕNAD	37
KIRJANDUSE LOETELU	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LISAD	50
LISA S1	50
LISA S2	51
LISA S3	52
LIHTLITSENTS	53

KASUTATUD LÜHENDID

ASV – amplikonjärjestuse variandid (*amplicon sequence variants*)

CD – Crohni tõbi (*Crohn's disease*)

CDT – tsütoleetaalne väljaulatuv toksiin (*cytolethal distending toxin*)

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

CRC – jämesoolevähk (*colorectal cancer*)

FAP – perekondlik adenomatoosne polüpoos (*familial adenomatous polyposis*)

FIT – immuunmeetodil põhinev peitveretest (*fecal immunochemical test*)

IARC – rahvusvahelise vähiuurimise keskus (*International Agency for Research on Cancer*)

IBD – põletikuline soolehaigus (*inflammatory bowel disease*)

IL – interleukiin (*interleukin*)

NF κ B – tuumafaktor kapp-B (*nuclear factor kappa-B*)

NSAID – mittesteroidseid põletikuvastased ravimid (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

OTU – operatsiooniline taksonoomiline ühik (*operational taxonomic unit*)

PCA – peakomponentanalüüs (*principal component analysis*)

RNS – reaktiivsed lämmastikuühendid (*reactive nitrogen species*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

SCFA – lühikese ahelaga rasvhapped (*short-chain fatty acids*)

UC – haavandiline koliit (*ulcerative colitis*)

SISSEJUHATUS

Inimese soolestiku mikrobiota on mitmekesine mikroorganismide kogukond, mis mõjutab inimorganismi erinevaid protsesse, näiteks toitainete seedimist ja immuunsüsteemi talitlust (Cresci ja Bawden, 2015). Soolestiku mikrobiota mitmekesisust mõjutavad nii inimese geneetiline eripära kui ka elustiili ja -keskkonnast tulenevad tegurid, mistõttu on populatsiooni mikrobiota taksonoomiline koosseis väga varieeruv (Debelius jt, 2016; Sonnenburg ja Sonnenburg, 2017; Thursby ja Juge, 2017). Soolestiku mikrobiota ja mikrobiomi analüüsiks on tänapäeval mitmeid erinevaid võimalusi. Aina enam kasutatakse bakteriaalse DNA järjestamise meetodeid nagu 16S rRNA geeni või metagenoomi sekveneerimine. Need kaks meetodit võimaldavad kindlaks määrata mikroobikooslust ja tuvastada suurema osatähtsusega bakteriaalsed taksonid (Cao jt, 2017; Song jt, 2018).

Jämesoolevähk (CRC) on komplekshaigus, mille esinemissagedus on maailmas ja Eestis suurenenud viimaste aastakümnete jooksul. Selle haiguse väljakujunemine kestab sageli 10-15 aastat ning kulgeb varajastes staadiumites märgatavate sümptomiteta. Vähi varajane diagnoosimine on kriitiline elulemuse jaoks, sest I staadiumis on diagnoositud patsientide viie aasta elulemus 90%, IV staadiumis aga 15% (Innos jt, 2018). Jämesoolevähi tuvastamiseks on paljudes erinevates riikides käivitatud sõeluuringuprogramm, sealhulgas ka Eestis. Kasvaja diagnoosimiseks tehakse esmalt väljaheitest peitvere analüüs ning seejärel vajadusel koloskoopiline või histoloogiline analüüs (Dekker jt, 2019). Olemasolevate analüüsimeetodite kõrval on üks jämesoolevähi paljulubav ennetusvahend soolestiku mikrobiota koosluse analüüsimine vähi varajastes staadiumites.

Sellest tulenevalt on töö eesmärk analüüsida riiklikus jämesoolevähi sõeluuringu programmis osalevate inimeste koeproovidest mikroobikooslus, kasutades proovidest eraldatud bakteriaalse DNA 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist. Samuti soovitakse võrrelda mikroobikoosluse võimalikke erinevusi polüüpe ja tervet epiteelkude sisaldavate proovide vahel.

Käesolev töö on valminud geenitehnoloogia bakalaureuseõppekava raames Tartu Ülikooli loodus- ja täppisteaduste valdkonna genoomika instituudi Eesti geenivaramu teaduskeskuse mikrobioomika uurimisgrupis. Töö metoodilise osa katsed viidi läbi Tartu Ülikooli loodus- ja täppisteaduste valdkonna molekulaar- ja rakubioloogia instituudis biotehnoloogia õppetoolis. Uuringule on antud nõusolek TÜ inimuuringute eetikakomiteest (loa number 292/T-17).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Inimese soolestiku mikrobiota ja mikrobiom

Inimese soolestiku mikrobiota on mitmekesine kooslus erinevatest mikroorganismidest, mille hulka kuuluvad bakterid, arhed, seened, viirused ning protistid ehk algloomad. Kui mõiste „mikrobiota“ all peetakse silmas kõiki mingis keskkonnas või piirkonnas soolestikus elavaid mikroorganisme, siis mõiste „mikrobiom“ hõlmab kõikide nende organismide genoomide kogumit. Inimese mikrobiota koosneb ligikaudu $3,8 \cdot 10^{13}$ organismist, mis seab selle arvukuse võrdseks inimorganismi enda rakkude arvuga (Sender jt, 2016). Samas on mikrobiomis esinevate erinevate geenide hulk inimese geenide kogusest üle 100 korra suurem (Thursby ja Juge, 2017). Mikrobiootat kutsutakse isegi eraldi elundiks, mis oma talitluse ja geneetilise komponendiga mõjutab suurel määral inimese füsioloogilisi protsesse ja erinevate haiguste väljakujunemist (Cresci ja Bawden, 2015).

Valdav osa soolestiku mikrobiotast paikneb alumistes sooleteedes ehk jämesooles. Mikroorganismide arvukus on aga tunduvalt väiksem ülemistes sooleteedes nagu söögitoru, magu ja peensool (Bäckhed jt, 2005). Arvukuse erinevus tuleneb sellest, et soolestiku ülemise osa pH võib langeda küllatki madalale sinna erituvate hapete, sapi ja kõhunäärmeensüümide tõttu. Samuti takistavad peensoole peristaltilised kokkutõmbed suure hulga mikroorganismide kinnitumist sooleseina limaskihti (Guarner ja Malagelada, 2003). Paljud inimese jämesooles elavad mikroorganismid on ranged anaeroobid, mis tähendab seda, et alumiste sooleteede hapnikuvaba keskkond on nende ellujäämiseks hädavajalik (Bäckhed jt, 2005).

Mikrobiota toetab ja tugevdab organismi läbi mitmete erinevate protsesside. Bakterid, kes moodustavad põhilise osa mikrobiotast, kasutavad mitmesuguseid ensüüme, et lagundada ja kääritada toidus leiduvaid taimseid polüsahhariide, mille jaoks inimorganismil endal ensüümid puuduvad (Rambaud jt, 2007). Polüsahhariidide kääritamisel saadud mikroorganismide ainevahetusproduktid on inimese jaoks olulised, kuna mõjutavad nii ainevahetust kui immuunsüsteemi ja närvisüsteemi toimimist (Hills jt, 2019). Samuti aitab soolestiku mikrobiota toota inimesele vajalikke vitamiine, näiteks K-vitamiini ja biotiini, ning osaleb erinevate mineraalainete ainevahetusprotsessides (Skrypnik ja Suliburska, 2018).

Soolestiku mikrobiota üheks olulisemaks funktsiooniks on inimese immuunsüsteemi talitluse reguleerimine. Immuunsüsteem peab olema võimeline taluma soolestikule omaseid mikroorganisme, samal ajal on tähtis ka pädevalt reageerida väliskeskkonnast pärit

patogeenidele (Gorkiewicz ja Moschen, 2018). Soolestiku mikrobioota on pidevas vastastikmõjus sooleteede limaskestaga seotud lümfoidkoega ning on oluline ebavajalike põletiku- ja teiste immuunreaktsioonide vältimiseks (Shi jt, 2017).

Soolestiku mikrobioota kasuliku mõju kõrval võivad sealsed mikroorganismid ka soodustada mitmesuguste haiguste teket. Mikrobioomi taksonoomiliste ehk koosseisuliste muutustega seostatakse erinevaid komplekshaiguseid, sealhulgas ainevahetushaiguseid (rasvumine, diabeet jt), põletikulist soolehaigust (IBD, *inflammatory bowel disease*) ja närvisüsteemi haiguseid (Parkinsoni tõbi jt) (Hills jt, 2019). Neid haiguslikke seisundeid võivad põhjustada erinevad mikroorganismidega seotud tegurid, näiteks on põletikulise soolehaiguse puhul vähenenud soolestikus lühikese ahelaga rasvhapete (SCFA, *short chain fatty acids*) kontsentratsioon, mille hulka kuuluvad butüraat (võihape), propionaat ja atsetaat. Need ühendid kaitsevad sooleteid põletiku tekkimise eest (Singh jt, 2017).

1.2. Inimese mikrobioota varieeruvust mõjutavad faktorid

Inimese soolestiku mikrobioota on väga mitmekesine ja varieeruv. Mikrobioota varieeruvust mõjutavad kogu eluea vältel mitmesugused faktorid, mis on seotud meie geneetilise eripära, elustiili (toitumine, ravimid, hügieen jt) ja keskkonnateguritega (Debelius jt, 2016; Sonnenburg ja Sonnenburg, 2017; Thursby ja Juge, 2017). Seetõttu erineb üksteisest maailma erinevates piirkondades elavate populatsioonide mikrobioota (Vujkovic-Cvijin jt, 2020).

Üheks peamiseks mikroobikoosluse mitmekesisuse mõjutajaks on toitumine. Toitumisharjumusi ja selle mõju mikrobioomile on uurinud teadusgrupid üle maailma ning tuvastatud on märkimisväärseid erinevusi näiteks lääneliku ja Ida-Aasia riikide elanike toitumiseelistuste ja mikrobioota taksonoomilise koosseisu vahel (Wilson jt, 2020). Läänelikke toitumisharjumusi seostatakse üldjuhul väiksema soolestiku mikrobioota mitmekesisusega. (Schnorr jt, 2014).

Jämesoole mikrobioota kasutab toidu- ja energiaallikana paljusid seedimisel tekkinud ühendeid. Erinevatest toiduga saadavatest makrotoitainetest on ühed olulisemad kiudained ehk taimset päritolu polüsahhariidid. Jämesooles mikrobioota hulka kuuluvad bakterid toodavad kiudainetest lühikese ahelaga rasvhapped (SCFA) nagu võihape, propionaat ja atsetaat (Topping ja Clifton, 2001). Lühikese ahelaga rasvhapped on põhiliseks energiaallikaks ka jämesoole epiteelirakkudele (Wilson jt, 2020). Madal kiudainete sisaldus inimese toidus võib seetõttu kaasa tuua olukorra, kus jämesoolebakterid kasutavad energiaallikana jämesoole seinas

paiknevat limaskestast, mis sisaldab suurel määral mikroobidele toiduks sobivaid glükoproteiine. Pikema aja jooksul toimuv limaskestast õhenemine muudab aga seedekulgla kaugemat osa vastuvõtlikumaks erinevatele patogeenidele, mistõttu võivad välja kujuneda erinevad haigused nagu põletikuline soolehaigus (IBD) või jämesoolevähk (Desai jt, 2016).

Soolestiku mikrobiota kooslust mõjutavad ja muudavad pidevalt muuhulgas ka ravimid (Debelius jt, 2016). Kõige rohkem seostatakse mikrobiota koosseisulise varieeruvusega antibiootikumide, kuid mõju võivad avaldada ka ravimid, mille märklauaks on organismi erinevate organsüsteemide rakud ja koed (Debelius jt, 2016). Üldjuhul vähendab igasugune antibiootikumide tarvitamine soolestiku mikrobiota taksonoomilist mitmekesisust, kuid täpsem mõju sõltub manustatavate antibiootikumide toimemehhanismist, doosist ning kasutamise pikkusest (Iizumi jt, 2017). Makroliidide klassi kuuluvate antibiootikumide tarvitamine võib näiteks lastel vähendada mikrobiota hõimkondade *Actinobacteria* arvukust ning suurendada kahe teise suurema hõimkonna *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria* arvukust (Iizumi jt, 2017). Võrreldes antibiootikumidega, mis vähendavad soolestiku mikrobiota mitmekesisust, on mitmete teiste ravimite puhul leitud arvukust suurendavat toimet. Sellise mõjuga on näiteks diabeediravim metformiin, mis reguleerib veresuhkru taset (Forslund jt, 2015).

1.3. Mikrobiota ja mikrobiomi analüüsimeetodid

Esimesed kirjeldatud katsed mikrobiota analüüsimisest pärinevad 17. sajandi lõpust, kui hollandi teadlane Antonie van Leeuwenhoek kasutas enda valmistatud mikroskoopi, et vaadelda suust ja väljaheitest eraldatud bakterikultuure (Pariente, 2019). Tänu tehnoloogia arengule uuritakse tänapäeval mikroobikooslusi põhiliselt nende DNA järjestuste alusel kasutades teise põlvkonna sekveneerimismeetodeid.

Täiemahulise mikrobiomi analüüsi läbiviimiseks on olulised etapid proovide kogumine, nendest bakteriaalse DNA eraldamine, nukleotiidse järjestuse sekveneerimine ning selle tulemusena saadavate andmete bioinformaatiline analüüs, et tuvastada mikrobiomi taksonoomiline koosseis. Iga etapi tehniline iseärasus, näiteks proovide säilitamine või DNA eraldusmeetod, võib suuresti mõjutada lõpptulemusi (Goodrich jt, 2014).

Mikrobiomi koosseisu tuvastamiseks on kasutuses kaks põhilist analüüsimeetodit, milleks on spetsiifilise geeni (sihtmärkamplikon) või kogu genoomi ehk metagenoomi sekveneerimine. Sihtmärkamplikoni järjestamine põhineb sellel, et polümeraasahelreaktsioonil paljundatakse

spetsiifiline DNA piirkond ehk markergeeni amplikon, mille nukleotiidne järjestus määratakse seejärel sekveneerimise abil. Üks sagedamini analüüsitud markergeene soolestiku mikroobipopulatsiooni kaardistamisel on bakterites kõrgelt konserveerunud ribosoomi 16S alaiühiku ribosomaalne RNA (16S rRNA). 16S rRNA geenis on kokku üheksa hüpervariaabel- ehk väga suure muutlikkusega piirkonda, mille järjestuste analüüs võimaldab tuvastada erinevaid bakterite perekondi või kõrgemaid taksonid. Kõige paremini sobivate piirkondade osas puudub kindel üksmeel ning piirkondade valik sõltub ka sellest, milliseid proove analüüsitakse. Soole mikroobioomi puhul on enim kasutatud V3 või V3-V5 hüpervariaabelpiirkondade analüüsi (Claesson jt, 2010; Song jt, 2018). Kõige paremat taksonoomilist mitmekesisust on aga näidanud V3-V4 piirkondade paljundamine, sest sekveneeritakse 16S rRNA geeni pikem osa (Drengenes jt, 2021). Sekveneeritud 16S rRNA-d kodeerivad DNA lugemid jaotatakse seejärel järjestuse sarnasuse alusel (100%) gruppidesse, mida nimetatakse operatsioonilisteks taksonoomilisteks ühikuteks (OTU). OTU-de võrdlemisel andmebaasidesse kantud järjestustega tuvastatakse lõpuks proovides esinevad bakteriperekonnad ja teised kõrgemad taksonid (Cao jt, 2017). Uuema Illumina-põhise tehnoloogia järgi saadakse geenijärjestuste paljundamisel andmed, mis eristavad amplikonjärjestuse variante (ASV). Kui OTU-d on sarnasuse alusel kokku pandud lugemite grupid, on amplikonjärjestuste variandid otse PCR tulemusena paljundatud geenijärjestuste kogumid (Cao jt, 2017). Amplikonjärjestuse varianditel on OTU-de suhtes mitmeid eeliseid. Esiteks on erinevate andmehulkade ASV-d omavahel võrreldavad, kuna ei ole määratletud kindlate järjestuslugemite põhjal nagu *de novo* OTU-d. Samuti ei piira amplikonjärjestuste variantide taaskasutamist tulevastes uuringutes mittetäielikud ja puuduva informatsiooniga andmebaasid (Callahan jt, 2017).

Teine soolestiku mikroobioomi analüüsimeetod on metagenoomi järjestamine, mille puhul sekveneeritakse *shotgun*-meetodil kõik proovidest eraldatud DNA järjestused (Davidson ja Epperson, 2018). Kuna 16S rRNA geenijärjestuste määramine võimaldab tihti tuvastada taksonid ainult perekonna täpsusega, saab markergeeni analüüsi tulemusena öelda bakterite koosseisu ja nende suhtelise esinemissageduse. Samas võimaldab metagenoomi analüüs määrata liigilist koosseisu täpsemalt (liigi ja tüve tasandil) ning lisaks hinnata ka mikroobikoosluse funktsionaalset profiili. Võrreldes varasemate, mikroorganismide kasvatamisel ja vaatlemisel põhinevate analüüsimeetoditega on tänapäevased sekveneerimisprotsessid suurema läbilaskevõimega, kiiremad ning kajastavad paremini soolestiku mikroobioomi koosseisulist mitmekesisust, mis annab kokkuvõttes parema ülevaate sisalduvate bakteritaksonite kohta (Bertelli ja Greub, 2013).

1.4. Jämesoolevähk

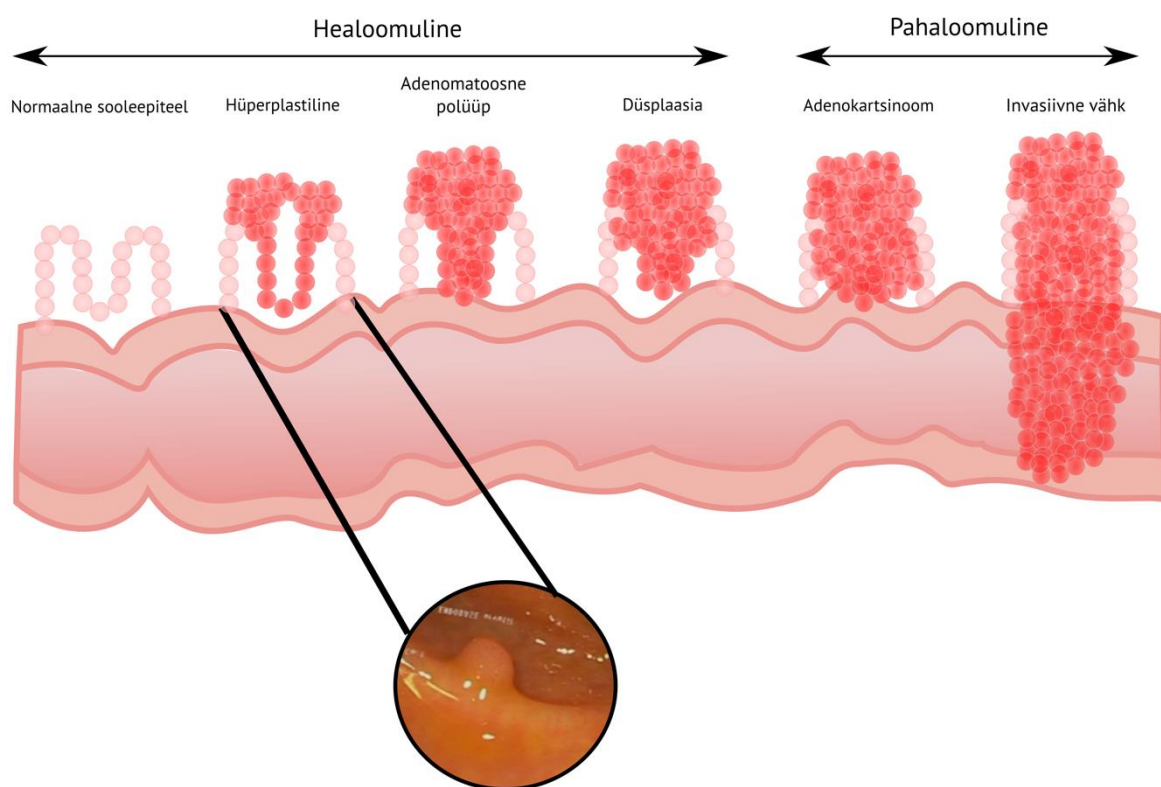
Jämesoolevähk ehk kolorektaalvähk (ingl k CRC, *colorectal cancer*, ICD-10 diagnoosikoodid C18, C19, C20 ja C21) on üks mitmetest soolestikku hõlmavatest komplekshaigustest. Jämesoolevähk on üldnimetus vähivormile, mis tekib jämesoole seina epiteelkihis (Kalda jt, 2017). Täpsemalt võib vähk välja areneda jämesoole käär- või pärasooles ning sellisel juhul võib kasvajat nimetada ka käär- või pärasoolevähiks. (Mesila jt, 2012).

Maailmas kõige sagedamini esinevate vähivormide hulgas on jämesoolevähk neljandal kohal ning igal aastal sureb jämesoolevähki ligikaudu 900 000 inimest. Rahvusvahelise vähiuurimise keskuse (IARC) 2020. aasta andmete järgi oli jämesoolevähk üks kümnest tuvastatud vähijuhtumist. Jämesoolevähi surmajuhtumite osakaal oli aga kõikide vähisurmade seas 9,4% (Sung jt, 2020). Viimase 25 aasta andmetel on samuti suurenenud haigestumus nooremate, alla 50-aastaste hulgas (Vuik jt, 2019). Eestis diagnoositakse iga aasta ligikaudu 800 kuni 1000 uut jämesoolevähi juhtumit ning aastate jooksul on uute juhtumite arv püsivalt suurenenud. 2014.-2018. aasta vahel diagnoositi enim vähke 75- kuni 79-aastaste seas. (Tervise Arengu Insituut, 2020).

Jämesoolevähi riskifaktorite hulka kuuluvad põhiliselt inimorganismi mõjutavad elustiili- ja keskkonnategurid, kuigi teatud juhtudel põhjustavad jämesooles kasvaja väljakujunemist ka geneetilised tegurid (Dekker jt, 2019). Pärilikud ja geneetilise eelsoodumusega jämesoolevähi vormide alla kuuluvad sellised haigused nagu perekondlik adenomatoosne polüpoos (ingl k *familial adenomatous polyposis*, FAP), pärilik mittepolüpoosne jämesoolevähk ehk Lynchi sündroom ning teised harvem esinevad haigused (Rustgi, 2007). Kõikidest jämesoolevähi juhtumitest on pärilikud 10-20% (Schoen jt, 2015).

Valdav osa jämesoolevähi juhtumitest on seotud mitmesuguste haiguste ning elustiili- ja keskkonnateguritega, mille hulka kuuluvad näiteks suitsetamine, üleliigne alkoholi tarbimine, suurenenud kehakaal ja kehamassiindeks ning töödeldud ja punase liha suur osakaal üldises toitumises (Dekker jt, 2019). Samuti on kõrgendatud jämesoolevähi riskiga isikud, kes põevad põletikulist soolehaigust (IBD), sealhulgas Crohni tõbe (Chen jt, 2017). Haigestumise riski vähendab aga arvestataval määral kiudainete söömine ning söödava toidu vähene rasvasisaldus (Ocvirk jt, 2019). Vähi väljakujunemise riski langetavad teatud määral ka ravimid, näiteks mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (NSAID, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), vere kolesteroolitaset langetavad statiinid, kaltsiumpreparaadid ning östrogeenid (Kalda jt, 2017).

Erinevalt teistest sooleteede osadest, näiteks peensoolest, on jämesool tundlikum vähkkasvaja tekkimise suhtes. Tervete jämesoole epiteelirakkude muutumist kontrollimatult jagunevateks kasvajarakkudeks mõjutavad mitmesuguste geneetiliste ja epigeneetiliste muutuste kogunemine proto-onkogeenides, tuumorsupressorgeenides või DNA reparatsiooni ehk nukleotiidses järjestustes parandamisega seotud olulistest geenides (Saus jt, 2019). Selliste protsesside tagajärjel väheneb genoomne ja epigenoomne stabiilsus, mis veelgi rohkem kiirendab mutatsioonide ja epigeneetiliste muutuste kuhjumist onkogeenides ja tuumorsupressorgeenides (Kuipers jt, 2015). Jämesoolevähi arenguprotsessi käivitavaks rakuks peetakse tüviraku või tüviraku sarnast rakku, mis asetseb käärsoole krüptide vahel põhjas (Zeki jt, 2011).



Joonis 1. Jämesoolevähi arengustaadiumid ja vähiseisundile eelnevad muutused alates normaalsest sooleepiteelist kuni invasiivse vähini

Kasvaja teke ja areng jämesooles on mitmeetapiline ja keerukas protsess, mis algab tavaliselt healoomuliste vähivormide ehk adenoomide moodustumisega soolelimakesta (Joonis 1). Healoomulised adenoomid kujutavad endast kindlaid koe väljakasve ehk polüüpe (Cappell, 2008). Kõikidest polüüpidest võib jämesoolevähiks areneda umbes 10 protsenti (Kuipers jt, 2017). Need varajase staadiumi polüübid võivad anda mitmekordsete kontrollimatute rakujagunemiste tulemusena hilisemates staadiumites pahaloomulisi kasvajaid ehk

kartsinoome. Kartsinoomide epiteelrakkude genoomides on kuhjunud hulgaliselt vähi teket soodustavaid muutusi (Brown, 2007). Sellisel viisil arenevate jämesoolevähi juhtumite osakaal on keskmiselt 70-90% kõikide juhtumite seas (Dekker jt, 2019).

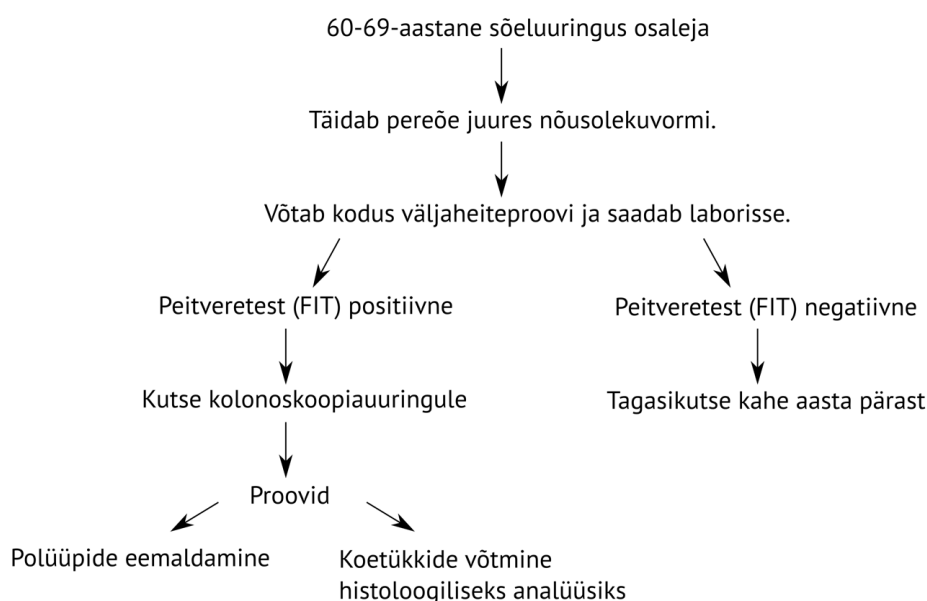
Jämesoolevähi sümptomeid on raske tuvastada varajastes healoomulise kasvajaga staadiumites. Hilisemates vähistaadiumites avalduvate haigustunnuste hulka kuuluvad aga valu alakõhus, sagedasem või harvem roojamine, vere esinemine väljaheidetes ning üldine nõrkustunne. Sümptomite iseloom sõltub samuti kasvajakogumi asukohast jämesooles ja selle suurusest. Raskemad sümptomid võivad esineda metastaaside puhul, kui vähikogumid on vereringe vahendusel üle organismi laiali kandunud (Cappell, 2008).

Jämesoolevähi ravimeetodeid rakendatakse nii vähieelse seisundi ehk adenoomide ja polüüptide kui varaste ja hiliste jämesoolevähi staadiumite puhul. Vähieelsete polüüptide ja teiste ebatavaliste moodustiste korralik eemaldamine endoskoopilistel uuringutel võimaldab peatada nende polüüptide arenemise jämesoolevähiks. Kirurgilistest operatsioonidest viiakse jämesoolevähi puhul läbi kõige sagedamini laparoskoopiat, teiste võimalike meetoditena kasutatakse kiiritusravi ja kemoradioterapiaid ning erinevaid süsteemseid ravimeid (Dekker jt, 2019).

1.5. Jämesoolevähi sõeluuring

Jämesoolevähi sõeluuring on maailma erinevates riikides käivitatud programm, mille eesmärk on tuvastada kasvajat varajastes staadiumites. Jämesoolevähi sõeluuringuprogrammil on oluline mõju jämesoolevähki põdevate inimeste elukvaliteedile ja elatud aastatele (Schreuders jt, 2015). Samuti on need programmid vähendanud jämesoolevähi esinemissagedust, suremust ja opereerimise vajadust (Kaminski jt, 2020). Jämesoolevähi sõeluuring on paljudes Euroopa riikides ja mujal maailmas kasutusele võetud mitmel põhjusel, arvestades vastava vähivormi aeglast ja varjatud olemusega tekkeprotsessi. Mitme kontrolluuringu tulemusena on leitud, et korrapärase jälgimisprogrammis osalevate isikute suremus võib väheneda kuni 60 protsenti ja viie aasta elulemus võib suureneda 73 protsendini (Maida jt, 2017). Samuti on võimalik sõeluuringuprogrammi läbiviimise tulemusena vähendada jämesoolevähist põhjustatud suremust 13-33 protsenti, samas ei mõjuta aga sõeluuring ise üldsuresust (Männik jt, 2014).

Eestis tehakse sõeluuringuid aastast 2016. Uuringusse kutsutakse vabatahtlikkuse alusel 60-69-aastased ravikindlustatud mehed ja naised iga kahe aasta tagant (Kalda jt, 2017). Vastav vanuserühm pakuti välja 2014. aastal läbi viidud jämesoolevähi kulutõhususe raportis, sest selles vanuserühmas on jämesoolevähi esinemissagedus suur ning varajase sekkumise korral on veel võimalik tagada kvaliteetsed eluaastad (Kalda jt, 2017; Männik jt, 2014). Euroopa Liidu teistes liikmesriikides on aga sõeluuringu programmi kaasatud laiem vanuserühm ehk 50-74-aastased inimesed (Atkin jt, 2012). Ameerika Vähiliidu juhiste järgi soovitatakse keskmise vähki haigestumise riskiga inimesi jälgima hakata juba alates 45. eluaastast (Ameerika Vähiliit, 2020; Senore jt, 2019). Eesti sõeluuringuprogrammis saab uuritav kõigepealt kutse osaleda riiklikus sõeluuringus ning pärast kirjaliku nõusoleku andmist antakse talle pereõe poolt kaasa komplekt peitveretesti (FIT) võtmiseks väljaheiteproovist (Joonis 2). Uuritav saadab seejärel proovi laborisse analüüsimiseks ning positiivse proovi tulemuse korral saadakse kutse edasisele koloskoopiauuringule (Kalda jt, 2017).



Joonis 2. Eesti riikliku jämesoolevähi sõeluuringuprogrammi logistilised etapid. FIT (ingl k *fecal immunochemical test*) - immuunmeetodil põhinev peitveretest

1.6. Soolestiku mikrobioomi seos jämesoolevähi tekkega

Jämesoolevähi teke saab üldjuhul alguse erinevate geneetiliste, immunoloogiliste ning mikroorganismidega seotud tegurite koosmõjul, mistõttu võivad vähi arengu käivitada keerukad etioloogilised mehhanismid (Wong ja Yu, 2019). Soolestiku mikrobioota võib põhjustada jämesooles põletikureaktsioone ja soole epiteelrakkude DNA kahjustusi ning isegi apoptoosi (Louis jt, 2014). Jämesoolevähi tekkimise puhul on kirjeldatud mikrobioomi koosluse muutusi, mille puhul võib väheneda või suureneda erinevate mikroorganismide osakaal. Siiski ei ole jämesoolevähiga patsientidel tuvastatud mikrobiotas ülekaalus olevate bakterite hulka kuuluvat liiki, mis esineks alati kõikidel patsientidel. Seetõttu tuleb kasvaja tekkeprotsessis arvestada pigem erinevaid mikroorganismide kooslusi, nende omavahelist koosmõju ning toodetud metaboliitide rolli (Louis jt, 2014; Saus jt, 2019).

Jämesoolevähi puhul on tuvastatud mikrobioomi taksonoomilises koosseisus olulisi muutusi juba healoomuliste adenoomide staadiumis, kuid rohkem on siiski selliseid protsesse uuritud vähipatsientidel. Enamasti on suurenenud selliste bakteriperekondade ja -seltside osakaal, mis oma elutegevuse ja ainevahetuse tulemusena eritavad soolestikku mitmesuguseid põletiku ja vähi teket soodustavaid ühendeid (Chen jt, 2017). Tabelis 1 on välja toodud erinevate mikrobioomi uuringute tulemused parimate bakteriaalsete biomarkerite näol. Kõige rohkem kuuluvad erinevates töödes korduvate bakteriperekondade hulka *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Parvimonas*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Clostridium* ja *Prevotella*.

Tabel 1. Erinevate jämesoolevähi mikrobioomi uuringute tulemusena leitud bakteriaalsed biomarkerid

Väljaheiteproovid					
16S rRNA	116 (n = 56, n = 60)	Itaalia	Kõrge riskiga adenoom Kartsinoom Hüperplastilised polüübid	<i>Erysipelotrichaceae</i> <i>Sutterella, Escherichia/Shigella</i> <i>Erysipelotrichaceae</i>	Mori jt, 2018
16S rRNA	292 (n = 120, n = 172)	USA, Kanada	Adenokartsinoom	<i>Porphyromonas assaccharolytica, P. stomatis, P. micra, F. nucleatum</i>	Baxter jt, 2016
16S rRNA	198 (n = 86, n = 112)	Iirimaa	Rektaalne ja distaalne vähk Proksimaalne vähk	<i>Alistipes, Akkermansia, Halomonas, Shewanella</i> <i>Faecalibacterium, Blautia, Clostridium</i>	Flemer jt, 2017
16S rRNA	120 (n = 60, n = 60)	USA, Kanada	Adenokartsinoom Adenoom	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Lachnospiraceae, Enterobacteriaceae</i> <i>Ruminococcaceae, Clostridium, Pseudomonas, Porphyromonadaceae; Bacteroides, Lachnospiraceae, Clostridiales</i>	Zackular jt, 2014
16S rRNA	625 (n = 367, n = 258)	Hiina	CRC	<i>Fusobacterium nucleatum, Faecalibacterium prausnitzii, Bifidobacterium</i>	Guo jt, 2018
16S rRNA	102 (n = 46, n = 56)	Hiina	CRC	<i>Bacteroides fragilis, Porphyromonas, Escherichia/Shigella, Enterococcus, Streptococcus, Peptostreptococcus</i>	Wang jt, 2012
Metagenoom	1232 (n = 730, n = 502)	Jaapan	CRC Adenoom	<i>Fusobacterium nucleatum, Solobacterium moorei</i> <i>Atopobium parvulum, Actinomyces odontolyticus, Desulfovibrio longreachensis, Phascolarctobacterium succinatutens</i>	Yachida jt, 2019
Metagenoom	168 (n = 90, n = 78)	Hiina, Taani	Kartsinoom	<i>F. nucleatum, Peptostreptococcus stomatis, Parvimonas micra, S.moorei.</i>	Yu jt, 2017
Metagenoom	114 (n = 53, n = 61)	Prantsusmaa	CRC	<i>Fusobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes</i>	Zeller jt, 2014
Metagenoomiülene assotsiatsiooniuuring	96 (n = 41, n = 55)	Austria	Kartsinoom	<i>B. massiliensis, Bacteroides ovatus, Bacteroides vulgatus, Escherichia coli P. micra, Parvimonas spp., fadA+ F. nucleatum, pks+ E. coli, Gemella morbillorum, P. stomatis, Porphyromonas, Porphyromonas uenonis, Porphyromonas somerae, Porphyromonas asaccharolytica, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Clostridium symbiosum, Clostridium boltae/clostridioforme, Dialister, S. moorei, Hungatella hathewayi, Ruminococcus torques, Anaerococcus obesiensis/vaginalis, Anaerotruncus, Subdoligranulum.</i>	Feng jt, 2015
Metagenoom	778 (n = 386, n = 392)	Austria, Hiina, Jaapan, Saksamaa, USA	Kartsinoom	<i>pks+ E. coli, fadA+ F. nucleatum</i>	Wirbel jt, 2019
Metagenoom	826 (n = 413, n = 413)	Itaalia	Kartsinoom	<i>pks+ E. coli, fadA+ F. nucleatum</i>	Thomas jt, 2019
qPCR	105 (n = 39, n = 66)	Rootsi	CRC	<i>F. nucleatum, Parvimonas micra, Escherichia coli pks+</i>	Eklöf jt, 2017
qPCR	439 (n = 203, n = 236)	Hiina	Kartsinoom	<i>F. nucleatum, Roseburia clarus, Roseburia intestinalis, Clostridium hathewayi</i>	Liang jt, 2017
qPCR	322 (n = 127, n = 195)	Hiina	CRC, edasijõudnud adenoomid	<i>Fusobacterium nucleatum, Parvimonas micra, Peptostreptococcus anaerobius</i>	Wong jt, 2017
qPCR	569 (n = 327, n = 242)	Hiina	CRC	<i>Clostridium symbiosum, F. nucleatum</i>	Xie jt, 2017
Digitaalne PCR	119 (n = 109, n = 10)	Jaapan	Jämesoole neoplaasia	<i>F. nucleatum</i>	Suehiro jt, 2018

Lühendid: qPCR - kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon, CRC - jämesoolevähk (ingl *colorectal cancer*)

Tabel 1 jätkub järgmisel leheküljel.

Proovi tüüp	Analüüsi meetod	Valim (patsiendid + kontrollid)	Populatsioon	Staadium	Parimad bakterinäitajad	Viide
Koeproovid	16S rRNA	221 (n = 99, n = 122)	Hiina	Adenoom Adenokartsinoom	<i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> <i>Fusobacterium</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Gemella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Granulicatella</i>	Nakatsu jt, 2015
	16S rRNA	171 (n = 59, n = 112)	Irimaa	Adenoom (polüübid) Adenokartsinoom	<i>Coprococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i> <i>Fusobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Parvimonas</i>	Flemer jt, 2017
	16S rRNA	48 (n = 48, n = 0)	Saksamaa	CRC	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Zeller jt, 2014
	16S rRNA	61 (n = 30, n = 31)	Hiina	CRC	<i>Firmicutes</i> ; <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Streptococcus</i>	Gao jt, 2015
	16S rRNA	84 (n = 25, n = 59)	USA, Malasia	CRC	<i>Fusobacteria</i> ; <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Comamonas</i> ; <i>Burkholderiales</i> , <i>Ruminococcaceae</i>	Dejea jt, 2014
	16S rRNA, qPCR	34 (n = 34, n = 0)	Uus-Meremaa	CRC	<i>Fusobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> ; <i>F. hwasokii</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Selemonas ssp.</i> , <i>Prevotella ssp.</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Parvimonas</i> <i>micra</i> , <i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Purcell jt, 2017
	16S rRNA	83 (n = 83, n = 0)	USA	CRC	<i>Dorea longicatena</i> , <i>Coprococcus comes</i> , <i>Bacteroides massiliensis</i> , <i>Fusobacterium ssp.</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>	Hale jt, 2018
	16S rRNA	16 (n = 26, n = 0)	Lõuna-Korea	Tubulaarsed adenoomid, sessiilsed sakilised adenoomid/polüübid CRC	<i>Fusobacteria</i>	Park jt, 2016
	16S rRNA	126 (n = 126, n = 0)	Hiina	Proksimaalsed hüperplastilised polüübid, sessiilsed sakilised adenoomid Proksimaalne vähk	<i>F. nucleatum</i>	Yu jt, 2016
	Täiseksoomi sekveneerimine	88 (n = 44, n = 44)	USA	Adenokartsinoom	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Cyclobacteriaceae</i>	Burns jt, 2018
	Sihtmärk- pürosekveneerimine	976 (n = 976, n = 0)	Jaapan	Adenoomid, sakilised kolded CRC	<i>F. nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i>	Ito jt, 2015

2012. aastal läbi viidud uuringus selgus, et jämesoole vähkkoe mikroobne mitmekesisus oli märkimisväärselt madalam kui terve koe puhul, kuid samas on ka leitud, et võrreldes terve epiteelkoega võib olla vähkkoe mikroobne mitmekesisus suurem (Chen jt, 2012; Nakatsu jt, 2015; Shen jt, 2010). Chen ja tema kaastöötajate uuringus oli vähenenud kuue olulisema bakteriperekonna, -sugukonna ja -liigi arvukus, mille hulka kuulusid perekonnad *Faecalibacterium* ja *Dorea*, sugukonnad *Lachnospiraceae* ja *Peptostreptococcaceae* ning bakteriliik *Ruminococcus gnavus*. Uuringu tulemused kinnitasid samuti, et jämesoolevähi esinemisega on negatiivses korrelatsioonis perekonna *Faecalibacterium* arvukus (Chen jt, 2012).

Jämesoolevähi erinevates arenguetappides on võimalik eristada teatud bakteritaksonite osakaalu suurenemist või vähenemist. Shinichi Yachida uurimisrühm leidis 2019. aastal, et alates vähitekke varajastest staadiumites kuni hiliste staadiumiteni välja suurenes selliste bakteriliikide arvukus nagu *Fusobacterium nucleatum* ja *Solobacterium moorei*. Selle töö tulemusena leiti ka vähistaadiumite spetsiifilised bakteriaalsed mustrid. Need eelnevalt välja toodud kaks liiki kuuluvad samuti Wirbeli 2019. aasta uuringus esile tulnud perekondade hulka, mille osakaal oli suurem juba healoomulise jämesoolekasvaja puhul (Wirbel jt, 2019; Yachida jt, 2019).

Lisaks kindlate bakteritaksonite osakaalu muutustele on viimasel ajal üha rohkem kirjeldatud, millist rolli võiksid mängida teatud liigid või perekonnad jämesoolevähi erinevates tekkemehhanismides (Saus jt, 2019). Erinevad mehhanismid saab üldiselt jaotada põletikulisteks ja immuunregulatsiooniga seotud protsessideks, toiduga seotud metaboolseteks protsessideks ning teatud soolestiku mikroobide poolt genotoksiinide tootmiseks (Wong ja Yu, 2019).

Põletikureaktsioonide ja immuunregulatsiooniga seotud mehhanismide puhul on kindlaks määratud mitmed soolestiku ja suu mikrobiota tavalised bakteriliigid. Paljud neist mõjutavad olulisel määral jämesoolevähi tekkeprotsesse ning soolestiku immuunrakkude talitlust, aktiveerides näiteks erinevaid signaaliradu. Signaaliradade käivitumise tulemusena võib jämesoolde koguneda veel rohkem erinevaid immuunrakke, mis tungivad kasvajakogumi sisse. Kõikide nende reaktsioonide tulemusena tekib põletiku teket soodustav keskkond, milles võivad hakata arenema jäme- ja käärsoole kasvajamoodustised ehk neoplasmid (Brennan ja Garrett, 2019; Kostic jt, 2012). Samuti on märkimisväärne põletikuvastane toime mikroobidepoolse ainevahetuse käigus tekkinud lühikese ahelaga rasvhapetel (SCFA). Üks selline ühend on butüraat (võihape), mille toime väheneb jämesoole epiteel- ja immuunrakkudes ensüümi histooni deatsetsülaasi aktiivsus. Selle ensüümi inhibeerimise tulemusena väheneb neis kaht tüüpi rakkudes põletikuliste tsütokiinide IL-6 ja IL-12 geeniekspressioon. Samasuguse toimega on ka lühikese ahelaga rasvhape propionaat, kuid mitte atsetaat (Louis jt, 2014). Hiirtel on leitud, et propionaat reguleerib samuti käärsoole reguleerivaid T-rakke, käivitades selliste regulaatorrakkude jagunemist, mis ekspresseerivad transkriptsioonifaktorit FOXP3. FOXP3 ekspresseerivad regulaatorsed T-rakud on olulised soolestiku põletikureaktsioonide mahasurumisel (Smith jt, 2013).

Kui lühikese ahelaga rasvhapete toime on jämesoole keskkonnas peamiselt põletikuvastane, mis pidurdab kasvaja teket, siis leidub lisaks neile teisi metaboolseid ühendeid, mis soodustavad kasvaja moodustumist (Louis jt, 2014). Sellised ühendid on näiteks sekundaarsed sapphapped. Need sapphapped ei imendu enterohepaatilises ringluses tagasi peensoolde ning satuvad seetõttu jämesoolde (Ridlon jt, 2006). Jämesoolde sattumisel metaboliseeritakse need mikroorganismide poolt sekundaarsele kujule (Wong ja Yu, 2014). Sekundaarsed sapphapped, millest üks rohkem uuritud on deoksükoolhape, võivad jämesooles häirida epiteelirakkude plasmamembraani terviklikkust ning seeläbi tekitada reaktiivseid hapniku- ning lämmastikuühendeid (ROS ja RNS). Need ühendid põhjustavad omakorda DNA kahjustusi ja soodustavad vähitekke protsessi käivitumist (Bernstein jt, 2009).

Lisaks sekundaarsetele sapphapetele võivad tekkida toidust pärinevate ühendite bakteriaalsel metaboliseerimisel teised kartsinogeense toimega ühendid, näiteks erinevate aminohapete ja väävlühendite käärutamisel saadavad nitrogeensed N-nitrosoühendid ning vesiniksulfiid (Wong ja Yu, 2019). Mõned N-nitrosoühendid soodustavad mutatsioonirohke mõjuga DNA alküülimist ning selle abil ka kasvaja moodustumist jämesooles. Sulfaatidest tekkivad vesiniksulfiidid on genotoksilise ehk DNA-d kahjustava toimega, mistõttu on need mürgised käärsoole epiteelrakkudele ning takistavad lühikese ahelaga rasvhappe butüraadi oksüdatsiooni. Selliste protsesside tulemusena laguneb ka käärsoole epiteelrakke kaitsev limaskestast barjäär (Louis jt, 2014; Roediger jt, 1997). Kaks sellist tugevalt genotoksilist ühendit on tsütoletaalsed väljaulatuvad toksiinid (CDT) ja kolibaktiin. Genotoksiini CDT toodavad bakteriperekonnad nagu *Escherichia* ja *Campylobacter* ning kolibaktiini sünteesivad soolestiku mikrobiotas paikneva sugukonna *Enterobacteriaceae* liigid. Mõlemat tüüpi ühendid soodustavad jämesoolerakkudes DNA kaksikahealalisi katkeid. Bakter *Bacteroides fragilis* sünteesib omakorda toksine ning *Enterococcus faecalis* teatud reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS), mis on samuti seotud DNA kahjustuste ja genoomse ebastabiilsusega (Wong ja Yu, 2019).

Jämesoolevähi arenguprotsessis on *Fusobacterium nucleatum* üks enamleitunud mikroorganisme. Sellel bakteril on mitmekülgne roll, näiteks käivitab see mikroorganism tuumse signaalimolekuli NFκB signalisatsiooniraja ja on vastastikmõjus immuunrakkudega, mistõttu on nende talitus või rakujagunemine maha surutud (Goradel jt, 2019). Arvestades asjaolu, et *Fusobacterium nucleatum* pärineb üldjuhul suuõõnest, peab see bakter esmalt kasvaja tekke ja arengu mõjutamiseks liikuma käär- ja pärasoolekudedesse, mis on juba düsplaasilised ehk kus on toimunud ebaharilikud vähieelsed kasvu- või jagunemise protsessid (Brennan ja Garrett, 2019). Sellest hoolimata ei saa veel jämesoolevähi puhul selgelt öelda, kas *Fusobacterium nucleatum*'i talituslik omapära on vähkkasvaja põhjustaja või tagajärg (Goradel jt, 2019). Üldjuhul võib olla seotud selle bakteri suurem arvukus pahaloomulises kasvajakoes ehk kartsinoomis halvema väljavaatega vähist taastuda ning suurema tõenäosusega kasvaja taastekkeks (Mima jt, 2016). See asjaolu on seotud ka *F. nucleatum*'i tekitatud kemoresistentsusega kasvajat sisaldavas jämesoolekoes, mille puhul on tema sihtmärkideks kaasasündinud immuunsuse signaalirajad ning spetsiifilised mikro-RNA-d (Yu jt, 2017).

Lisaks teistele mehhanismidele on jämesoolevähi arenguprotsessides olulise tähtsusega ka *F. nucleatum*'i virulentsusfaktorid, millest kaks rohkem uuritud on kõrgelt konserveerunud adhesiinina toimiv valk FadA ning pinnavalk Fap2 (Goradel jt, 2019). FadA vahendab *F. nucleatum*'i kinnitumist jämesoole epiteeli- ja endoteelirakkudele ning sellele järgnevat sissetungi rakkudesse. Kaht tüüpi jämesoolerakkude pinnal seob *F. nucleatum*'i valk FadA teist

valku E-kaderiini, mis käivitab β -kateniini signaaliraja. Signaaliraja käivitumine suurendab erinevate põletikuvastustes oluliste signaalmolekulide ning onkogeenide tsükliin D1 ja Myc ekspressiooni (Rubinstein jt, 2013). Mõlemal onkogeenil on oluline tähtsus vähi tekkeprotsessis ja arengus (Goradel jt, 2019). Seetõttu on samuti leitud, et jämesoolevähi sisaldavates kudedes on β -kateniini kontsentratsioon suurem (Y. Chen jt, 2017).

Jämesooles arenevate vähirakkude puhul on veel suurel määral teadmata rakkude mikroobikoosluse üldpilt ja sinna kuuluvad liigid. Selle põhjus seisneb jämesoolevähi mikrobioomi analüüsi uuringute vähesusest ja katsete reprodutseerimise keerukusest, millest viimane tuleneb tihti uuritava kohordi eritaolisest mikrobiotast ja selle kooslusest (Debelius jt, 2016). Samuti on veel vähe uuritud healoomuliste jämesooleepiteeli väljakasvude ehk polüüpide mikrobiootat ja mikroobikooslusi.

Lisaks olemasolevale peitveretestile (FIT) võib seega olla üks parimaid biomarkereid jämesoolevähi tuvastamiseks ka soolestiku mikrobioomi analüüs (Clegg jt, 2018). Juba healoomuliste sooleepiteeli väljakasvude ehk polüüpide puhul on tuvastatud arvestatavaid erinevusi soole mikroobikoosluses, mis võimaldab paremini jälgida toimuvad arenguprotsesse ja ennetada pahaloomalise kasvaja teket (Mori ja Pasca, 2021). Nende mikroobsete mustrite tuvastamine ka healoomuliste polüüpide puhul võib anda olulist teavet jämesoolevähi varajaseks diagnoosimiseks.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eksperimentaalse osa eesmärk on analüüsida Eesti jämesoolevähi sõeluuringu raames koloskoopia analüüsil kogutud jämesoole koeproovidest mikrobioomi koosseisu.

Sellest tulenevalt olid töö eesmärgid järgmised:

1. Määrata uuritavate jämesoolest võetud biopsiaproovidest mikroobide kooslus kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist;
2. Võrrelda polüüpe sisaldavate ja tervest soole epiteelkoest võetud koeproovide mikrobikoosluste erinevusi.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Proovide kogumine ja hoiustamine

Töö jaoks vajalikud proovid koguti november 2019 kuni jaanuar 2021 Eesti Haigekassa poolt läbi viidud riikliku jämesoolevähi sõeluuringu käigus. Uuringu valimi moodustasid 60-69-aastased uuritavad, kellel oli sõeluuringu käigus tehtud peitveretesti tulemus positiivne ning kes suunati TÜ Kliinikumi koloskoopia analüüsi.

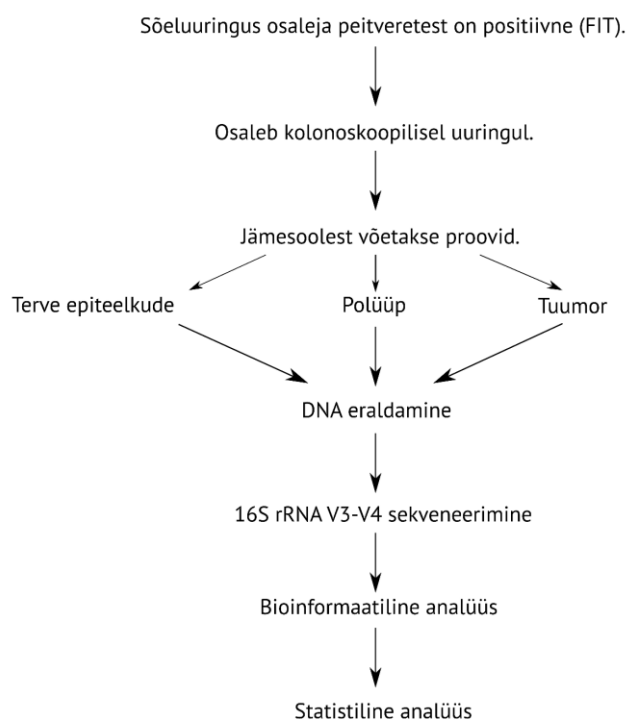
Uuritavad sobisid valimisse, kui neil ei esinenud järgmisi kriteeriumeid:

1. Uuritaval on diagnoositud põletikuline soolehaigus (IBD), Crohni tõbi (CD), haavandiline koliit (UC) või mikroskoopiline koliit;
2. Uuritaval on diagnoositud perekondlik adenomatoossne polüpoos (FAP);
3. Uuritav on varem läbinud kemoteraapia;
4. Uuritava viimasest antibiootikumide tarvitamisest on möödas vähem kui kolm nädalat.

Kokku õnnestus koguda uuringu parameetreid arvestades selles ajavahemikus 32 uuritavat, kellest 18 olid mehed (vanus 63,7 +/- 2,68; vahemik 60-68) ja 14 naised (vanus 63,7 +/- 4,27; vahemik 59-75). Uuritavad jaotati kahte rühma: 1) uuritavad, kellel avastati koloskoopia käigus jämesoole polüübid (N = 22) või vähkkasvajad (N = 1) ning 2) uuritavad, kellel koloskoopilisel uuringul polüüpe ega vähkkasvajaid ei leitud (kontrollgrupp, N = 9). Uuringule on antud

nõusolek TÜ inimuuringute eetikakomiteest (loa number 292/T-17) ning kõik uuringus osalejad on andnud oma kirjaliku nõusoleku.

Koloskoopilisel uuringul osalevalt uuritavalt eemaldati käär- ja pärasoolest kõik leitavad polüübid ning võeti biopsiaproovid sooleepiteelist. Uuringusse võeti polüübi- ja vähkproovid uuritavatele, kellel esines üle 1 cm suurused polüübid või vähk. Mikrobioomi uuringu jaoks võeti lisaks polüübi- ja vähkkasvajate biopsiaproovidele proovid terve sigmasoole limaskestast ca 20-40 cm kaugusel anaalavast. Uuritavatele, kellel polüübid puudusid või olid liiga väikesed (läbimõõt < 1 cm), võeti ainult terve limaskesta proovid. Kokku saadi 32 uuritavalt 39 proovi - 8 polüübi- ja vähkproovi, 30 terve epiteelkoe proovi ja 1 vähkproovi. Kuigi valimis oli kokku 22 polüübiga patsienti, siis 14 patsiendilt ei võetud polüübi- ja vähkproove, kuna polüübid olid liiga väikesed (alla 1 cm). Kahel polüübiga patsiendil unustati koloskoopia protseduuri käigus võtta terve epiteelkoe proovid. Kõik proovid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning asetati enne edasise analüüsi -80°C külmkappi. Polüübiga ja vähkkoele teostati histoloogiline analüüs TÜ Kliinikumi patoloogiaosakonnas. Töö meetoodika erinevad osad on välja toodud joonisel 3.



Joonis 3. Töö meetoodika etappide jaotus

2.2.2. DNA eraldamine ja sekveneerimine

Uuringus kogutud proovidest eraldati mikroobne ja sooleepiteeli rakkudest pärinev DNA kasutades Qiagen AllPrep DNA/RNA eraldamise komplekti (Qiagen, Venlo, Madalmaad). Esimese etapina enne DNA eraldamist lisati igasse tühja Eppendorfi tuubi 250 µl 0,1 mm läbimõõduga silikageelist klaaskerasid, et tagada tõhusam raputusprotsess bakteri- ja sooleepiteeli rakkude lõhkumiseks ning seeläbi eraldamise tulemusena kõrgem DNA kontsentratsioon. Klaaskeradega katsutid autoklaaviti. Proovidest võetud koetükk lisati steriilsete keradega katsutitele, millele oli eelnevalt lisatud 600 µl RLT-puhvrit koos 1% β-merkaptopetanoliga. Rakkude lõhkumiseks kasutati Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretinneux, Prantsusmaa) koepurustit, mis seadistati järgmiselt: 2500 rpm pöörded ja kestus 2 x 30 sekundit koos 30-sekundilise pausiga tsüklite vahel. Ülejäänud osa DNA eraldamisest viidi läbi tootjapoolse protokolliga järgi. Antud eraldamise komplektiga on võimalik korraga eraldada nii DNA kui RNA. Eraldamise lõpptulemusena saadud DNA ja RNA esialgset kontsentratsiooni mõõdeti koguses 1 µl spektrofotomeetriga NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). DNA-d sisaldavad katsutid säilitati -20°C juures. DNA kontsentratsioonid on välja toodud lisas olevas Tabel S1. RNA-ga seotud tulemusi antud bakalaureusetöös ei käsitleta.

Proovidest eraldatud genoomse DNA sekveneerimine viidi läbi TÜ genoomika instituudi tuumiklaboris. Sekveneerimisel kasutati praimereid 16S_F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG -3') ja 16S_R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 16S rRNA geeni V3-V4 piirkonna järjestuste paljundamiseks. Amplikonjärjestuste raamatukogu tegemiseks kasutati standardset protokollit. Koostatud raamatukogu mõlemasuunaliseks sekveneerimiseks (2 x 301 bp) kasutati Illumina teise põlvkonna (Illumina, San Diego, USA) MiSeq süsteemi koos MiSeq reagentide komplektiga (MiSeq Reagent Kit versioon 3). Kõik 39 proovi tehti koos (*multiplex*-režiimis), kasutades selleks spetsiaalseid ribakoodi järjestusi. Lisaks proovidele sekveneeriti positiivse kontrollina ka *mock*-bakterikooslus, mis koosneb kaheksast perekonnast (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* ja *Bacillus*) ning negatiivne kontrollproov ilma DNA-ta. Sekveneerimisel saadud toorandmete järjestused seostati kindlate proovidega, selleks kasutati Illumina bcl2fastq2 Conversion tarkvara (versioon 2.20).

2.2.3. Mikroobikoosluse määramine

Bioinformaatilised analüüsid viidi läbi programmiga QIIME2 (versioon 2019.7). Andmete sissetoomiseks QIIME2 programmi kasutati skripti q2-tools sisendvormingus PairedEndFastqManifestPhred33.

Mürarikaste lugemite eemaldamiseks ja parandamiseks kasutati QIIME2 keskkonnas DADA2 tarkvara. Selle etapi käigus toimus ka päris- ja vastassuunaliste lugemite ühendamine. DADA2 programm viib lugemite jaoks läbi kvaliteedikontrolli (QC), mille tulemusena saadud kvaliteediskooride põhjal saab lugemeid sobivalt kärpida. Pärisuunalisi lugemeid kärbiti 13. positsioonis ja 250. positsioonis ning vastassuunalisi lugemeid 2. positsioonis ja 230. positsioonis. Omavahel järjestuse poolest osaliselt ühinenud lugemid ehk kimäärlugemid eemaldati konsensusfiltriga, mis tuvastab proovides eraldi iga kimäärlugemit. Lugemite ühendamiseks amplikonjäärjärejastuste variantideks (ASV) kasutati programmi MAFFT. Lugemite taksonoomiliseks jaotamiseks käivitati QIIME2 programmi skript q2-feature-classifier koos eelnevalt välja õpetatud naiivse Bayes'i klassifitseerijaga. Bayes'i klassifitseerija töötas referentsjärjestuste järgi SILVA 16S V3-V4 v132_99 andmebaasidest 99% sarnasuslävendiga. Klassifitseerija töötas välja TÜ genoomika instituudi mikrobioomika töörühma doktorant Kreete Lüll.

2.2.4. Andmete analüüs

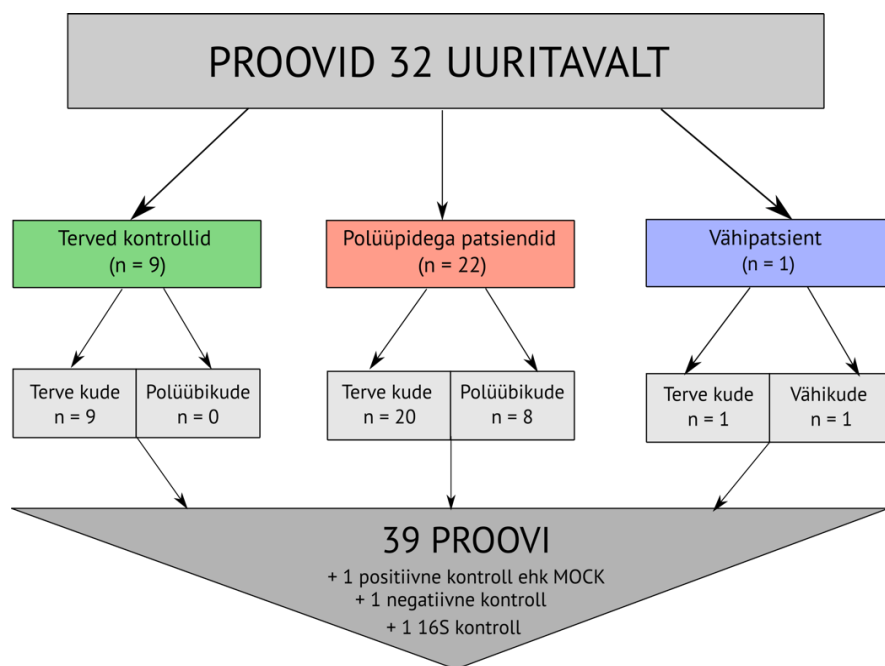
Analüüside läbiviimiseks kasutati programmi RStudio (versioon 1.3.1073) ning R baasprogrammi (versioon 4.0.5) koos pakettidega *phyloseq* (versioon 1.34.0), *dplyr* (versioon 1.0.5), *microbiome* (versioon 1.12.0), *vegan* (versioon 2.5-7), *ggsci* (versioon 2.9) ja *ggpubr* (versioon 0.4.0). Kõikide jooniste tegemiseks kasutati paketti *ggplot2* (versioon 3.3.3). Analüüsidesse kaasati kokku 39 proovi ning jäeti välja proovid koodidega CRC003_NORM ja CRC003_POLP, sest need proovid andnud uuritava diagnoositi lipoom ehk healoomuline rasvkoe kasvaja, mille tõttu ei ole need võrreldavad ülejäänud proovidega.

Koeproovide taksonoomilise mitmekesisuse kirjeldamiseks kasutati alfa- ja beetamitmekesisust. Alfamitmekesisus näitab proovisisest taksonoomilist mitmekesisust, beetamitmekesisus vaatleb proovidevahelisi erinevusi mikrobioomi kooslustes. Alfamitmekesisuse puhul arvutati välja kaks näitajat: Shannoni mitmekesisuse indeks ja vaadeldud perekondade arvukus. Shannoni mitmekesisuse indeksi ja vaadeldud perekondade arvukuse väärtuseid võrreldi jämesoole epiteelkoe puhul tervetel kontrollidel ja polüüpidega

patsientidel. Teise võrdlusena kasutati polüüpidega patsientide epiteelkude ja neilt võetud polüübikude. Mõlemad indeksid arvutati eraldi bakteriperekondade tasemel ning nende arvutamiseks kasutati RStudio ja R baasprogrammi paketti *phyloseq* (versioon 1.34.0). Polüüpidega patsientide proovide paarisvõrdluses esines 386 bakteriperekonda, mille esinemissagedus oli 10% kõikide perekondade seas. Erinevate gruppide vaheliste ja statistiliselt oluliste muutuste kindlaks tegemiseks kasutati t-testi. Beetamitmekesisuse visualiseerimiseks rakendati CLR-transformeeritud andmetele peakomponentanalüüsi (PCA, *principal component analysis*).

2.3. Tulemused

Uuringu käigus koguti 33-lt uuritavalt kokku 41 koeproovi. Kontrollgruppi kuuluvatelt uuritaval koguti ainult terve epiteelkoe proovid, polüüpidega patsientidelt koguti 21 terve epiteelkoega proovi ja 9 polüübikoe proovi ning ühelt vähipatsiendilt koguti üks terve koega proov ja üks vähikoega proov. Kogutud proovide analüüsist jäi välja ühe polüüpidega uuritava paariproovid (terve epiteelkoe ja polüübikoe proov), sest uuritaval diagnoositi lipoom ehk rasvkoehaiguse kasvaja. Analüüsitud proovide arvud on välja toodud joonisel 4. Keskmine DNA kontsentratsioon epiteelkoe proovides oli 56,4 ng/μl (+/- 33,16) ning polüübikoe proovides 68,6 ng/μl (+/- 29,21) (Lisa S2).

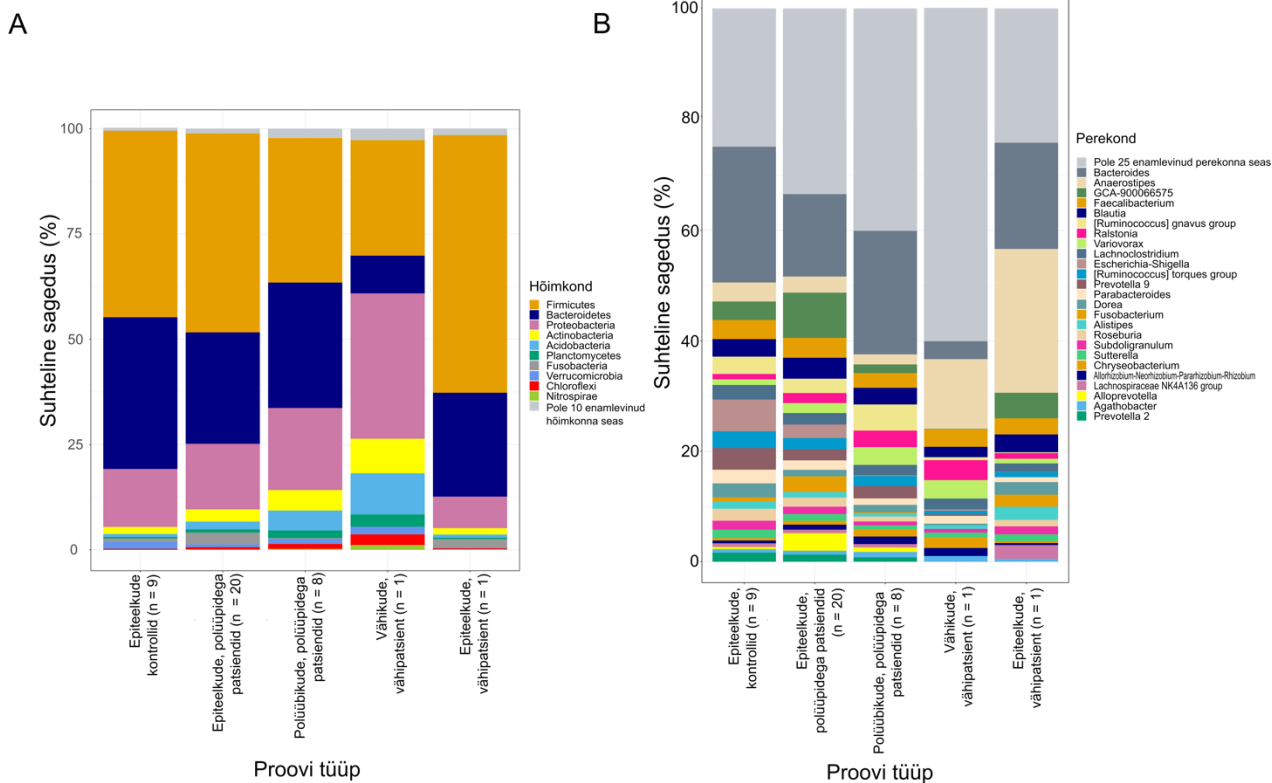


Joonis 4. Uuringu käigus analüüsitud koeproovid

Kõikide sekveneeritud proovide peale kokku (39 koeproovi, mock-proov, negatiivne kontroll 16S kontroll) saadi 4 271 276 DNA lugemit. Pärast negatiivse kontroll- ja *mock*-proovi välja filtreerimist oli saadud lugemite arv 4 087 340. Kõikide tervet epiteelkude sisaldavate proovide keskmine lugemite arv oli 23 451 ja polüübikoega proovide keskmine lugemite arv oli 19 704. Uuritavates proovides tuvastati kokku 43 hõimkonda, 117 klassi, 327 seltsi, 587 sugukonda ja 1076 perekonda. Bioinformaatilise analüüsi käigus tuvastati *mock*-proovist kõik seal esinema pidanud bakteriperekonnad (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* ja *Bacillus*) (Zymo Research, i.a)

2.3.1. Terve soole epiteelkoe mikrobikooslus

Kontrollgrupi terve epiteelkoe biopsiate mikrobikoosluse analüüsimisel tuli välja, et kolm kõige sagedasemat hõimkonda on *Firmicutes* (44,28%), *Bacteroidetes* (36,04%) ja *Proteobacteria* (13,78%) (Joonis 5A). Suurima suhtelise esinemissagedusega perekondade hulka kuuluvad terves epiteelkoos *Bacteroides* (24,59%), *Escherichia-Shigella* (5,76%), *Prevotella 9* (3,91%) ja *Faecalibacterium* (3,46%) ja *Anaerostipes* (3,42%) (Joonis 5B, Lisa S3).

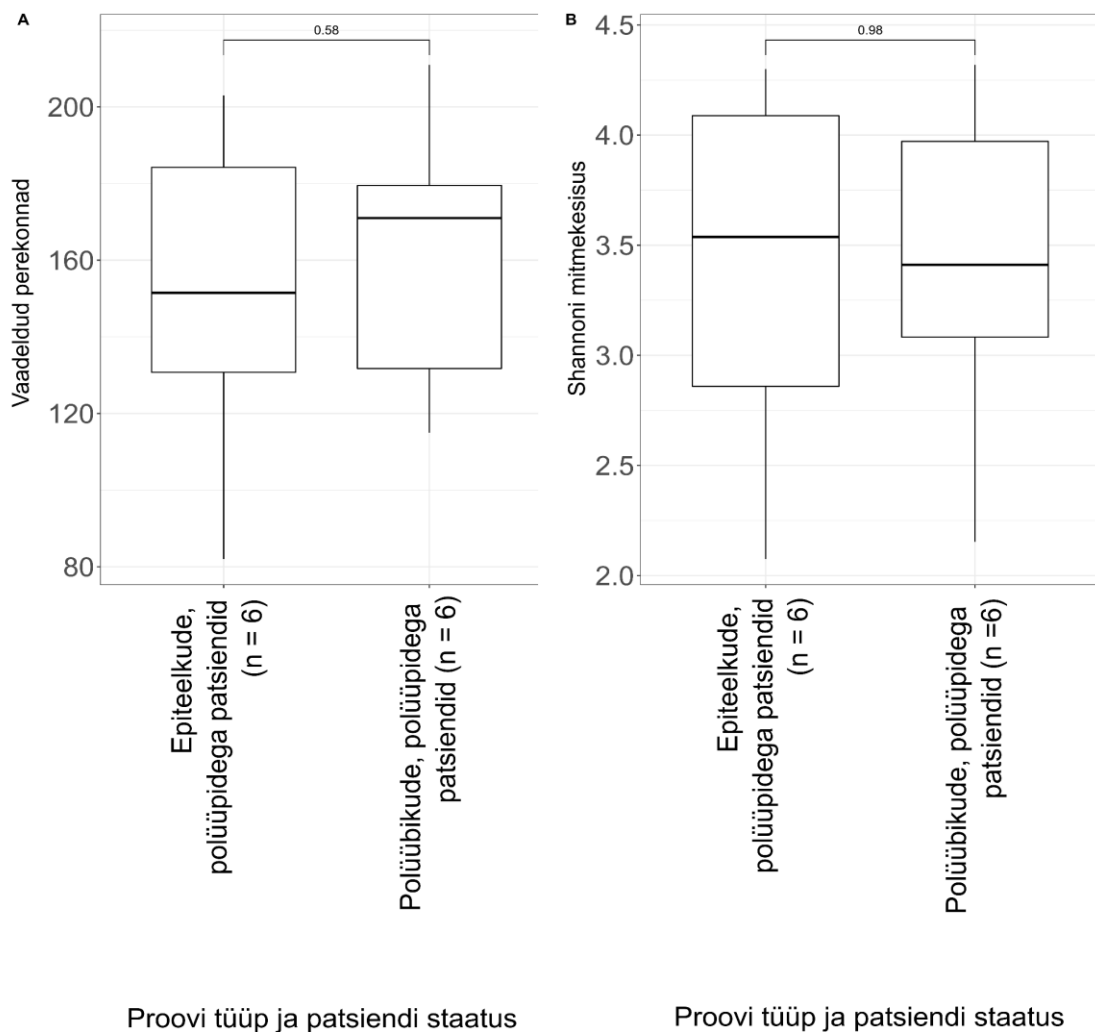


Joonis 5. Hõimkondade (A) ja perekondade (B) suhtelised sagedused erinevates koeproovide tüüpides (terve epiteelkude, polüübikude ja vähihüde)

2.3.2. Polüüpidega patsientide soole epiteelkoe mikroobikoosluse analüüs

Kuue polüüpidega patsiendi puhul võrreldi tervest epiteelkoest ja polüübist võetud biopsiaproovide bakterihõimkondi ja -perekondi. Nii nagu terve epiteelkoe puhul, olid ka patsientide terve epiteelkoe suurima osakaaluga hõimkonnad *Firmicutes* (47,23%), *Bacteroidetes* (26,48%) ja *Proteobacteria* (15,57%) (Joonis 5A). Kõige enamlevinud perekondadest tuvastati epiteelkoe puhul *Bacteroides* (14,92%), *GCA-900066575* (8,19%) ja *Blautia* (3,79%) (Joonis 5B). Samuti olid jämesoole polüübikoes kõige sagedasemateks hõimkondadeks *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria*, suhteliste esinemissagedustega vastavalt 34,36%, 29,8% ja 19,49%. Polüübikoe puhul tulid esile sellised perekonnad nagu *Bacteroides* (22,36%), *Ruminococcus gnavus* grupp (4,74%) ja *Variovorax* (3,23%) (Joonis 5B, Lisa S3). Kahest koetüübist tuvastatud bakteriperekondade esinemissageduste võrdlusel (analüüsiti 386 perekonda, 10% esinemissagedus) ei tuvastatud ühtegi statistiliselt olulist erinevust (t-testi korrigeeritud p-väärtus, FDR < 0,05).

Polüübikoe ja terve epiteelkoe mikrobioomi mitmekesisuse võrdlemisel oli näha, et polüübikoe esines suurem vaadeldud perekondade arvukus (144,5 +/- 45,76, vahemik 33,0-228,0) ja väiksem Shannoni mitmekesisus (3,4 +/- 0,798, vahemik 2,08-4,32) (Joonis 6). Samas polnud vaadeldud perekondade ja Shannoni mitmekesisuse muutused statistiliselt olulised (vaadeldud perekondade arvukus p = 0,58; Shannoni mitmekesisus p = 0,98).

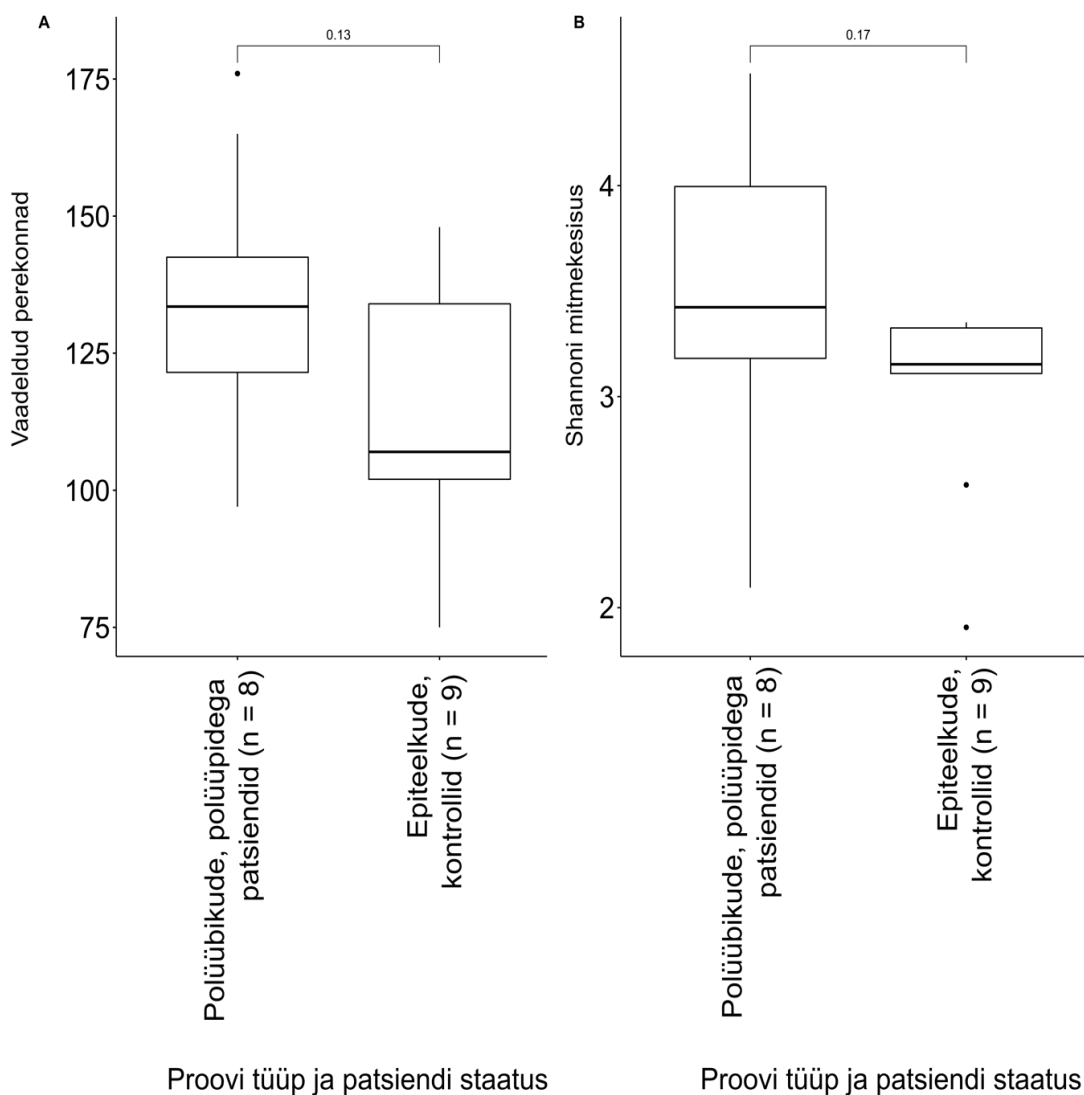


Joonis 6. Alfamitmekesisust väljendavate väärtuste karpdiagrammid patsientide epiteel- ja polüübikoe puhul. A – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning vaadeldud perekondade arvukuse omavaheline võrdlus; B – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning Shannoni mitmekesisuse indeksi omavaheline võrdlus

2.3.3. Patsientide polüübikoe ja kontrollgrupi epiteelkoe mikrobioomi võrdlus

Patsientide polüübikoe (N = 8) ja kontrollgrupi epiteelkoe (N = 9) analüüsist selgus, et patsientide polüübikoe vaadeldud perekondade arvukus on 134,0 (+/- 26,7, vahemik 97-176) ning Shannoni mitmekesisuse indeks on 3,47 (+/- 0,76, vahemik 2,1-4,53). Kontrollgrupi epiteelkoe puhul on need vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtus 113,3 (+/-

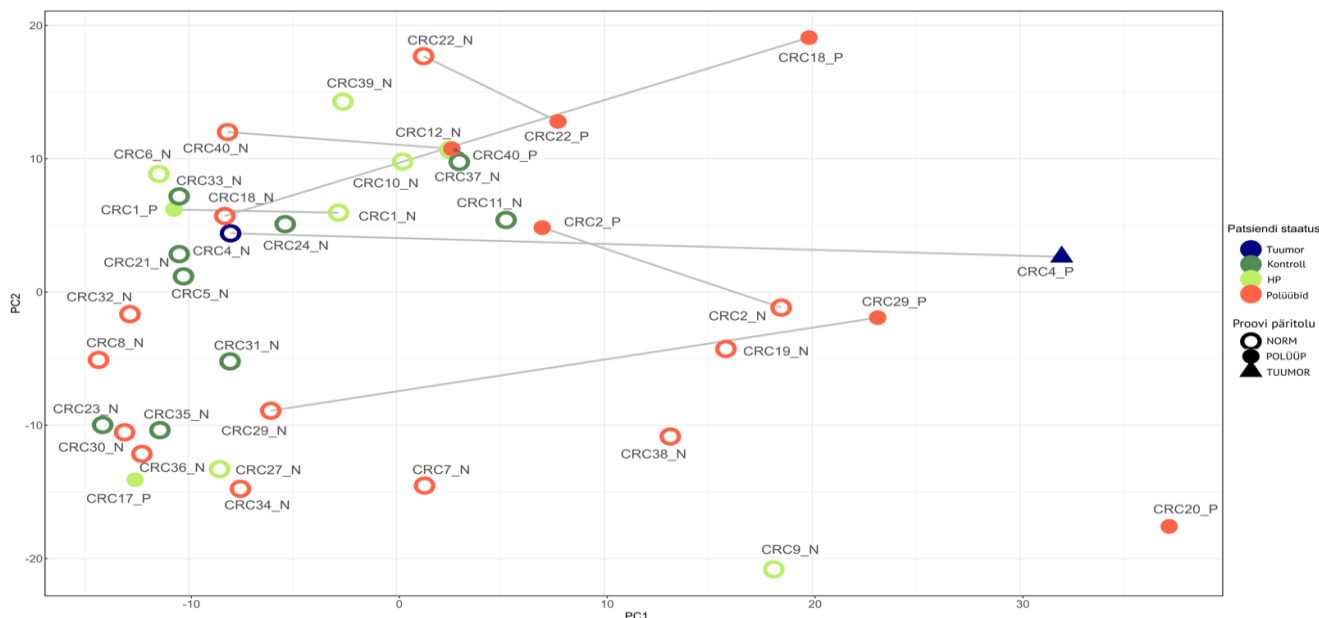
26,54, vahemik 75,0-148,0) ning Shannoni mitmekesisuse keskvärtus on 3,01 (+/- 0,48, vahemik 1,91-3,35) (Joonis 7).



Joonis 7. Alfamitmekesisust väljendavate väärtuste karpdiagrammid patsientide polüübikoe ja kontrollide epiteelkoe puhul. A – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning vaadeldud perekondade arvukuse omavaheline seos; B – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning Shannoni mitmekesisuse indeksi omavaheline seos

Alfamitmekesisuse puhul ei ole statistiliselt olulised vaadeldud perekondade arvukuse ($p = 0,13$) ega Shannoni mitmekesisuse indeksi erinevused ($p = 0,17$). Samuti pole ühtegi bakteriperekonda, mille esinemissagedus erineks oluliselt polüübi- ja epiteelkoe vahel ($FDR < 0,05$).

Beetamitmekesisust uuriti omavahel kõikide proovide suhtes. Selle väljendamiseks läbi viidud peakomponentanalüüsi tulemused näitavad, et terve jämesoole epiteelkoe ja patsientide polüüübikoe üldine mikroobikooslus klasterduvad üksteisest eraldi. Ka sama patsiendi erinevat tüüpi proovid klasterduvad mitmekesisuse alusel üksteisest eemale (Joonis 8). Samuti klasterduvad oodatavalt hüperplastilised polüüübid teisteste epiteelkoe proovide vahele (Joonis 8).

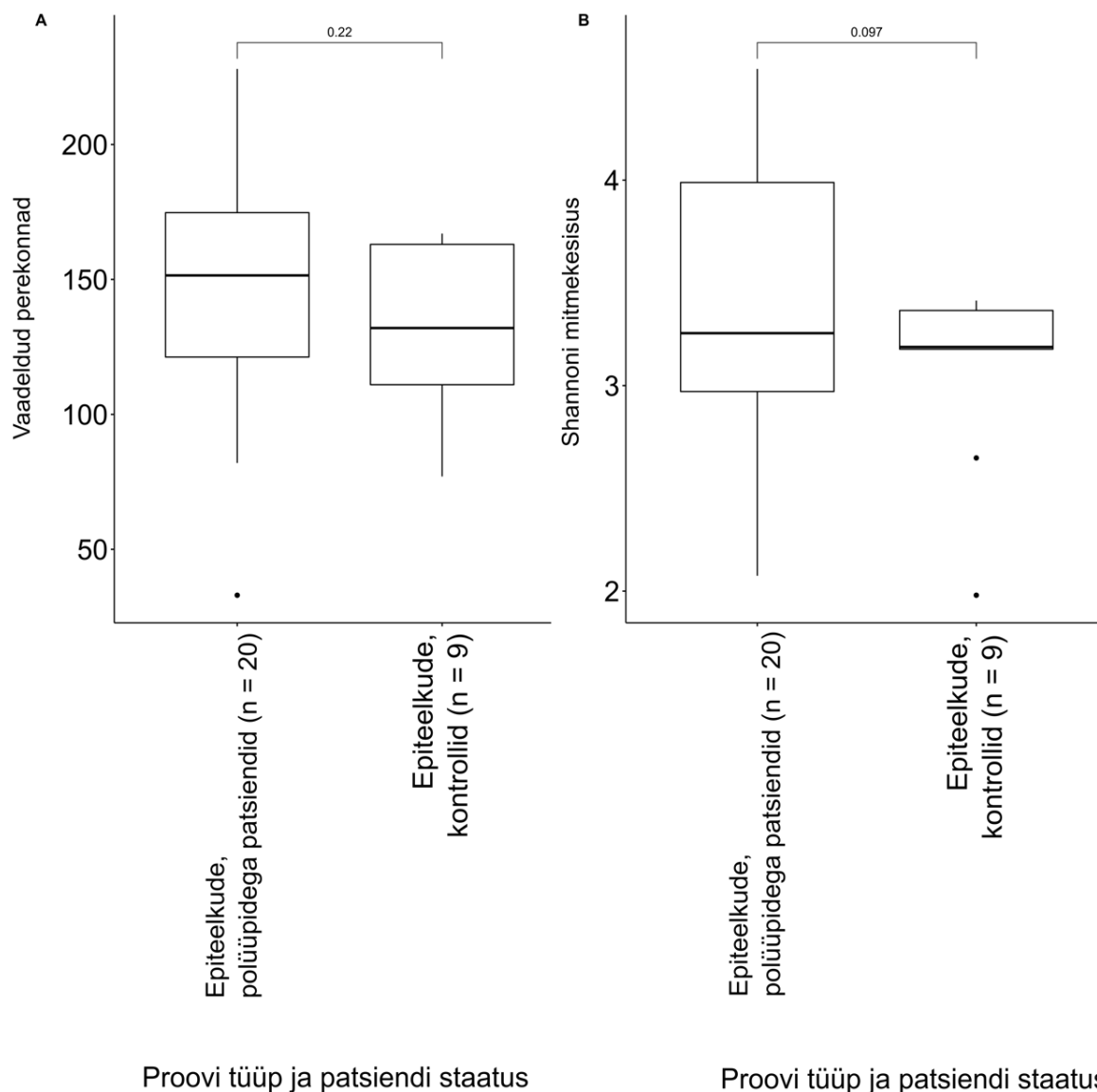


Joonis 8. Beetamitmekesisuse puhul läbi viidud peakomponentanalüüs (PCA, ingl k *principal component analysis*). Joonega on ühendatud sama patsiendi erinevad proovid. N – terve epiteelkoe proovid, P – polüüübikoe proovid, HP - hüperplastilised polüüübid, PC - peakomponent

2.3.4. Patsientide ja kontrollgrupi epiteelkudede mikroobioomi võrdlus

Patsientide epiteelkoe (N = 20) ja kontrollide epiteelkoe proovide (N = 9) mikroobikoosluse puhul statistiliselt olulist erinevust ei esinenud, kuigi patsientide epiteelkoe puhul tulid vaadeldud perekondade arvukuse ja Shannoni mitmekesisuse indeksi keskväärtused suuremad kui kontrollgrupi epiteelkoel. Patsientide epiteelkoe vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtus on 123,5 (+/- 33,56, vahemik 32-174) ja Shannoni mitmekesisuse indeksi keskväärtus on 3,34 (+/- 0,63, vahemik 2,03-4,35). Kontrollide epiteelkoel on aga vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtus 113,3 (+/- 26,54, vahemik 75,0-148,0) ning Shannoni mitmekesisuse keskväärtus on 3,01 (+/- 0,48, vahemik 1,91-3,35). Kahe koetüübiga proovide

alfamitmekesisuse väärtused ei ole statistiliselt olulised (vaadeldud perekonnad $p = 0,22$, Shannoni mitmekesisus $p = 0,097$) (Joonis 9).



Joonis 9. Alfamitmekesisust väljendavate väärtuste karpdiagrammid patsientide epiteelkoe ja kontrollide epiteelkoe puhul. A – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning vaadeldud perekondade arvukus; B – proovi tüübi ja patsiendi staatuse ning Shannoni mitmekesisuse indeks

2.3.5. Mikroobikooslus vähikoes ja terves epiteelkoes

Proovide kogumise ajavahemikus tuvastati koloskoopilisel analüüsil vähk ainult ühel patsiendil ning seetõttu pole antud töös võimalik teha võrdlust teiste uuritavatega. Ühe patsiendi vähkkoe ja terve epiteelkoe mikrobioomi võrdlemisel on näha erinevusi mikroobikoosluses (Joonis 5). Kõige enamlevinumatest hõimkondadest tuvastati vähikoe puhul *Proteobacteria* (34,52%), *Firmicutes* (27,44%) ja *Acidobacteria* (9,8%). Suurima suhtelise esinemissagedusega

perekondade hulka kuulusid *Anaerostipes* (12,63%), *Ralstonia* (3,61%), *Variovorax* (3,34%) ja *Bacteroides* (3,24%) (Joonis 5A ja B; Lisa S3). Vähipatsiendi tervet epiteelkude sisaldavas proovis olid kolm suurima osakaaluga hõimkonda *Firmicutes* (61,18%), *Bacteroidetes* (24,67%) ja *Proteobacteria* (7,49%). Enamlevinud perekonnad olid *Anaerostipes* (26,04%), *Bacteroides* (19,23%), *GCA-900066575* (4,63%) ja *Blautia* (3,22%) (Joonis 5A ja B; Lisa S3). Alfamitmekesisuse ja perekondliku koosseisu erinevuste olulisust ei olnud võimalik testida, kuna uuringus oli ainult üks uuritav.

2.4. Arutelu

Töös püstitatud eesmärgiks oli kindlaks määrata Eesti jämesoolevähi sõeluuringu programmi raames kogutud koeproovide mikroobide kooslus kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkonna sekveneerimist. Töös kirjeldati soole epiteeli koeproovidest (biopsiaproovid) määratud mikrobioomi kooslusi ning võrreldi omavahel terve epiteel- ja polüübikoe proovide mitmekesisust ja perekondlikku koosseisu.

Kontrollgrupi uuritavate terve epiteelkoe proovide puhul tulid esile suurima suhtelise esinemissagedusega hõimkonnad nagu *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria*, mis olid samuti kõige enam levinud hõimkonnad nii polüüpidega patsientide terves ja polüübikoes kui ka vähipatsiendi terves koes. Samuti olid sagedasemad bakteriperekonnad antud töös kõikides koeproovide tüüpides sarnased ning erinevus oli selgel ainult vähikoes. Antud tulemused vastavad kirjanduses kajastatud tulemustele. Näiteks on koe- ja väljaheiteproovide puhul tuvastatud, et suurima suhtelise esinemissagedusega hõimkondade hulka kuuluvad *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria* (Nakatsu jt, 2015; Zeller jt, 2014). Kõige enamlevinud perekonnad terves sooles olid *Bacteroides*, *Escherichia-Shigella*, *Prevotella 9*, *Faecalibacterium* ja *Anaerostipes* (Lisa S3). Mitmed väljaheiteproove hõlmanud jämesoolevähi uuringud näitavad, et tervetel kontrollidel on võrreldes polüüpidega uuritavatega suurem suhteline esinemissagedus bakteriperekondadel nagu *Bacteroides* (hõimkond *Bacteroidetes*), *Anaerostipes* (hõimkond *Firmicutes*), *Faecalibacterium* (hõimkond *Firmicutes*) ja *Prevotella* (hõimkond *Bacteroidetes*) (Mori jt, 2018; Zackular jt, 2014). Ka polüübikoe mikrobioomi üldprofiil erineb märkimisväärselt kontrollide epiteelkoest (Flemer jt, 2017).

Polüüpidega patsientide polüübi- ja epiteelkoe omavahel võrdlemisel tuvastati polüübikoes suurem keskmine perekondade arvukus ja väiksem Shannoni mitmekesisus. Erinevused polüübi- ja epiteelkoe vahel ei olnud aga statistiliselt olulised. Polüübikoe alfamitmekesisuse

väärtused on erinevate uuringute tulemusena aga ebaühtlased, mistõttu on leitud jämesoole polüüpidel võrreldes terve epiteelkoega nii suuremat kui väiksemat alfamitmekesisust (Lu jt, 2016; Sanapareddy, jt 2012; Shen jt, 2010; Peters jt, 2016; Yoon jt, 2017). Lu ja tema kaastöötajad pakkusid polüübike suurema alfamitmekesisuse selgitamiseks välja hüpoteesi, mis väidab, et adenoomide väljakujunemine võib soodustada jämesooles mikroobse tasakaalu muutumist ja sellest tulenevalt suuremat alfamitmekesisust (Lu jt, 2016). Peters jt, 2016 seostasid pärast väljaheiteproovide analüüsimist adenoomide väiksemat mikroobide mitmekesisust võimaliku väljakujuneva mikrobioota düsbioosi ehk mikroobide koosluse tasakaalu häirega, mistõttu võib suureneda oportunistlike patogeensete bakterite osakaal või väheneda kommensaalsete bakterite osakaal (Peters jt, 2016). Alfamitmekesisuse kohta usaldusväärsete järelduste tegemiseks tuleb kaasata uuringusse suurem valim ning andmeanalüüsi rohkem polüübike sisaldavaid proove.

Beetamitmekesisuse võrdlus nii patsientide kui kontrollide epiteel- ja polüübike puhul näitas, et koeproovide klasterdumine sõltub koeproovi tüübist. Koeproovi tüübist lähtuvat lahknemist tuvastasid ka Mira-Pascuel jt, 2015 terve epiteel- ja polüübike võrdlemisel (Mira-Pascuel jt, 2015). Tervet epiteelkude sisaldavate proovide klastris leidsid ka mitmed polüübikeoga proovid, kuid nende puhul on tegemist hüperplastiliste polüüpidega. Hüperplastilised polüübid on terve epiteelkoe alla kuuluvad paksenenud väljakasvud (Sonnenberg jt, 2020), mis seletab nende sarnasust tervete epiteelproovidega. Ühelt patsiendilt võetud paarisproovide puhul on selgesti eristav proove tähistavate andmepunktide kaugus tasandil, mis viitab erinevale mikroobikooslusele. Täpsema proovidevahelise mikrobioomi koosluse erinevuse võrdlemiseks tuleks analüüs läbi viia suurem arvu proovide puhul.

Patsientide ja kontrollgrupi uuritavate terve epiteelkoe analüüsimisel leiti, et polüüpidega patsientide epiteelkoe vaadeldud perekondade arvukus ja Shannoni mitmekesisus on suuremad kui kontrollgrupi uuritavate epiteelkoel. Erinevuse olulisuse testimiseks läbi viidud t-testi p-väärtuse korrektuur aga näitas, et erinevus on statistiliselt ebaoluline. Üldjuhul on kontrollide epiteelkude võrreldud vähipatsientide kasvajakoe ja polüüpidega patsientide ja kontrollide epiteelkoe võrdlemiseks on tehtud vähe töid. Kasvajakoe ja seda ümbritseva terve epiteelkoe võrdlemisel leiti, et lähedal paikneva kahe koetüübi vaheline mikroobne mitmekesisus ei erine. Põhjuseks pakuti välja, et mikrobioomi koosluse mitmekesisuse muutused võivad tekkida kooskõlas jämesoolevähi edasiarenemisega (Pan jt, 2020).

Käesoleva töö puhul ei olnud võimalik analüüsida vähi- ja epiteelkoe alfamitmekesisuse erinevusi, sest uuringu valimisse oli kaasatud ainult üks vähipatsient. Vähikoega proovi puhul tulid võrreldes ülejäänud koeproovide tüüpidega esile sarnased hõimkonnad, näiteks

Proteobacteria ja *Firmicutes* (Lisa S3). Ka kaks enamlevinud perekonda - *Anaerostipes* ja *Bacteroides* – esinesid näiteks kontrollgrupi uuritavate epiteelkoe suurima osakaaluga perekondade hulgas (Lisa S3). Jämesoole kasvajakoe puhul on mitmel juhul tuvastatud, et mikroobioomi üldine kooslus erineb arvestataval määral võrreldes tervete kontrollgrupi koeproovidega (Burns jt, 2018; Wirth jt, 2020; Yachida jt, 2019).

Erinevates koeproovides tuvastatud mikroobikoosluse hulgas leidus ka mitmeid baktereid, kes tavaliselt elavad vee- ja mullakeskkonnas. Need taksonoomilised grupid võivad pärineda jämesoolest võetud koeproovidest, aga võivad sattuda proovidesse ka välistest saastusallikatest. Üks olulisema tähtsusega saasteallikaid on DNA eraldamiseks kasutatud kit, mistõttu on selle sees ja pinnal olevat mikroobide kogumit nimetatud ka kitoomiks. Kitoomist ja teistest saasteallikatest pärinevad sageli selliste bakterite DNA järjestused nagu *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ja *Sphingomonas* (Salter jt, 2014). Loetletud bakteriperekondadest esinesid selle töö raames uuritud terve epiteelkoega proovides *Sphingomonas*, *Ralstonia* ning *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, kes võivad pärineda DNA-d sisaldavatest saasteallikatest. Bioinformaatilises analüüsis tuvastati proovide sisendandmete seas lugemeid ka negatiivses kontrollproovis, mis võivad pärineda DNA eraldamiseks kasutatud kiti kitoomist. Kõik negatiivse kontrolli lugemid said aga kvaliteedikontrolli tulemusena välja filtreeritud. Erinevate DNA eraldamise komplektide ja bioinformaatiliste algoritmide kasutamine samasuguste proovide puhul mõjutab märkimisväärselt lõplikku mikroobikoosluse üldpilti, mistõttu tuleb seda arvesse võtta erineva meetodikaga tehtud tööde tulemuste võrdlemisel (Boers jt, 2016; Gloor jt, 2017).

Käesolev töö oli suurema uuringu raames teostatud pilootkatse, kus analüüsiti esimesi kogutud proove. Seetõttu on uuritavate hulk töös liiga väike, et teha suuremaid järeldusi. Väikse kohordiga valimi puhul on keeruline testida püstitatud hüpoteese ning teha tulemuste kohta usaldusväärseid järeldusi. Uuritavate arvu vähendas ka see, et kõikidelt uuritavatelt ei olnud võimalik saada terve soolekoe ja polüübikoe proove. Kuna mikroobikooslust mõjutavad väga paljud erinevad faktorid, siis tuleks usaldusväärsete tulemuste saamiseks kaasata uuringusse suuremad kohordid (Zhernakova jt, 2016). Lisaks on vaja uuringutulemuste kinnitamiseks kasutada erinevaid populatsioone või viia läbi uuringukohortide metaanalüüsid (Boers jt, 2016).

KOKKUVÕTE

Inimese soolestiku mikrobiota on mitmekesine mikroorganismide kooslus, mis mõjutab organismi füsioloogilisi protsesse ja erinevate komplekshaiguste väljakujunemist. Jämesoolevähk (CRC) on üks sellistest komplekshaigustest ning kasvaja väljakujunemine kestab tavaliselt 10-15 aasta jooksul märgatavate sümptomiteta. Mitmetes maailma riikides ja Eestis on käivitatud jämesoolevähi sõeluuringuprogramm kasvaja tuvastamiseks varajastes staadiumites, et tagada vähipatsientide kõrge elulemus pärast diagnoosi ja ravi saamist.

Kuna jämesoolevähi puhul on leitud väga selgeid erinevusi ka soolestiku mikrobioomi koosseisus, siis võiks tulevikus olla lisaks olemasolevatele diagnoosimeetoditele ka vähieelsete muutuste tuvastamiseks oluline analüüsida soolestiku mikrobioomi kooslust. Mikroobse koosluse analüüsimisel on võimalik kindlaks määrata bakteriperekonnad või teised kõrgemad taksonid, mille osakaal on muutunud võrreldes terve soolekoe mikrobikooslusega. Tänapäeval kasutatakse mikrobioomi mikroobse koosluse analüüsimiseks bakteriaalse DNA sekveneerimist, kasutades kas geenipõhist (nt 16S rRNA) või kogu genoomi (metagenoomi) sekveneerimist.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli analüüsida Eesti jämesoolevähi sõeluuringu raames koloskoopia analüüsil kogutud uuritavate jämesoole koeproovidest mikrobioomi koosseis kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist. Samuti sooviti võrrelda polüüpe sisaldavast ja tervest soole epiteelkoest võetud koeproovide mikrobikoosluste erinevusi.

Töö tulemustena leiti, et erinevat tüüpi koeproovides on samad suurima suhtelise esinemissagedusega hõimkonnad ja perekonnad välja arvatud vähkkoes. Nii kontrollgrupi kui polüüpidega patsientide epiteel- ja polüübikoe ning epiteelkudede omavahelisel võrdlemisel ei leitud mikrobikoosluses statistiliselt olulisi erinevuseid. Samuti ei leitud alfamitmekesisuse puhul erinevusi kontrollgrupi epiteel- ja polüübikoe ning kontrollide ja patsientide epiteelkoe omavahelisel võrdlemisel. Beetamitmekesisuse väljendamiseks läbi viidud peakomponentanalüüs näitas proovide klasterdumist proovi tüübi alusel. Vähhkoe mikrobikoosluse analüüsimisel tuvastati teiste koeproovide suhtes sarnased suurima esinemissagedusega hõimkonnad ja perekonnad, kuid vähi- ja epiteelkoe alfamitmekesisuse erinevuste analüüsimine ei olnud võimalik, sest uuringu valimisse oli kaasatud ainult üks vähipatsient. Töö tulemusi arvestades oleks tarvis edasistes uuringutes kaasata suuremaid valimeid ning rohkem koeproove vähieelsete seisundite mikrobikoosluse muutuste tuvastamiseks.

RESÜMEE / SUMMARY

Gut tissue microbiome profile in Estonian colorectal cancer screening patients

Annabel Raudsepp

Summary

The human gut microbiota is a diverse community of microorganisms, which has a significant influence on the physiological processes and health. The microbiota can either strengthen the human organism or facilitate the development of various complex diseases. Colorectal cancer (CRC) is one of the many complex diseases commonly associated with the changes of microbial profile inside the colon and rectum. Several bacterial genera and species have been found to influence the carcinogenesis inside the large intestine or drive processes which alter the internal environment inside colonic epithelial cells, for example.

The changes in microbial composition have already been detected for colonic polyps and the early stages of colorectal cancer, thus using bacterial biomarkers for early prevention of tumors is showing considerable potential in addition to current screening programs ongoing in Estonia and other countries around the world.

The main purpose of this thesis was to identify and examine the taxonomic composition of microbial communities inside colonic epithelial tissue samples based on the 16S rRNA gene sequencing (V3-V4 regions). In addition, samples with healthy epithelial tissue were compared to samples with polyps in order to determine the taxonomic changes of bacterial genera and phyla.

The results of this thesis indicate that highly abundant phyla and genera are similar to samples of different types, except for cancer tissue. None of the phyla or genera were differentially abundant when comparing groups of tissue samples to one another. Alfa-diversity metrics (observed genera and Shannon diversity index) showed no difference between samples with healthy epithelium and polyps. The results of principal component analysis conducted to express beta-diversity pointed that samples clustered separately on the basis of sample type. Considering the results, a larger sample size and more tissue samples are crucial for identifying differentially abundant bacterial genera and for making statistically valid conclusions in following studies.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Kertu Liis Krigulit ja Elin Orgi, kes oma põhjaliku tagasiside ja toetava suhtumisega olid abiks töö valmimise ja kirjutamise vältel. Lisaks täna genoomika instituudi mikrobiomika töögrupi doktorante Oliver Aasmetsa ja Kreete Lüllit, kelle tehtud töö võimaldas valmis saada töö bioinformaatilise ja andmete analüüsi. Olen tänulik ka molekulaar- ja rakubioloogia instituudi biotehnoloogia labori õppejõududele ja töötajatele, kes mind eksperimentaalse osa läbiviimisega igakülgset aitasid.

KIRJANDUSE LOETELU

Atkin, W. S., Valori, R., Kuipers, E. J., Hoff, G., Senore, C., Segnan, N., Jover, R., Schmiegel, W., Lambert, R. ja Pox, C. (2012). European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition – Colonoscopic surveillance following adenoma removal. *Endoscopy*, 44(S 3), SE151–SE163. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1309821>

Baxter, N. T., Ruffin, M. T., Rogers, M. A. M., & Schloss, P. D. (2016). Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Medicine*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0290-3>

Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M. ja Dvorak, K. (2009). Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 15(27), 3329–3340. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3329>

Bertelli, C. ja Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 803–813. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12217>

Boers, S. A., Jansen, R. ja Hays, J. P. (2016). Suddenly everyone is a microbiota specialist. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(7), 581–582. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.002>

Brown, G. 2007. Colorectal Cancer, p. 1-12. Cambridge University Press, Cambridge.

Burns, M. B., Montassier, E., Abrahante, J., Priya, S., Niccum, D. E., Khoruts, A., Starr, T. K., Knights, D. ja Blekhman, R. (2018). Colorectal cancer mutational profiles correlate with defined microbial communities in the tumor microenvironment. *PLOS Genetics*, 14(6), e1007376. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007376>

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. ja Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J. ja Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K. ja Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>
- Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>.
- Chen, J., Pitmon, E. ja Wang, K. (2017). Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Seminars in Immunology*, 32, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.006>
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X. ja Xiang, C. (2012). Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *PLOS ONE*, 7(6), e39743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039743>
- Chen, Y., Peng, Y., Yu, J., Chen, T., Wu, Y., Shi, L., Li, Q., Wu, J. ja Fu, X. (2017). Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget*, 8(19), 31802–31814. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15992>
- Claesson, M. J., Wang, Q., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P. ja O’Toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, 38(22), e200–e200. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq873>
- Clegg, F., Berry, S. H., Hansen, R. ja Hold, G. L. 2018. Molecular Analysis of the Microbiome in Colorectal Cancer, p. 139-153. In J.-F. Beaulieu (ed.), *Colorectal Cancer, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7765-9_8
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. M. ja Relman, D. A. (2012). The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science*, 336(6086), 1255–1262. <https://doi.org/10.1126/science.1224203>
- Cresci, G. A. ja Bawden, E. (2015). Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(6), 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>.
- Davidson, R. M. ja Epperson, L. E. 2018. Microbiome Sequencing Methods for Studying Human Diseases, p. 77-90. In J. K. DiStefano (ed.), *Disease Gene Identification*. Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_5

- Debelius, J., Song, S. J., Vazquez-Baeza, Y., Xu, Z. Z., Gonzalez, A. ja Knight, R. (2016). Tiny microbes, enormous impacts: what matters in gut microbiome studies? *Genome Biology*, 17(1), 217. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1086-x>
- Dejea, C. M., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., ... Sears, C. L. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), 18321–18326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406199111>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. ja Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., ... Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 167(5), 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>
- Drengenes, C., Eagan, T. M. L., Haaland, I., Wiker, H. G. ja Nielsen, R. (2021). Exploring protocol bias in airway microbiome studies: One versus two PCR steps and 16S rRNA gene region V3 V4 versus V4. *BMC Genomics*, 22(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07252-z>
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M. L. ja Palmqvist, R. (2017). Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer*, 141(12), 2528–2536. <https://doi.org/10.1002/ijc.31011>
- Feng, Q., Liang, S., Jia, H., ... Wang, J. (2015). Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nature Communications*, 6(1), 6528. <https://doi.org/10.1038/ncomms7528>
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., ... MetaHIT consortium. (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>
- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q. ja Qin, H. (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00020>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V. ja Egozcue, J. J. (2017). Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>

- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R. ja Ley, R. E. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell*, 158(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Goradel, N. H., Heidarzadeh, S., Jahangiri, S., Farhood, B., Mortezaee, K., Khanlarkhani, N. ja Negahdari, B. (2019). Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: A mechanistic overview. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2337–2344. <https://doi.org/10.1002/jcp.27250>
- Gorkiewicz, G. ja Moschen, A. (2018). Gut microbiome: A new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv*, 472(1), 159–172. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2277-x>.
- Guarner, F. ja Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Guo, S., Li, L., Xu, B., ... Zhang, G. (2018). A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of Fusobacterium Nucleatum to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. *Clinical Chemistry*, 64(9), 1327–1337. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.289728>
- Hale, V. L., Jeraldo, P., Chen, J., ... Chia, N. (2018). Distinct microbes, metabolites, and ecologies define the microbiome in deficient and proficient mismatch repair colorectal cancers. *Genome Medicine*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0586-6>
- Hills, R. D., Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C. ja Theberge, C. R. (2019). Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*, 11(7), 1613. <https://doi.org/10.3390/nu11071613>
- Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V. ja 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>
- Innos, K., Reima, H., Baburin, A., Paapsi, K., Aareleid, T. ja Soplepmann, J. (2018). Subsite- and stage-specific colorectal cancer trends in Estonia prior to implementation of screening. *Cancer Epidemiology*, 52, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2017.12.016>
- Ito, M., Kanno, S., Noshō, K., ... Shinomura, Y. (2015). Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *International Journal of Cancer*, 137(6), 1258–1268. <https://doi.org/10.1002/ijc.29488>

- Kalda, R., Kullik, T., Salupere, R., Suuroja, T. ja Tomberg, K. (2017). *Jämesoolevahi sõeluuringu infomaterjal*. Tallinn: Eesti Haigekassa. <https://haigekassa.ee/inimesele/haiguste-ennetus/jamesoolevahi-soeluuring>.
- Kaminski, M. F., Robertson, D. J., Senore, C. ja Rex, D. K. (2020). Optimizing the Quality of Colorectal Cancer Screening Worldwide. *Gastroenterology*, 158(2), 404–417. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.026>
- Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., ... Meyerson, M. (2012). Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 292–298. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H. ja Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Ladabaum, U., Dominitz, J. A., Kahi, C. ja Schoen, R. E. (2020). Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*, 158(2), 418–432. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.043>
- Liang, Q., Chiu, J., Chen, Y., ... Yu, J. (2017). Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(8), 2061–2070. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1599>
- Louis, P., Hold, G. L. ja Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- Lu, Y., Chen, J., Zheng, J., Hu, G., Wang, J., Huang, C., Lou, L., Wang, X. ja Zeng, Y. (2016). Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Scientific Reports*, 6(1), 26337. <https://doi.org/10.1038/srep26337>
- Maida, M., Macaluso, F. S., Ianiro, G., Mangiola, F., Sinagra, E., Hold, G., Maida, C., Cammarota, G., Gasbarrini, A. ja Scarpulla, G. (2017). Screening of colorectal cancer: Present and future. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(12), 1131–1146. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1392243>
- Maurice, C. F., Haiser, H. J. ja Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*, 152(1–2), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052>

- Mesila, I., Jõeste, E., Reintam, M.-A., Tamm, H., Riispere, Ž., Murde, M. ja Roosipuu, R. 2012. *Patoanatoomia* (1. trükk), p. 368. Tartu, Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., Moris, F., Rodrigo, L., Mira, A. ja Collado, M. C. (2015). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *Journal of Gastroenterology*, 50(2), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0963-x>
- Mori, G., Rampelli, S., Orena, B. S., ... Pasca, M. R. (2018). Shifts of Faecal Microbiota During Sporadic Colorectal Carcinogenesis. *Scientific Reports*, 8(1), 10329. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28671-9>
- Mori, G. ja Pasca, M. R. (2021). Gut Microbial Signatures in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1312. <https://doi.org/10.3390/ijms22031312>.
- Männik, A., Suuroja, T., Juus, E., Võrno, T., Uusküla, A., Reile, R., Orav, K. ja Kiivet, R.-A. 2014. Kolorektaalvähi sõeluuringu kulutõhusus: Tervisetehnoloogia hindamise raport TTH11, p. 4, 20, 23, 37. Tartu, Tartu Ülikooli tervishoiu instituut.
- Nakatsu, G., Li, X., Zhou, H., ... Sung, J. J. Y. (2015). Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nature Communications*, 6(1), 8727. <https://doi.org/10.1038/ncomms9727>
- Ocvirk, S., Wilson, A. S., Appolonia, C. N., Thomas, T. K. ja O’Keefe, S. J. D. (2019). Fiber, Fat, and Colorectal Cancer: New Insight into Modifiable Dietary Risk Factors. *Current Gastroenterology Reports*, 21(11), 62. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0725-2>
- Pan, H.-W., Du, L.-T., Li, W., Yang, Y.-M., Zhang, Y. ja Wang, C.-X. (2020). Biodiversity and richness shifts of mucosa-associated gut microbiota with progression of colorectal cancer. *Research in Microbiology*, 171(3), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.01.001>
- Pariante, N. (2019). A field is born. *Nature Research*. <https://doi.org/10.1038/d42859-019-00006-2>
- Park, C. H., Han, D. S., Oh, Y.-H., Lee, A.-R., Lee, Y. ja Eun, C. S. (2016). Role of Fusobacteria in the serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Scientific Reports*, 6(1), 25271. <https://doi.org/10.1038/srep25271>

- Peters, B. A., Dominianni, C., Shapiro, J. A., ... Ahn, J. (2016). The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer. *Microbiome*, 4(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0218-6>
- Purcell, R. V., Visnovska, M., Biggs, P. J., Schmeier, S. ja Frizelle, F. A. (2017). Distinct gut microbiome patterns associate with consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 11590. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11237-6>
- Rimbaud, J.-C., Buts, J.-P., Corthier, G. ja Flourié, B. 2007. *Gut microflora: digestive physiology and pathology*. John Libbey Eurotext, Arcueil.
- Ridlon, J. M., Kang, D.-J. ja Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Roediger, W. E. W., Moore, J. ja Babidge, W. (1997). Colonic Sulfide in Pathogenesis and Treatment of Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(8), 1571–1579. <https://doi.org/10.1023/A:1018851723920>
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G. ja Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>
- Rustgi, A. K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes and Development*, 21(20), 2525–2538. Scopus. <https://doi.org/10.1101/gad.1593107>
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J. ja Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Sanapareddy, N., Legge, R. M., Jovov, B., ... Keku, T. O. (2012). Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *The ISME Journal*, 6(10), 1858–1868. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.43>
- Saus, E., Iraola-Guzmán, S., Willis, J. R., Brunet-Vega, A. ja Gabaldón, T. (2019). Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.05.001>

- 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>
- Schoen, R. E., Razzak, A., Yu, K. J., Berndt, S. I., Firl, K., Riley, T. L. ja Pinsky, P. F. (2015). Incidence and Mortality of Colorectal Cancer in Individuals with a Family History of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 149(6), 1438-1445.e1. Scopus. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.055>
- Schreuders, E. H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R. E., Sung, J. J. Y., Young, G. P. ja Kuipers, E. J. (2015). Colorectal cancer screening: A global overview of existing programmes. *Gut*, 64(10), 1637–1649. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309086>
- Sender, R., Fuchs, S. ja Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Senore, C., Basu, P., Anttila, A., ... Segnan, N. (2019). Performance of colorectal cancer screening in the European Union Member States: Data from the second European screening report. *Gut*, 68(7), 1232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317293>
- Shen, X. J., Rawls, J. F., Randall, T. A., Burcall, L., Mpande, C., Jenkins, N., Jovov, B., Abdo, Z., Sandler, R. S. ja Keku, T. O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes*, 1(3), 138–147. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12360>
- Shi, N., Li, N., Duan, X. ja Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Shine, E. E., & Crawford, J. M. (2021). Molecules from the Microbiome. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080320-115307>
- Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., ... Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
- Skrypnik, K. ja Suliburska, J. (2018). Association between the gut microbiota and mineral metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2449–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8724>

- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N. ja 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>
- Song, E.-J., Lee, E.-S. ja 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>
- Sonnenberg, A., Turner, K. O. ja Genta, R. M. (2020). Associations between gastric histopathology and the occurrence of colonic polyps. *Colorectal Disease*, 22(7), 814–817. <https://doi.org/10.1111/codi.14968>
- Sonnenburg, J. L. ja Sonnenburg, E. D. (2019). Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, 366(6464). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>.
- Suehiro, Y., Zhang, Y., Hashimoto, S., ... Yamasaki, T. (2018). Highly sensitive faecal DNA testing of TWIST1 methylation in combination with faecal immunochemical test for haemoglobin is a promising marker for detection of colorectal neoplasia. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55(1), 59–68. <https://doi.org/10.1177/0004563217691064>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ja Bray, F. (2020). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, (n/a). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Thomas, A. M., Manghi, P., Asnicar, F., ... Segata, N. (2019). Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nature Medicine*, 25(4), 667–678. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0405-7>
- Thursby, E. ja Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>

- Vuik, F. E., Nieuwenburg, S. A., Bardou, M., ... Spaander, M. C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, 68(10), 1820–1826. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317592>
- Vujkovic-Cvijin, I., Sklar, J., Jiang, L., Natarajan, L., Knight, R. ja Belkaid, Y. (2020). Host variables confound gut microbiota studies of human disease. *Nature*, 587(7834), 448–454. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2881-9>.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S. ja Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal*, 6(2), 320–329. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.109>
- Wirbel, J., Pyl, P. T., Kartal, E., ... Zeller, G. (2019). Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine*, 25(4), 679–689. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0406-6>
- Wilson, A. S., Koller, K. R., Ramaboli, M. C., ... O’Keefe, S. J. D. (2020). Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(3), 723–740. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06112-w>
- Wong, S. H., Kwong, T. N. Y., Chow, T.-C., ... Sung, J. J. Y. (2017). Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut*, 66(8), 1441–1448. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312766>
- Wong, S. H. ja Yu, J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(11), 690–704. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>
- Xie, Y.-H., Gao, Q.-Y., Cai, G.-X., ... Fang, J.-Y. (2017). Fecal *Clostridium symbiosum* for Noninvasive Detection of Early and Advanced Colorectal Cancer: Test and Validation Studies. *EBioMedicine*, 25, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.005>
- Yachida, S., Mizutani, S., Shiroma, H., ... Yamada, T. (2019). Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nature Medicine*, 25(6), 968–976. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0458-7>
- Yoon, H., Kim, N., Park, J. H., ... Jung, H. C. (2017). Comparisons of Gut Microbiota Among Healthy Control, Patients With Conventional Adenoma, Sessile Serrated Adenoma, and Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 22(2), 108–114. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.2.108>

- Yu, J., Chen, Y., Fu, X., Zhou, X., Peng, Y., Shi, L., Chen, T. ja Wu, Y. (2016). Invasive *Fusobacterium nucleatum* may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *International Journal of Cancer*, 139(6), 1318–1326. <https://doi.org/10.1002/ijc.30168>
- Yu, T., Guo, F., Yu, Y., ... Fang, J.-Y. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell*, 170(3), 548-563.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.008>
- Zackular, J. P., Rogers, M. A. M., Ruffin, M. T. ja Schloss, P. D. (2014). The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. *Cancer Prevention Research*, 7(11), 1112–1121. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0129>
- Zeki, S. S., Graham, T. A. ja Wright, N. A. (2011). Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(2), 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.211>
- Zeller, G., Tap, J., Voigt, A. Y., ... Bork, P. (2014). Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology*, 10(11), 766. <https://doi.org/10.15252/msb.20145645>
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, ... Fu, J. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*, 352(6285), 565–569. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

American Cancer Society. (2020). American Cancer Society Guideline for Colorectal Cancer Screening. Kasutatud 15. veebruar 2021. a, <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/acs-recommendations.html>

Tervise Arengu Instituut (2020). Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas. Kasutatud 11. veebruar 2021. a, [PK10: Pahaloomuliste kasvajate esmasjuhud paikme, soo ja vanuserühma järgi. PxWeb \(tai.ee\)](#).

Zymo Research'i kodulehekülg (i.a). *ZymoBIOMICS Microbial Community Standard*. Kasutatud 24. mai 2021. a, <https://www.zymoresearch.com/products/zymbiomics-microbial-community-standard>

LISAD

LISA S1

Tabel S1. Koeproovide mõõdetud DNA kontsentratsioonid

Proovi kood	DNA kontsentratsioon (ng/μl)
CRC001_NORM	58,0
CRC001_POLP	32,0
CRC002_NORM	70,9
CRC002_POLP	60,0
CRC004_NORM	37,3
CRC004_POLP	52,5
CRC005_NORM	201,9
CRC006_NORM	50,6
CRC007_NORM	32,5
CRC008_NORM	39,9
CRC009_NORM	80,5
CRC010_NORM	44,2
CRC011_NORM	96,3
CRC012_NORM	30,2
CRC017_POLP	39,4
CRC018_NORM	53,1
CRC018_POLP	110,0
CRC019_NORM	39,5
CRC020_POLP	87,1
CRC021_NORM	67,3
CRC022_NORM	76,0
CRC022_POLP	43,2
CRC023_NORM	59,5
CRC024_NORM	55,0
CRC027_NORM	78,9
CRC029_NORM	27,5
CRC029_POLP	101,1
CRC030_NORM	47,4
CRC031_NORM	44,2
CRC032_NORM	48,1
CRC033_NORM	50,8
CRC034_NORM	39,0
CRC035_NORM	69,4
CRC036_NORM	38,2
CRC037_NORM	73,7
CRC038_NORM	20,2
CRC039_NORM	31,0
CRC040_NORM	29,7
CRC040_POLP	91,9

LISA S2

Tabel S2. Koeproovide mõõdetud DNA kontsentratsioonide keskväärtused

Proovi tüüp	Terve epiteelkude	Polüüpe sisaldav kude
Keskmine DNA kontsentratsioon (ng/ μ l)	56,4	68,6
Standardhälve (σ)	33,16	29,21

LISA S3

Tabel S3. Suurima suhtelise esinemissagedusega hõimkonnad ja perekonnad erinevates koeproovide tüüpides

Kontrollid (terve epiteelkude N = 9)			
Hõimkond	Suhteline esinemisagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemisagedus (%)
<i>Firmicutes</i>	44,28	<i>Bacteroides</i>	24,59
<i>Bacteroidetes</i>	36,04	<i>Escherichia-Shigella</i>	5,76
<i>Proteobacteria</i>	13,78	<i>Prevotella 9</i>	3,91
		<i>Faecalibacterium</i>	3,46
		<i>Anaerostipes</i>	3,42
Polüüpiidega patsiendid (terve epiteelkude N = 20)			
Hõimkond	Suhteline esinemisagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemisagedus (%)
<i>Firmicutes</i>	47,23	<i>Bacteroides</i>	14,92
<i>Bacteroidetes</i>	26,48	<i>GCA-900066575</i>	8,19
<i>Proteobacteria</i>	15,57	<i>Blautia</i>	3,79
		<i>Faecalibacterium</i>	3,59
		<i>Alloprevotella</i>	3,18
Polüüpiidega patsiendid (polüübikude N = 8)			
Hõimkond	Suhteline esinemisagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemisagedus (%)
<i>Firmicutes</i>	34,36	<i>Bacteroides</i>	22,36
<i>Bacteroidetes</i>	29,80	<i>[Ruminococcus] gnavus</i> grupp	4,74
<i>Proteobacteria</i>	19,49	<i>Variovorax</i>	3,22
		<i>Blautia</i>	3,01
		<i>Ralstonia</i>	2,99
Vähipatsient (terve epiteelkude N = 1)			
Hõimkond	Suhteline esinemisagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemisagedus (%)
<i>Proteobacteria</i>	34,52	<i>Anaerostipes</i>	26,04
<i>Firmicutes</i>	27,44	<i>Bacteroides</i>	19,23
<i>Acidobacteria</i>	9,80	<i>GCA-900066575</i>	4,63
		<i>Blautia</i>	3,22
		<i>Faecalibacterium</i>	2,92
Vähipatsient (vähikude N = 1)			
Hõimkond	Suhteline esinemisagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemisagedus (%)
<i>Firmicutes</i>	61,18	<i>Anaerostipes</i>	12,63
<i>Bacteroidetes</i>	24,67	<i>Ralstonia</i>	3,61
<i>Proteobacteria</i>	7,49	<i>Variovorax</i>	3,34
		<i>Bacteroides</i>	3,24
		<i>Faecalibacterium</i>	3,14

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annabel Raudsepp (sünnikuupäev: 28.05.1999):

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Soolestiku mitmekesisuse erinevused Eesti jämesoolevähi sõeluuringu patsientidel“, mille juhendajad on Kertu Liis Krigul ja Elin Org,
 - a. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
 - b. 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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annabel Raudsepp

28.05.2021