

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENOOMIKA INSTITUUT

**Mikroobikoosluse analüüsi võimalikkus Eesti jämesoolevähi sõeluuringus kasutatavatest  
peitvere testi proovidest**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Johanna Toodu

Juhendaja MSc Kertu Liis Krigul

TARTU 2024

## **Mikroobikoosluste analüüsi võimalikkus Eesti jämesoolevähi sõeluuringus kasutatavatest peitvere testi proovidest**

Jämesoolevähk on levinud kõrge suremusega vähivorm, mille varaseks tuvastamiseks viiakse läbi riiklikke sõeluuringuid. Sõeluuringutes kasutatakse peitvere teste, kus patsiendi väljaheitest mõõdetakse peitverd, mis on jämesoolevähi esinemise tunnuseks. Samas on arvukad uuringud näidanud, et jämesoolevähki põdevatel inimeste soole mikroobikooslus erineb tervete inimeste omast märkimisväärselt. Lisaks peitverele võiks mikroobide analüüsimine peitvere testi tuubidest aidata jämesoolevähki varem ja täpsemalt tuvastada. Antud töös püüti välja selgitada, kas peitvere testi tuubidest on võimalik mikroobikoosluse DNAd eraldada ning sekveneerida, kui selle jaoks kasutada modifitseeritud DNA eraldamise protokoll. Katsete käigus selguski, et mikroobse koosluse tuvastamine on peitvere testidest võimalik. Tulevikus oleks vaja katsetesse kaasata suurem valim, et teha statistiliselt olulisi järeldusi.

**Märksõnad:** mikrobiom, jämesoolevähk, peitvere test, 16S rRNA geeni sekveneerimine

**CERCS:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## **Possibilities for microbiome analysis from fecal occult blood tests used in the screening of colorectal cancer in Estonia**

Colorectal cancer is a form of cancer with a high rate of mortality. National screening programs are using fecal occult blood tests to diagnose cancer at an early stage. Meanwhile, the gut microbial community has been shown to be different between colon cancer patients and healthy controls. Therefore, it would be helpful if both occult blood and microbes could be detected and analysed using the same test tube to improve colon cancer diagnostics. The aim of the study was to find out if it was possible to detect microbial DNA from a fecal occult blood test tube if a modified extraction protocol was used. The experiments showed that the analysis of microbes was possible. A larger sample size should be included in future studies.

**Keywords:** microbiome, colon cancer, fecal immunochemical test, 16S rRNA gene sequencing

**CERCS:** B220 Genetics, cytogenetics

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Kolorektaalvähk	7
1.1.1. Haiguse kirjeldus ja riskifaktorid	7
1.1.2. Levimus maailmas ja Eestis	7
1.1.3. Patogenees	9
1.1.4. Geneetiline taust	12
1.2. Mikrobioomi olulisus	13
1.2.1. Kolorektaalvähi seosed mikrobioomiga	14
1.2.2. Mikrobioomi võimalikud mõjud soolevähi väljakujunemisele	15
1.3. Jämesoolevähi sõeluuringud	17
1.3.1. Jämesoolevähi sõeluuring Eestis	18
1.3.2. Peitveretestid	19
1.3.3. Peitveretestist mikroobide analüüs	21
2. EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1. Töö eesmärgid	22
2.2. Materjal ja meetodika	22
2.2.1. Proovide ettevalmistamine	23
2.2.2. DNA eraldamine standardprotokolli järgi	24
2.2.3. DNA eraldamine iFOB tuubidest	24
2.3.4. Sekveneerimine ja andmete töötlus	25
3.3. Tulemused	25
3.3.1 DNA eraldamine	25
3.3.2. Sekveneerimine ja andmete töötlus	27
3.3.2. Mikroobikoosluste analüüs	28
3.4. Arutelu	31
KOKKUVÕTE	34
RESÜMEE / SUMMARY	35
KIRJANDUSE LOETELU	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	43
LIHTLITSENTS	44

## KASUTATUD LÜHENDID

ACS – Ameerika Vähiliit (*American Cancer Society*)

ATR – ataxia-telangiectasia ja Rad3-ga seotud kinaas (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related kinase*)

BER – lämmastikaluse väljalõikereparatsioon (*base excision repair*)

CIMP – CpG saarekesi metüleeriv fenotüüp (*CpG island methylator phenotype*)

CIN – kromosomaalne ebastabiilsus (*chromosomal instability*)

DSB – kaheaheelaline katkestus (*double-strand break*)

EPEC – enteropatoogene *Escherichia coli* (*enteropathogenic Escherichia coli*)

ETBF – enterotoksigeenne *Bacteroides fragilis* (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*)

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

FIT – immunohistokeemiline peitveretest (*fecal immunohistochemical test*)

FOBT - peitveretest (*fecal occult blood test*, FOBT)

gFOBT – guajakimeetodil põhinev peitveretest (*guajac-based fecal occult blood test*)

GWAS – ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (*genome-wide association study*)

HCA – heterotsükiline amiin (*heterocyclic amine*)

HDI – inimarengu indeks (*Human Development Index*)

HNPCC – pärilik mittepolüpoosne kolorektaalvähk (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*)

ICL – ahelatevaheline ristide (*interstrand cross-link*)

iFOBT - immunokeemiline peitveretest (*immunochemical fecal occult blood test*)

MAP – MUTYH-seoseline polüpoos (*MUTYH-associated polyposis*)

MAPK – mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (*mitogen-activated protein kinase*)

MMR – DNA valepaardumiste parandamine (*DNA mismatch repair*)

MSI – mikrosatelliitide ebastabiilsus (*microsatellite instability*)

NOC – N-nitrosoühend (*N-nitroso compound*)

NRPS – mitteribosomaalne peptiidisüntetaas (*nonribosomal peptide synthetase*)

OTU – operatiivne taksonoomiline üksus (*operational taxonomic unit*)

PJS – Peutzi-Jeghers'i sündroom (*Peutz-Jehgers syndrome*)

PKS - polüketiidi süntetaas (*polyketide synthetase*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

SNP – ühenukleotiidiline polümorfism (*single nucleotide polymorphism*)

Treg – reguleeriv T-rakk (*regulatory T-cell*)

## SISSEJUHATUS

Kolorektaalvähk ehk jämesoolevähk on üks levinumaid vähivorme maailmas, olles esinemissageduselt teiste vähivormide seas kolmandal ning vähisurmade arvu poolest neljandal kohal (Arnold et al., 2017). Epidemioloogiliste uuringute põhjal ennustatakse, et aastaks 2030 võib vähijuhtude arv läänepärase elustiili ning rahvastiku üldise vananemise tõttu tõusta 60% võrra (Krigul et al., 2021). Vähi tekke riskifaktoriteks on lisaks geneetilistele eeldustele ka paljud elustiilist ning keskkonnast tulenevad tegurid. Erinevates uuringutes on selgunud, et põhilisteks mittegeneetilisteks riskifaktoriteks jämesoolevähi puhul on ülekaalulisus ning passiivne elustiil, suitsetamine, suurenenud alkoholarbimine ning samuti kiudainetevaene ja palju rafineeritud suhkruid ning eeltöödeldud (liha)toite sisaldav „läänepärane“ dieet (Sawicki et al., 2021). Lisaks sellele mängivad riskiteguritena rolli ka inimese sugu (on leitud, et meestel on suurem tõenäosus kolorektaalvähi haigestuda), vanus ning ka sotsioökonomiline staatus – üle 2/3 kõigist maailmas tuvastatud jämesoolevähi juhtudest ning 60% selle põhjustatud surmadest esinevad just kõrgelt arenenud riikides (Arnold et al., 2017, Dekker et al., 2019). Tõenäoliselt ongi selle põhjuseks nendes piirkondades levinud läänepärane elustiil ja toitumisharjumused ning vananev rahvastik, nagu eelnevalt mainitud. Arvukad uuringud on näidanud, et jämesoolevähi põdevate inimeste soole mikroobikooslus erineb tervete inimeste omast märkimisväärselt ning nende väljaheiteproovidest on tuvastatud bakteriperekondi ja -liike, mida tervetel inimeste proovides üldiselt ei esinegi. See annab põhjust järeldada, et soole mikrobioomi analüüsimine on oluline etapp jämesoolevähi varase tuvastamise protsessis.

Käesolevas töös püüti välja selgitada, kas peitvere testi tuubidest on võimalik mikroobikoosluse DNAd eraldada ja kooslust tuvastada, kasutades selleks 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist. Tulevikus võiks eelistatult ühest ja samast peitvere testist eraldada nii mikrobiaalset DNA-d kui ka peitverd parandades nii vähidiagnostikat. Bakalaureusetöö on valminud geenitehnoloogia bakalaureuseõppekava raames Tartu Ülikooli loodus- ja täppiseaduste valdkonna genoomika instituudi Eesti geenivaramu teaduskeskuse mikrobiomika uurimisgrupis. Töö metoodilise osa katsed viidi läbi Tartu Ülikooli loodus- ja täppiseaduste valdkonna molekulaar- ja rakubioloogia instituudis biotehnoloogia õppetoolis aastal 2019.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Kolorektaalvähk

### 1.1.1. Haiguse kirjeldus ja riskifaktorid

Kolorektaalvähk ehk soolevähk on jämesoole või käärsoole epiteelist alguse saanud vähkkasvaja, kirjanduses käsitletaksegi neid üldiselt eelmainitud ühise nimetuse all. Kolorektaalvähk on teiste vähivormide seas maailmas esinemissageduselt kolmandal ning vähisurmade arvu järgi neljandal kohal (Arnold *et al.*, 2017). Statistika näitab, et meestel on suurem risk kolorektaalvähki haigestuda, samuti suureneb vähirisk üldiselt vanusega (Dekker *et al.*, 2019). Nagu teistegi vähivormide puhul, on kolorektaalvähi tekkimise risk suurem, kui selleks on geneetilised eeldused. Inimesel, kelle perekonnas pole soolevähki esinenud ja kes on üle 50 aasta vana, on soolevähki haigestumise risk 5–6%. Samas tõuseb risk 20%-ni, kui inimese lähisugulasel on kolorektaalvähk esinenud (Mikita *et al.*, 2012). Haiguse kujunemisel mängivad rolli ka erinevad keskkonnategurid. Palju on uuritud näiteks punase liha tarbimise seost soolevähi tekkega (Slattery *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2011). Punase liha kantserogeenset mõju seletatakse nii heterotsükliiliste amiinidega (*heterocyclic amines*, HCA), mis tekivad liha kuumutamisel kõrgel temperatuuril, kui N-nitrosoühendite (*N-nitroso compound*, NOC) tekkega jämesooles (Chan *et al.*, 2011). Paljud NOC-d liigituvad kantserogeensete ainete alla ning need tekivad siis, kui jämesoolebakterid dekarboksüleerivad liha söömise tagajärjel jämesoolde jõudvaid aminohappeid nitroseeriva ühendi juuresolekul (Bingham, Hughes and Cross, 2002). Punases lihas sisalduv heem toimib rauaallikana soolebakterite nitraadireduktaasile, mis omakorda mängib suurt rolli NOC tootmises (Cross, Pollock and Bingham, 2003). On ka leitud, et suhkrurikaste ja rafineeritud toitude tarbimine suurendab soolevähi riski (Slattery *et al.*, 1998). Riskifaktoritena käsitletakse ka suitsetamist, suurenenud alkoholitarbimist ja rasvumist (Botteri *et al.*, 2008; Kyrgiou *et al.*, 2017; Dekker *et al.*, 2019).

### 1.1.2. Levimus maailmas ja Eestis

Kolorektaalvähi juhtumid moodustavad üle maailma kõigist diagnoositud vähijuhtumitest 10.2% ning enamasti on see levinud kõrge inimarengu indeksiga (*Human Development Index*, HDI) riikides (Bray *et al.*, 2018). Erinevate prognooside järgi kasvab kolorektaalvähi ülemaailmne

koormus 2030. aastaks ligikaudu 60%, tuues kaasa 2,2 miljonit uut haigusjuhtu ja 1,1 miljonit vähisurma (Arnold *et al.*, 2017). Kolorektaalvähi ülemaailmne levimus varieerub piirkonniti üsna laialt ning haigust saab kasutada sotsiaalmajandusliku arengu näitajana, kuna vähijuhtumite arv tõuseb üldiselt koos HDI kasvamisega (Bray *et al.*, 2018). Samas on näha ka trendi, kus kõrge HDI-ga riikides (näiteks USA-s, Jaapanis ning Prantsusmaal) on nii kolorektaalvähi esinemine kui selle põhjustatud surmajuhtumite arv hoopis languses (Arnold *et al.*, 2017; Bray *et al.*, 2018). Kuigi pole täpselt teada, mis selliseid langustrende põhjustab, tuleneb see tõenäoliselt osaliselt sellest, et kõrgelt arenenud riikides avastatakse vähki üha varem ja suudetakse seda ka edukamalt ravida ja ennetada (Arnold *et al.*, 2017).

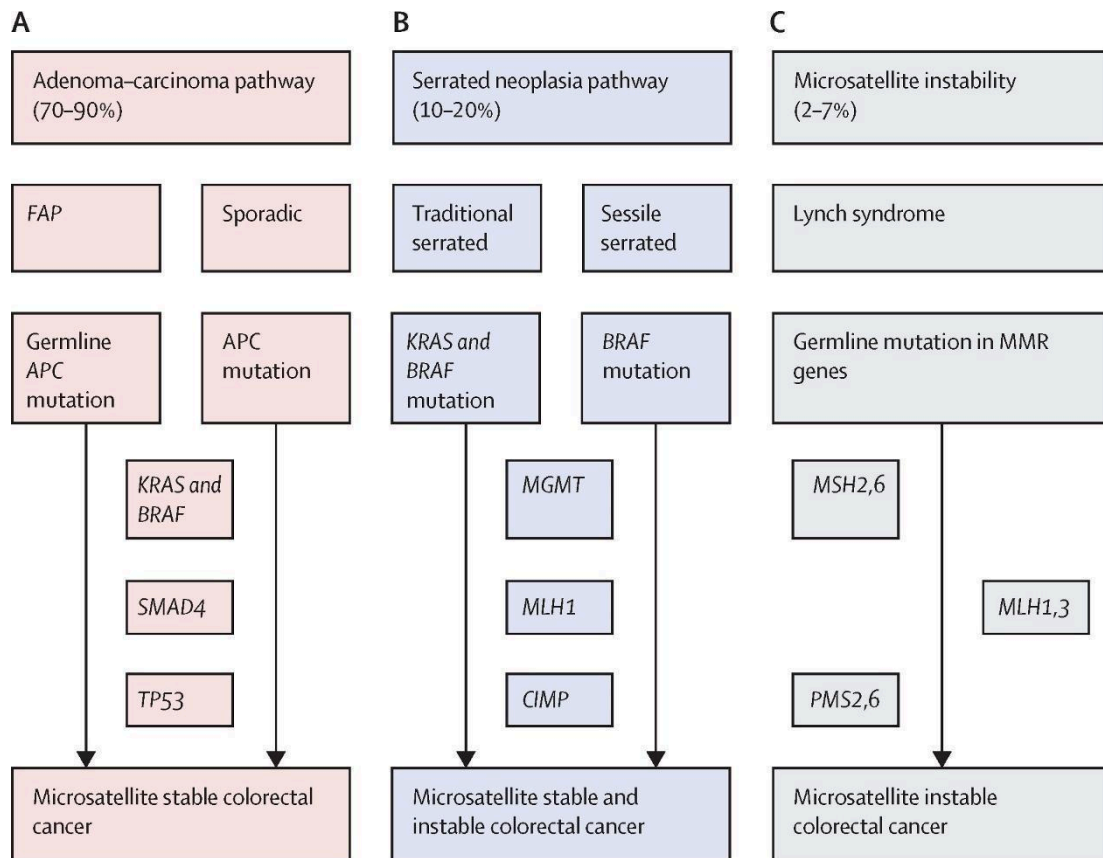
Kuigi üldiselt seostatakse soolevähi suuremat riski vanuse kasvamisega, siis on viimastel aastatel tõusutrendis kolorektaalvähi esinemine just noorte inimeste seas (Vuik *et al.*, 2019). Euroopa riikides kasvas aastatel 2004-2016 soolevähi haigusjuhtumite arv 20-29-aastaste inimeste seas aastas keskmiselt 7,9%, kusjuures aastatel 1990-2004 oli sama näitaja vaid 1,7% aastas (Vuik *et al.*, 2019). Samas uuringus näidati kolorektaalvähi esinemise kasvutrendi ka 30-39-aastaste ning 40-49-aastaste inimeste seas, kuid kasvutrend oli kõige drastilisem just noorimas vanusegrupis. Kuigi tõusutrendi põhjused on teadmata, mängib sealjuures tõenäoliselt rolli üha kasvav ülekaaluliste noorte hulk (Vuik *et al.*, 2019). Kuigi erinevaid faktoreid on ilmselt veel vaja uurida, siis on korrelatsiooni ülekaalulisuse ning kolorektaalvähi juhtumite kasvu vahel näidatud näiteks Kanada noorte täiskasvanute seas (Patel ja De, 2016). Samuti võivad vähijuhtude kasvu noorte seas põhjustada suitsetamine, alkoholi tarbimine ja vähene füüsiline aktiivsus (Vuik *et al.*, 2019).

Eestis diagnoositakse iga aasta umbkaudu 900 kolorektaalvähi esmasjuhtu, paigutades selle nii naiste (12% kõigist vähijuhtudest) kui ka meeste (11% kõigist vähijuhtudest) puhul esinemissageduselt kolmandale kohale (Mikita *et al.*, 2012, Innos *et al.*, 2018). Eestis on esmashaigestumine kõige kõrgem üle 70-aastaste seas ja näiteks 2011. aastal oli Põhja-Eesti Regionaalhaiglas esmakordselt vähiga haiglaravil 329 patsienti, kelle keskmine vanus jäi 69,9 aasta juurde (Männik *et al.*, 2014). Eestis sureb kolorektaalvähki aastas ligikaudu 400 inimest ja diagnoosiga patsiendi elumus on umbes 40% (Mikita *et al.*, 2012). Nagu ka teiste vähitüüpide puhul, varieerub patsiendi ellujäämise tõenäosus vastavalt haiguse arengustaadiumile ning on suurim, kui vähk avastatakse algstaadiumis. Eestis esinevatest kolorektaalvähi esmasjuhtudest on

ligikaudu 40% algstaadiumis, 27% patsientidest esinevad juba ka kaugmetastaasid (Männik *et al.*, 2014).

### 1.1.3. Patogenees

Kolorektaalvähi areng on mitmeetapiline protsess ning enamik vähkkasvajaid kujuneb välja sooleepiteeli düsplastilistest polüüpidest (Männik *et al.*, 2014; Dekker *et al.*, 2019; Johnston and Carey, 2020). Ligikaudu 40,5%-l arenenud riikide rahvastikust esineb elu jooksul üks või enam jäme- või pärasoole adenoomi, kuid ainult 5-6%-l patsientidest kujuneb välja vähkkasvaja (Männik *et al.*, 2014). Kuigi tegu on kompleksse haigusega, mille puhul on teada erinevaid klassifikatsioone, siis joonistub kolorektaalvähi patogeneesis välja kolm põhilist mehhanismi (**Joonis 1**), mille aluseks on võetud genomis esinevate kordusjärjestuste ehk mikrosatelliitide ebastabiilsus. Suurem osa ehk 70-90% vähkkasvajatest progresseeruvad traditsioonilise adenoomi-kartsinoomi jada järgi (*adenoma-carcinoma sequence*), 10-20% juhtudest saavad alguse sakilise servaga adenoomidest ja 2-7% vähijuhtudest kujunevad välja mikrosatelliitide ebastabiilsuse tulemusel (Dekker *et al.*, 2019). Adenoomi-kartsinoomi jada iseloomustab normaalse või düsplastilise sooleepiteeli samm-sammulist arenemist vähkkasvajaks (Leslie *et al.*, 2002). Sellise kujunemismustriga vähkkasvajatele on iseloomulik kromosomaalne ebastabiilsus (*chromosomal instability*, CIN), mis võib avalduda muutustena kromosoomide arvus ja/või ülesehituses (Müller, Ibrahim and Arends, 2016). Tavaliselt algab CIN fenotüübi väljakujunemine mutatsiooniga *apc* (*adenomatous polyposis coli*) geenis, millele järgneb RAS aktivatsioon või tuumorsupressori TP53 funktsiooni kadumine (Dekker *et al.*, 2019). Normaalingimustes moodustab multifunktsionaalne APC valk tsütoplasmas kompleksi  $\beta$ -kateniiniga ning märgistab selle lagundamiseks (Fodde *et al.*, 2001). Selle funktsiooni kadumisel suureneb tsütoplasmas  $\beta$ -kateniini hulk, mis rakutuuma liikumisel interakteerub transkriptsioonifaktoritega ning reguleerib seeläbi muuhulgas rakkude jagunemist, diferentseerumist ning apoptoosi (Jazi and Najafi, 2017). Lisaks on APC oluline ka kromosoomide normaalseks lahknemiseks mitoosi käigus (Fodde *et al.*, 2001). RAS aktivatsioon käivitab rakkudes mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) signaalraja, mis toob kaasa rakujagunemise intensiivistumise ja vähendab apoptoosi (Ahlquist *et al.*, 2008).



### Joonis 1. Kolorektaalvähi jaotumine.

Kõige sagedasemini esineva vähivormi ehk adenoomi-kartsinoomi jada puhul arenevad välja vähkkasvajad, mille genoomi mikrosatelliidid on stabiilsed (**Joonis 1A**). Sakilise servaga adenoomide kujunemine (**Joonis 1B**) algab tihti mutatsioonidega *braf* või *kras* geenides ning nende edasine areng toimub tuumorsuppressorgeenide metüleerimise tagajärjel (CpG saarekesi metüleeriv fenotüüp [*CpG island methylator phenotype*, CIMP]). Sõltuvalt sellest, milliseid gene selles protsessis epigeneetiliselt vaigistatakse, võivad lõpuks välja areneda nii stabiilsete kui ebastabiilsete mikrosatelliitidega kasvajad. Mikrosatelliitide ebastabiilsust (*microsatellite instability*, MSI) põhjustavad DNA parandusmehhanismidega seotud geenide mutatsioonid (**Joonis 1C**), mis on iseloomulikud ka Lynchi sündroomile. Erinevat tüüpi kasvajate väljaarenemise mehhanismides esineb ka kattuvusi. Lisaks ei ole eriti palju infot traditsiooniliste sakilise servaga neoplastiliste polüüpide kohta, kuid neid käsitletakse sellegipoolest eraldiseisvana (Dekker *et al.*, 2019).

Ligikaudu 15-30% kõigist kolorektaalvähi juhtudest on perekondliku taustaga (Mikita *et al.*, 2012). Päriliku kolorektaalvähi kõige levinumad vormid jagunevad neljaks: Lynchi sündroom ehk pärilik mittepolüpoosne kolorektaalvähk (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC); perekondlik adenomatoosne polüpoos (*familial adenomatous polyposis*, FAP); MUTYH-seoseline polüpoos (MUTYH-associated polyposis, MAP) ning Peutzi-Jeghers'i sündroom (Peutz-Jeghers syndrome, PJS) (Mikita *et al.*, 2012).

HNPCC on dominantselt päranduv autosoomne vähisündroom, mis moodustab ligikaudu 3% kõigist päriliku kolorektaalvähi juhtudest ning seda kandvate patsientide eluaegne kolorektaalvähi risk on 80% (Mecklin *et al.*, 1994; Carethers, 2016). Lynchi sündroomi põhjustavad mutatsioonid DNA valepaardumiste parandamisega seotud geenides (DNA mismatch repair, MMR), mis peaksid korrektselt toimides ära hoidma muteerunud DNA edasikandumise tütarakkudesse ning samuti takistama rakujagunemist (Mikita *et al.*, 2012; Carethers, 2016). Mutatsioonid MMR geenides takistavad DNA parandusmehhanismide normaalset toimimist ja põhjustavad sellega MSI kasvajakudede (Peltomaki and Vasen, 1997). MSI tuvastamise uuringutega on võimalik Lynchi sündroomi kahtlusi kinnitada ja ka näiteks sporaadilisest kolorektaalvähist eristada, kuna MSI esineb 90% Lynchi sündroomiga patsientidel, samas kui sporaadilise kolorektaalvähi puhul on selle osakaal umbes 15% (Mikita *et al.*, 2012).

FAP moodustab kõigist kolorektaalvähi juhtumitest umbes 1% (Vasen *et al.*, 2008). Tegu on dominantselt päranduva autosoomse sündroomiga, mida põhjustab mutatsioon APC geenis. Üks FAP põhilisi kliinilisi sümptomeid on sadade kuni tuhandete adenoomide esinemine inimese jäme- ja käärsooles juba lapse- ja noorukieas (Petersen, Slack and Nakamura, 1991; Cruz-Correa and Giardiello, 2003). Kui FAP patsientide seisundit juba varases staadiumis ei tuvastata ega ravita, kujuneb peaaegu kõigil neist välja kolorektaalvähk. Ligikaudu 8% FAP juhtudest on tegu sündroomi kergema vormiga, mida iseloomustavad väiksem adenoomide hulk ja vähkkasvaja hilisem väljakujunemine (Vasen *et al.*, 2008). Tavaliselt on FAP patsientide sooleepiteeli polüübid vähem kui 1 cm läbimõõduga, lamedad või varrega ning tubulaarse, tubulovilloosse või villoosse histopatoloogiaga (Cruz-Correa and Giardiello, 2003).

MAP on autosoomne retsessiivselt päranduv kolorektaalvähi vorm, mis sarnaneb fenotüübilt FAP kergema vormiga ning on seetõttu tuvastatav ainult geenuuringute alusel (Mikita *et al.*, 2012). MAP põhjuseks on mutatsioonid MUTYH geenis (varasemas kirjanduses kasutatakse ka

nimetust MYH), mis vastutab DNA reparatsioonisüsteemi, täpsemalt vigaste nukleotiidide asendamise mehhanismi (*base excision repair*, BER) eest (Mikita *et al.*, 2012). BER mängib väga suurt rolli reaktiivsete hapnikuühendite (*reactive oxygen species*, ROS) põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamisel (Al-Tassan *et al.*, 2002). Näiteks 8-okso-7,8-dihüdro-2'-deoksüguanosiin (8-oxoG) on oksüdatiivse stressi tagajärjel tekkinud nukleotiid, mis on suhteliselt stabiilne ning tugeva mutageense potentsiaaliga, sest paardub kergesti adeniinjääkidega. Selline valepaardumine toob aga parandamata jätmise korral DNA replikatsiooni käigus kaasa G:C→T:A transversiooni (Al-Tassan *et al.*, 2002). Normaaltingimustes eemaldab DNA glükosülaas replikatsiooni käigus oksüdeerunud nukleotiidi ning asendab selle, MUTYH mutatsioonide korral see mehhanism aga ei käivitu ning muteerunud DNA kandub tütarakkudesse edasi (Al-Tassan *et al.*, 2002; Mikita *et al.*, 2012).

PJS on autosoomne dominantsetl päranduv sündroom, mida iseloomustavad gastrointestinaalsed polüübid ja hüperpigmenteerunud laigud (maakulid) nahal ja limaskestadel, peamiselt huultel ja suupiirkonnas (Beggs *et al.*, 2010; Mikita *et al.*, 2012). PJS väljakujunemine algab enamasti mutatsioonidega STK11 (LKB1) geenis, millelt kodeeritav valk on multifunktsionaalne seriin/treoniin kinaas ning toimib muuhulgas tuumorsupressorina (Baas *et al.*, 2004).

#### **1.1.4. Geneetiline taust**

Nagu eelnevalt mainitud, on osa soolevähi juhtumeid teiste vähitüüpidega sarnaselt geneetilise taustaga. Pärilike tegurite osa kolorektaalvähi tekkeprotsessis on erinevate uuringute väitel 10-35% (Lichtenstein *et al.*, 2000; Czene, Lichtenstein and Hemminki, 2002). Perekondliku kolorektaalvähi erinevad vormid moodustavad kõigist vähijuhtumitest 20-25% ja neid seostatakse spetsiifiliste kõrge penetrantsusega geenimutatsioonidega, suuremal osal juhtudest on aga tegu mittepäriliku ehk sporaadilise vähiga, mille puhul võib tekkepõhjuseks olla ka juhuslik geenidefekt, näiteks ühenukleotiidiline polümorfism (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (Bardhan and Liu, 2013; Wen, Xu and Yuan, 2018). Enamlevinud SNP-dele keskendunud ülegenoomnsete assotsiatsiooniuringute (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) käigus on leitud mitmeid madala penetrantsusega lookuseid, mis mõjutavad muuhulgas erinevate signaaliradade toimimist ning mängivad rolli kolorektaalvähi tekkeprotsessis (Peters *et al.*, 2013). Kuna tegu on kompleksse mitmeetapilise haigusega, ei saa ilmselt ühegi juhtumi puhul

rääkida ainult ühest kindlast tekkepõhjusest. Kuigi antud töö keskendub mikrobioomi ja kolorektaalvähi omavahelistele seostele, siis mängib ka geneetiline komponent kindlasti iga juhtumi puhul suuremat või väiksemat rolli.

## **1.2. Mikrobioomi olulisus**

Inimese kehal leidub väga erinevaid mikroobe, mille arvukus ja mitmekesisus varieerub sõltuvalt kehapiirkonnast ning see kooslus on igaühel unikaalne (Huttenhower et al., 2012). Nii on ka soolestik toitaineterikkaks elukeskkonnaks umbes  $10^{13}$  mikroorganismile ning suurem osa neist paikneb jämesooles, kus rakkude tihedus on  $10^{11}$  rakku/ml (Sender et al., 2016). Suure enamuse sellest kooslusest moodustavad anaeroobsed bakterid ning nende kollektiivses genoomis ehk mikrobiomis arvatakse olevat umbkaudu 100-150 korda rohkem geene kui inimese enda genoomis (Savage, 1977, Xu & Gordon, 2003, Qin et al., 2010). Lisaks kuulub soolestiku mikrobioomi koosseisu vähesel määral (umbkaudu 0,1%) ka arheid, viiruseid ning ekarüootseid rakke (Qin et al., 2010).

Mikrobioloogilisteks uuringuteks kasutatakse tänapäeval põhiliselt kas metagenoomi sekveneerimist, mis annab aimu mikrobioomi üldisest geneetilisest koosseisust ja funktsioonidest, või bakteriaalse 16S rRNA geeni sekveneerimist, mille abil on võimalik täpsemalt kirjeldada bakterikoosluse taksonoomilist ülesehitust (Bokulich et al., 2020, Nayfach et al., 2015). Nii on näiteks metagenoomi sekveneerimisega koostatud ulatuslik inimese soolestiku mikrobioomi geenikataloog, mille abil saab kirjeldada bakterikoosluse võimalikke funktsioone ja mõju inimese füsioloogiale ja tervisele (Huttenhower et al., 2012).

Mikroorganismide kogumi ehk mikrobioota elutegevus ning interaktsioonid peremeesorganismiga mõjutavad mitmeid füsioloogilisi protsesse (Lozupone et al., 2012). Üheks näiteks on soolestiku mikroobide võime lagundada kompleks süsivesikuid, mida inimorganism muidu omastada ei suudaks. Fermenteeritavad süsivesikud on inimese jämesoole anaeroobse mikrobioota kõige olulisem toiduallikas (Sonnenburg et al., 2005) ning suurema osa sellistest polüsahhariididest moodustavad taimset päritolu kiudained, mille hulka kuuluvad nii rakukesta komponendid kui ka erinevad varuained, näiteks inuliin ja resistentne tärklis (Flint et al., 2008). Sellest tulenevalt on mikrobioomi seostatud ka rasvumisega- on näidatud, et kui mikroobivabadele hiirtele siirdati tavapäraselt kasvatatud hiirte mikrobiokooslus, suurenes

mikroobivabades tingimustes kasvatatud hiirtel nii toidust omastatav energiahulk kui ka *de novo* rasvhapete süntees maksarakkudes, kuna soole luumenist imendus sama toidukoguse juures verre oluliselt rohkem monosahhariide (Bäckhed et al., 2004). Laialt on uuritud ka soolebakterite võimet toota vitamiine, mida peremeesorganism iseseisvalt sünteesida ei suuda, kuid mis on vajalikud mitmete ainevahetuslike protsesside toimimiseks. Näiteks on inimese soolebakterid võimelised tootma vitamiin K<sub>2</sub> ning ka vesilahustuvaid B-grupi vitamiine (Das et al., 2019).

Eelmainitule lisaks on paljude uuringute huviorbiidis olnud ka mikroobikoosluse võime kaitsta organismi patogeenide eest. Sellega seotud erinevad mehhanismid jagunevad üldpildis kaheks: kommensiaalsete bakterite ja patogeenide vahelised otsesed vastastikmõjud (näiteks konkurents toitainete või ökoloogiliste nišside üle) ning mikroobide vahendusel toimuv peremeesorganismi enda kaitsemehhanismide tugevdamine (Kamada et al., 2013). Immuunsüsteemi ja mikrobiota vahelisi koosmõjusid on laialdaselt uuritud. Mikroorganismid võivad soolestikus esile kutsuda T-lümfotsüütide vahendatud põletikulisi reaktsioone, mis omakorda soodustavad krooniliste haiguste, nagu Crohni tõbi või haavandiline soolepõletik, väljakujunemist (Round and Mazmanian, 2010; Morgan *et al.*, 2012). Põletikku soodustavate T-rakkude toimet suruvad maha erinevad regulatoorsed T-lümfotsüüdid (*regulatory T-cell*, Treg). Osa neist pärineb tüümusest, osa aga on indutseeritavad ja pärinevad perifeersetest lümfikudedest, sh soolestikuga seotud lümfikoest, ning toodavad põletikuvastaseid tsütokiine nagu näiteks IL-10 (Round and Mazmanian, 2010). On näidatud, et mikroobivabade hiirte soolestikus leidub võrreldes tavatingimustes kasvatatud hiirtega oluliselt vähem Treg rakke ja et nende arv sõltub bakteriaalsete käärimisprotsesside käigus tekkivate lühikese ahelaga rasvhapete (*short-chain fatty acids*, SCFA), nagu atsetaat, propionaat ja butüraat, kontsentratsioonist (Smith *et al.*, 2013). Mahasurumata põletikulised reaktsioonid suurendavad oluliselt kolorektaalvähi väljakujunemise riski (Kraus and Arber, 2009).

### **1.2.1. Kolorektaalvähi seosed mikrobiomiga**

Hiljuti viidi läbi ulatuslik meta-analüüs, milles uuriti kolorektaalvähi patsientide metagenoomi ning avastati, et nende mikrobiota koosseisus on teatud bakteriliikide arvukus oluliselt suurenenud. See 29 bakteriliigist koosnev tuumikkooslus esines kõigil kolorektaalvähi patsientidel, aga ei olnud tervete inimeste metagenoomis tihti isegi tuvastatav (Wirbel et al.,

2019). Nimetatud uuring on määrava tähtsusega, kuna seal näidati, kuidas soolestiku mikrobioomi koosseisu saab kasutada kindla soolevähi markerina. Varasemalt on küll leitud seoseid soolestiku mikrobioloogilise koosseisu üldiste muutuste ning erinevate haiguste vahel, kuid siiani polnud siiski teada spetsiifiliselt kolorektaalvähile iseloomulikku mustrit, kuna osa kõrvalekaldeid esines mitme haiguse puhul sarnaselt (Duvallet *et al.*, 2017).

Wirbel *et al.* kasutasid meta-analüüsi läbiviimiseks viite uuringut, kus kolorektaalvähi patsientide väljaheiteproovide mikroobikooslust võrreldi tervete patsientide omaga. Selle käigus tehti kindlaks 849 liiki, mis esinesid ühtlaselt igas uuringus ning nende hulgast omakorda kerkis esile 94 oluliselt suurema esinemissagedusega liiki. Edasisel analüüsil tuvastati 29 liigist koosnev tuumikkooslus, mis esines kõigil kolorektaalvähi patsientidel, kuid mis ei olnud kontrollpatsientide väljaheidetest eraldatud metagenoomis tihti isegi tuvastatavad (Wirbel *et al.*, 2019). Käesoleva töö kontekstis on Wirbel *et al.* läbi viidud uuring määrava tähtsusega, kuna kinnitab, et soolestiku mikrobioomi saab kasutada soolevähi varasel tuvastamisel usaldusväärse markerina.

Varasemad uuringud on lisaks näidanud, et soolevähi patsientide väljaheidet ja koeproovid sisaldavad suurel hulgal spetsiifilisi patogeenseid baktereid, näiteks *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis*, enterotoksigeenne *Bacteroides fragilis* (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF), enteropatogeenne *Escherichia coli* (*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC) ning *Fusobacterium* perekonna esindajad (Viljoen *et al.*, 2015). Bakteriaalset biofilmi on leitud 89%-l parempoolse kolorektaalvähiga inimestel nii kasvajate pinnalt kui ka ilma kasvajateta limaskestalt ning seda seostatakse E-kadheriini ekspressiooni vähenemisega jämesoole epiteeli rakkudes, samuti põletikulise reaktsiooni tekkega ja rakujagunemise suurenemisega sooleepiteeli krüptides (Dejea *et al.*, 2014). On ka näidatud, et bakteriaalne biofilm põhjustab kudedes polüamiinide kontsentratsiooni tõusu, mida seostatakse suurenenud eukarüootse rakujagunemisega ja mis võivad potentsiaalselt vähi tekkeprotsessile kaasa aidata (Johnson *et al.*, 2015).

### **1.2.2. Mikrobioomi võimalikud mõjud soolevähi väljakujunemisele**

On välja pakutud, et soolebakterid võivad genoomi või epigenoomi mõjutada nii otseselt kui kaudselt. Kaudsed mehhanismid jagunevad üldpildis kaheks: vähki soodustava põletikulise

reaktsiooni esilekutsumine või sekundaarsete metaboliitide tootmine (Allen and Sears, 2019). Soolestiku mikrobiota elutegevuse käigus tekkivate metaboliitide kantserogeenset potentsiaali on uuritud juba aastaid. Muuhulgas on näidatud, et etanooli mikrobioloogilise lagundamise tagajärjel kuhjub soolevalendikus atsetaldehüüd, mis liigub kergesti läbi soole limaskesta rakumembraanide ja lagundab rakkudes leiduvat folaati (Homann, Tillonen and Salaspuro, 2000). Folaat on aga oluline komponent S-adenosüülmetsiooni sünteesirajas, mis osaleb metüülrühma doonorina DNA metüülatsiooni protsessis (Kim *et al.*, 1997). Sellest tulenevalt põhjustab folaadi defitsiit DNA hüpometsüülatsiooni, mis on paljude vähkide puhul iseloomulikuks tunnuseks. Samuti toob see kaasa DNA ahela katkestusi, eriti p53 tuumorsupressorgeeni järjestustes. (Kim *et al.*, 1997; Homann, Tillonen and Salaspuro, 2000) Eelmainitule lisaks on näidatud, et folaadipuudus takistab ka rottide jämesoole limaskesta rakkudes nukleotiidide väljalõikereparatsiooni normaalset toimimist (Choi *et al.*, 1998). Võimalike kantserogeensete või sooleepiteeli põletikku põhjustavate metaboliitide hulka loetakse ka näiteks bakterite toodetav vesiniksulfiid ja sekundaarsed sapphapped (Wang *et al.*, 2012).

Täpsemini on uuritud mikrobiota otsest mõju sooleepiteeli rakkude genoomile, mis võib erinevate mehhanismide kaudu viia kolorektaalvähi väljakujunemiseni. Üks enamuuritud baktereid selles vallas on *pks+* *Escherichia coli* (Allen and Sears, 2019). Sellele *E.coli* tüvele on iseloomulik *pks*-nimeline genoomne saar (*pks island*), mis kodeerib mitteribosomaalseid peptiidisüntetaase (*nonribosomal peptide synthetases*, NRPS) ja polüketiidi süntetaase (*polyketide synthetase*, PKS) ning mis omakorda võimaldavad bakteril toota genotoksiliste omadustega kolibaktiini (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). On teada, et *pks+* *E.coli* põhjustab *in vitro* inimese rakkudes DNA kaksikahela katkestusi (*double-strand breaks*, DSB), mis põhjustavad kromosomaalset ebastabiilsust ja võivad viia vähi tekkeni (Nougayrède *et al.*, 2006). Sama on selgunud ka *in vivo* katsetes: *pks+* *E.coli*-ga nakatatud hiirte jämesoole epiteeli rakkudes esines suurel hulgal histooni H2AX fosforüleeritud vormi ( $\gamma$ H2AX), mis on oluline DSB marker (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). Lisaks on näidatud, et *pks+* *E.coli* toodetava kolibaktiini toimel tekivad DNA molekulide vahel ristsidemed (*interstrand cross-links*, ICL), mis takistavad DNA kaksikahela lahtikeerdumist ja põhjustavad ATR seriin/treoniin kinaasi (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related kinase*, ATR) autofosforüülatsiooni T1989 positsioonis (Bossuet-Greif *et al.*, 2018). Autofosforüleerimise tagajärjel tekkinud ATR-i aktiivne vorm osaleb muuhulgas ICL-ide

eemaldamise protsessis, mille käigus tekivad DSB-d ja mis toob kaasa potentsiaalselt ebastabiilse DNA (Bossuet-Greif *et al.*, 2018).

### 1.3. Jämesoolevähi sõeluuringud

Kuna kolorektaalvähk kujuneb üldiselt välja pikaajaliselt, on selle varane diagnoosimine edaspidise ravi efektiivsuse tagamisel võtmetähtsusega. Soolevähi sõeluuringute (skriiningute) eesmärgiks on vähkkasvaja või selle prekursorite varane avastamine, mis võimaldaks nii haigust ennetada kui ka vajadusel varajast ravi alustada. Kvaliteetselt läbi viidud uuringud võimaldavad haiguse esinemist populatsioonis efektiivselt kontrolli all hoida (Lansdorp-Vogelaar ja von Karsa, 2012). Sõeluuringute läbiviimisega on võimalik kolorektaalvähki suremust populatsioonis 13-33% võrra vähendada (Männik *et al.*, 2014).

Sõeluuringud on suunatud neile patsientidele, kes ise on asümptomaatilised ning kelle perekonnas pole varem kolorektaalvähki, polüüpe ega põletikulist soolehaigust esinenud (Männik *et al.*, 2014). Kuigi jämesoolevähki esineb üha rohkem ka noorte hulgas (Vuik *et al.*, 2019), siis on vähki haigestumise risk üldiselt suurem just vanemaealistel ja Euroopa Liidu Nõukogu soovib sõeluuringut läbi viia 50-74-aastaste inimeste seas (Lansdorp-Vogelaar and von Karsa, 2012). Samas puudub selle küsimuse osas täielik konsensus: Euroopa Komisjoni juhendi järgi soovitatakse riiklikku skriiningprogrammi kaasata 60-64-aastased isikud, kuna selles vanusevahemikus on kolorektaalvähi esinemine ja suremus suur, kuid arvestatav osa elust alles ees (Männik *et al.*, 2014). Mujal maailmas varieerub sihtgrupi vanus veelgi: näiteks Ameerika Vähiliit (American Cancer Society, ACS) soovib keskmise riskiga patsientide puhul regulaarse skriinimisega alustada juba alates 45. eluaastast ning üle 50-aastaste hulgas on sõeluuringu korraldamine juba rangelt soovituslik (Wolf *et al.*, 2018).

Sõeluuringus kasutatavad enamlevinud skriiningmeetodid võivad olla nii invasiivsed (koloskoopia või sigmoidoskoopia) kui ka mitteinvasiivsed (väljaheitepõhised testid) (Schreuders *et al.*, 2015). Euroopa Liidu Nõukogu juhistes soovitatakse rahvastikupõhistes sõeluuringutes esmase skriinimismeetodina kasutada mitteinvasiivset peitveretesti (*fecal occult blood test*, FOBT), mis omakorda jaguneb kaheks: guajakimeetodil põhinev peitveretest (*guaiac-based fecal occult blood test*, gFOBT) ning immunokeemiline peitveretest (*immunochemical fecal occult blood test*, iFOBT või FIT) (Lansdorp-Vogelaar and von Karsa,

2012). Suuremas osas Euroopa Liidu riikides tehaksegi esmalt mitteinvasiivne peitveretest, valdavalt on kasutusel gFOBT ja sõeluuringut teostatakse 2-aastase intervalliga, positiivse peitveretesti tulemuse puhul saadetakse patsient koloskoopiasse. Osa riike kasutab esmase skriinimisvahendina ka kolonoskoopiat või sigmoidoskoopiat, Euroopas on nendeks Belgia, Poola ja Küpros (Männik *et al.*, 2014). Ka ACS toob esmaste skriinimismeetoditena välja gFOBT või FIT testid, nende soovitude järgi tuleks aga sõeluuringut teostada tihedamini ehk igal aastal (Wolf *et al.*, 2018). Peitvereteste, nende toimemehhanisme ning efektiivsust käsitletakse pikemalt peatükis 1.3.2.

### **1.3.1. Jämesoolevähi sõeluuring Eestis**

Eesti oli Euroopa riikide hulgast üks viimaseid, kus kolorektaalvähi sõeluuringut teostama hakati ([https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk\\_jamesoolevahk\\_a5\\_perearstile\\_est\\_10.06.pdf](https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk_jamesoolevahk_a5_perearstile_est_10.06.pdf)), kuid samas alustati selle protsessiga ka mujal võrdlemisi hiljuti: näiteks 2007. aasta seisuga korraldati riiklikke rahvastikupõhiseid sõeluuringuid vaid viies liikmesriigis (Soome, Prantsusmaa, Itaalia, Poola ja Ühendkuningriik) (Lansdorp-Vogelaar and von Karsa, 2012). Seitsmes riigis oli selleks ajaks olemas üldine riiklik sõeluuringuprogramm ning veel viies riigis planeeriti või viidi sel ajaperioodil läbi rahvastikupõhise sõeluuringu pilootprogrammi (Lansdorp-Vogelaar and von Karsa, 2012). Eestis alustati kolorektaalvähi sõeluuringuga 2016. aastal, kuigi ettevalmistused selleks algasid juba 2012. aastal onkoloog dr Tiit Suuroja ettepanekul. Sõeluuringus osalevad 60-69 aasta vanused ravikindlustatud mehed ja naised iga kahe aasta tagant, 2016. aastal kutsuti uuringusse 1956. aastal sündinud kohort (Joonis 2). Skriiningmeetodina kasutatakse peitveretesti ning positiivse tulemuse korral suunatakse isik edasi koloskoopiasse ([https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk\\_jamesoolevahk\\_a5\\_perearstile\\_est\\_10.06.pdf](https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk_jamesoolevahk_a5_perearstile_est_10.06.pdf)). Negatiivse leiu korral kutsutakse inimene kahe aasta pärast uuesti uuringule. Kuigi FIT kasutamine on võrreldes gFOBT-ga veidi kallim, siis on immunokeemiline meetod efektiivsem, domineerides gFOBT üle nii võidetud eluaastates kui ka skriininguga nõustuvate patsientide arvus ehk osalemismääras (Männik *et al.*, 2014). Seetõttu kasutatakse Eestis jämesoolevähi sõeluuringul just FIT peitveretesti.

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
1952					68					
1953				66		68				
1954			64		66		68			
1955		62		64		66		68		
1956	60	61	62		64		66		68	
1957		60		62		64		66		68
1958			60		62		64		66	
1959				60		62		64		66
1960					60		62		64	
1961						60		62		64
1962							60		62	
1963								60		62
1964									60	
1965										60

**Joonis 2. Eesti jämesoolevähi sõeluuringule kutsutavate kohortide skeem** ([https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk\\_jamesoolevahk\\_a5\\_perearstile\\_est\\_10.06.pdf](https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk_jamesoolevahk_a5_perearstile_est_10.06.pdf) vaadatud mai, 2024).

### 1.3.2. Peitveretestid

Nagu eelnevalt mainitud, on peitveretestid näol tegemist mitteinvasiivse skriiningmeetodiga, mis jaguneb omakorda kaheks: gFOBT ja FIT. Guajakipõhist peitveretestid hakati kolorektaalvähi varaseks tuvastamiseks kasutama juba 1970-ndatel aastatel ning see on siiani paljudes riikides põhilise skriinimisvahendina kasutusel (van Rossum *et al.*, 2008; Männik *et al.*, 2014). On näidatud, et gFOBT kasutamine vähendab sõeluuringus osalevate inimeste hulgas kolorektaalvähi suremust 14-16% (Lansdorp-Vogelaar and von Karsa, 2012). Tegu on võrdlemisi odava ning lihtsa ülesehitusega testiga, mida patsient saab ise kodustes tingimustes läbi viia. Kuna aga gFOBT tuvastab väljaheiteproovist seal sisalduvat heemi, mis on inimestel ja loomadel identne, siis pole selle testiga võimalik väljaheites sisalduvat inimverd muust (nt toidust pärit) verest eristada (Halloran, Launoy and Zappa, 2012). Valepositiivsete tulemuste ärahoidmiseks tuleb patsiendil enne testimist oma toitumist piirata ning proovid tuleb võtta

kolmest järjestikusest väljaheitest (Männik *et al.*, 2014). Samas ei muuda toitumispäärangud oluliselt gFOBTi efektiivsust ning need võivad lisaks vähendada sõeluuringu osalusmäära (Halloran, Launoy and Zappa, 2012). Peale selle võib valepositiivseid tulemusi esile kutsuda ka aspiriini ja mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite kasutamine (Moore, Derry and McQuay, 2008).

Guajakipõhiste peitveretestide toimemehhanism põhineb hemoglobiini heemikomponendi pseudoperoksüdaassel aktiivsusel: guajakivaiguga immutatud testpaber (kaart) värvub positiivse tulemuse korral siniseks (Halloran, Launoy and Zappa, 2012; Männik *et al.*, 2014). Värvusreaktsiooni toimumist kontrollitakse visuaalselt: patsiendi väljaheiteprooviga paberi teisele küljele tilgutatakse vesinikperoksiidi alkoholilahust ning seejärel jälgitakse kindla aja möödumisel (sõltuvalt tootjast umbes 30-60 sekundi jooksul) sinise värvuse tekkimist. Kuna reaktsiooni käigus tekkiv värv on aga ebastabiilne, viib testi liiga hiline lugemine valenegatiivsete tulemusteni (Halloran, Launoy and Zappa, 2012). Testi analüütiline tundlikkus sõltub tootjast, kuid jääb üldiselt vahemikku 0,3 - 6 mg Hb/g (mg hemoglobiini 1g väljaheites) (Männik *et al.*, 2014).

Immunokeemilised peitveretestid tuvastavad sarnaselt gFOBT-iga väljaheitest hemoglobiini, kuid erinevalt guajakipõhisest meetodist on FIT abil võimalik väljaheiteproovist tuvastada spetsiifiliselt inimverd (van Rossum *et al.*, 2008). Nende toimemehhanism põhineb antikehadel, mis seonduvad inimese globiiniga ning seetõttu ei sõltu testi tulemus patsiendi toitumisharjumustest ega ka ravimikasutusest (Allison, 2005). Erinevalt heemist laguneb globiin seedeelundkonna ülemistes osades proteolüütiliste ensüümide toimel, mistõttu on FIT test just soolestiku alumiste osade veritsemise suhtes eriti tundlik (Halloran, Launoy and Zappa, 2012). Testi jaoks on vaja ainult ühte või kahte väljaheiteproovi, mistõttu on selle läbiviimine patsiendile mugavam kui gFOBT puhul. FIT testide eeliseks on ka võimalus proovi automatiseeritult analüüsida, samuti saab kvantitatiivsete testide puhul muuta nende referentsväärtusi, mis võib kohalikke olusid arvestades vajalikuks osutada (Männik *et al.*, 2014). FIT testide kõige tihedamini kasutatud referentsväärtused on 75 või 100 ng/ml (nanogrammi globiini milliliitris) ning nende mõõtmisvahemikud jäävad 14-1050 ng/ml juurde (kvantitatiivsete testide puhul). Kvalitatiivsete testide puhul, mille referentsväärtusi muuta ei saa, näitab test positiivset tulemust, kui globiini kontsentratsioon on kindlasti väärtusest suurem, nt >

20 ng/ml (Männik *et al.*, 2014). FIT suuremat tundlikkust võrreldes gFOBT-ga on näidatud mitmes uuringus ning see on tunduvalt efektiivsem kaugelearenenud adenoomide tuvastamisel (Dancourt *et al.*, 2008; van Rossum *et al.*, 2008; Faivre *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Peitveretestist mikroobide analüüs

Kuigi peitveretestid on välja töötatud väljaheites sisalduva vere tuvastamiseks, saab neist eraldada ka inimese DNA-d ning kasutada seda võimalike kolorektaalvähile viitavate molekulaarsete markerite uurimiseks (Rennert *et al.*, 2007; Battaglia *et al.*, 2014). Kuna mikrobiomi roll inimese tervises ja kolorektaalvähi kujunemisel on üha suurema tähelepanu all, on uuritud ka võimalusi patsiendi väljaheitest bakteriaalse DNA eraldamiseks. 2017. aastal näidati, et gFOBT kaartidelt eraldatud bakteriaalse DNA amplifitseerimisel ja analüüsimisel saadud tulemused on arvestatavas vastavuses sama patsiendi värskest väljaheiteproovist eraldatud materjaliga (Taylor *et al.*, 2017). Ka väljaheiteproovide erinevate säilitusviiside võrdluses on selgunud, et peitveretestidest eraldatav materjal sobib mikrobioloogilisteks uuringuteks, isegi kui proov seisab 4-7 päeva toatemperatuuril (Byrd *et al.*, 2019, 2020; Moossavi *et al.*, 2019). Tänapäevaste mikrobioloogiliste uuringute puhul kasutatakse 16S rRNA sekveneerimist, kus saadud geneetilise järjestuse alusel määratakse mikroobide liigiline koosseis ja mitmekesisus (Goodrich *et al.*, 2014). Peitveretestidest bakteriaalse DNA eraldamiseks on varasemates uuringutes kasutatud erinevaid kitte, näiteks PowerLyzer PowerSoil DNA *Isolation Kit* (Wang *et al.*, 2018), PowerMag *soil DNA isolation kit* (Byrd *et al.*, 2020), PowerSoil-htp 96 *Well Soil DNA isolation kit* (Baxter *et al.*, 2016) ja PowerSoil DNA *isolation kit* (Byrd *et al.*, 2019). Eestis kasutusel olevad FIT peitvere testidest (QuikRead® iFOB Sampling Set, Aidian, Espoo, Finland) võiks lisaks peitvere testile analüüsida ka mikroobikoosluseid, et võimalusel parandada jämesoolevähi diagnostikat. Kas ja kuidas oleks võimalik mikroobset DNAd nendest proovidest kõige efektiivsemalt kätte saada, pole aga veel uuritud.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

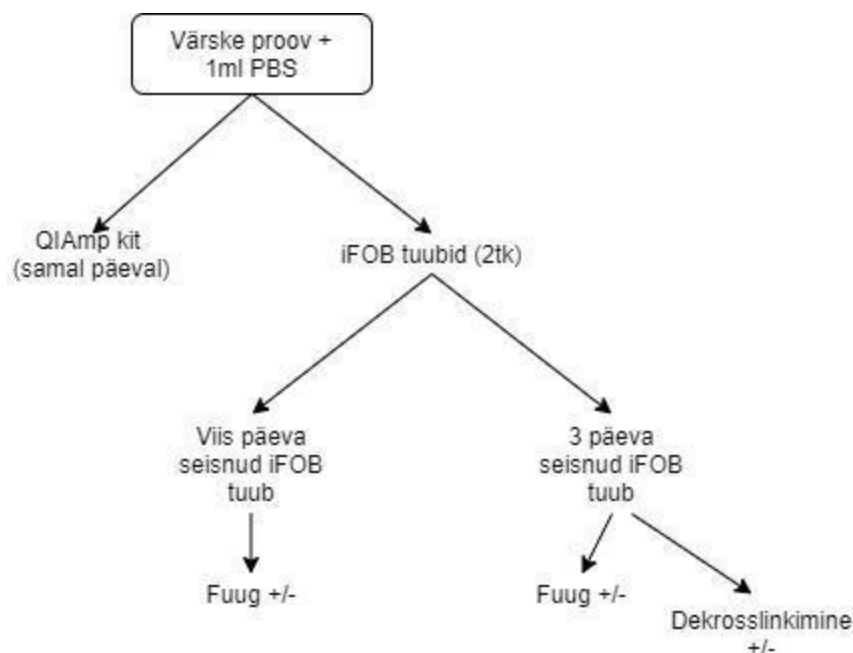
Eksperimentide eesmärgiks oli välja selgitada, kas Eestis käimasolevas soolevähi sõeluuringus kasutatavatest immunokeemilistest peitveretest (FIT) ehk iFOB tuubidest (QuikRead® iFOB Sampling Set, Aidian, Espoo, Finland) on võimalik bakteriaalset DNA-d eraldada ning ka mikroobikooslust määrata.

Töö alameesmärgid on järgnevad:

1. Hinnata, kas iFOB tuubist on võimalik tuvastada DNAd pärast proovide hoiustamist toatemperatuuril 3-5 päeva;
2. Hinnata, kas proovide tsentrifuugimine parandab iFOB tuubist eraldatava DNA saagist;
3. Hinnata, kas dekrosslinkimise sammu lisamine protokollile parandab iFOB tuubist eraldatava DNA saagist;
4. Hinnata, kas iFOB tuubidest on võimalik mikroobikooslust määrata 16S RNA geeni V3-V4 piirkonna sekveneerimise meetodil.

### **2.2. Materjal ja meetodika**

Antud töö puhul oli tegemist pilootkatsega, eesmärgiga leida parim meetod bakteriaalse koosluse tuvastamiseks peitveretest proovist. Uuringus kasutati ühe doonori väljaheiteproove. Ühes proovist külmutati tükk väljaheiteproovi -20C juures ilma tötluseta (mikrobioomi valdkonna kuldne standard). Samuti võeti osa väljaheite proovist peitvere testi tuubi. Töö tegemiseks kasutati DNA eraldamise komplekti QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Saksamaa, katalooginumber 51604). Töötlemata (värske) väljaheiteproovist DNA eraldamiseks järgiti kitiga kaasas olnud standardprotokolli. Peitveretest tuubide puhul kasutati sama protokolli, mida oli osaliselt modifitseeritud. Eksperimentide ülesehitus on skemaatiliselt näidatud Joonisel 3.



**Joonis 3. Katseskeem.**

### 2.2.1. Proovide ettevalmistamine

iFOB tuubidest bakteriaalse DNA eraldamise katsetes kasutatud väljaheiteproov koguti ühelt doonorilt. Väljaheide ei olnud veega kokku puutunud ning sellest proovi võtmiseks kasutati steriilset ühekordset skalpelli, mille pakend avati vahetult enne kasutamist. Proov võeti kohe (umbkaudu 10 sekundi jooksul) üles 1 ml PBS lahuses ning seda hoiti kuni laborisse toimetamiseni paar tundi sügavkülmas. Proovi jõudmine laborisse võttis aega umbkaudu 20 minutit. Kogutud proovi täpne kaal oli teadmata. Laboris segati proov korralikult Vortexi masinal ning seejärel tsentrifuugiti tuubi paar sekundit täispöoretel (13 000 rpm). Supernatandist pipeteeriti 200 µl uude 2ml mikrotsentrifuugi tuubi ning sellega viidi kohe läbi QIAamp kitiga kaasas olnud protokollil alusel DNA eraldamine. 200 µl supernatanti lisati veel ka kahte iFOB tuubi, mis jäeti vastavalt kolmeks ja viieks päevaks toatemperatuurile seisma. Proovid jäeti toatemperatuurile seisma selleks, et jälgida võimalikult sarnaselt jämesoolevähi sõeluuringu proovide võtmist, kus peitvere testimiseks võetakse proovid kodus ning saadetakse tavapostiga laborisse testimiseks, mis võib keskmiselt võtta 3-5 päeva.

### **2.2.2. DNA eraldamine standardprotokolli järgi**

QIAamp kiti standardprotokolli järgi eraldati DNA-d värskest väljaheiteproovist ning seda prooviti mõlema katseseeria puhul kasutada ka kolm päeva seisnud iFOB tuubist DNA eraldamiseks. Värske proovi puhul alustati 200 µl materjaliga ning negatiivse kontrollina kasutati 200 µl PBS-i. Kolmepäevasest peitveretestist tuubist võeti enne kitiprotokolliga alustamist 367 µl lahust. Katsete tulemused on välja toodud **Tabelites 1 ja 2**.

### **2.2.3. DNA eraldamine iFOB tuubidest**

Nii kolm päeva kui ka viis päeva seisnud peitveretestist tuubidest DNA eraldamiseks kasutati QIAamp protokollid, mida oli osaliselt modifitseeritud. Kuna iFOB tuubides kasutatav lahus sisaldab formaldehüüdi, mis loob DNA molekulide ja valkude vahele ristsidemed ja muudab selle eraldamise ja analüüsimise keerukamaks, siis kasutati modifitseeritud protokollis enne DNA eraldamist lisaetappidena formaldehüüdi neutraliseerimist ja ristsidemete tagasipööramist.

Peitveretestist tuubidega tehtud eksperimentide alguses loksutati iFOB tuubi ning selle sisu kanti ümber mikrotsentrifuugi tuubi. Seejärel pipeteeriti 367 µl proovi sisaldavat lahust kahte tühja 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi. Üht 1,5 ml tuubi tsentrifuugiti täispööretel 1 minut, supernatant eemaldati ja sade võeti üles 200 µl isevalmistatud lüüsilahuses (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS). Teist tuubi ei tsentrifuugitud, vaid sellele lisati 367 µl sama koostisega, aga kahekordsete kontsentratsioonidega lüüsilahust (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 2% SDS). Lüüsilahuses kasutati formaldehüüdi neutraliseerimiseks Tris-HCl-i, kuna on näidatud, et Tris toimib antud protsessis mitu korda efektiivsemalt kui sagedamini kasutatav glütsiin (Sutherland, Toews and Kast, 2008). Kahe prooviga töötamise eesmärgiks oli kontrollida, kas lahusest sadestuvad tsentrifuugimise tagajärjel välja terved rakud või on need iFOB tuubis juba lüüsunud ning bakteriaalne DNA jääb supernatanti. Järgnevalt pandi tuubid 5 minutiks 95 kraadi juurde termostaati. Inkubatsiooni lõppedes lisati mahajahtunud tuubidesse 15 µl proteinaas K-d ja pandi need 4 tunniks 65 kraadi juurde inkubeerima. Pärast 4-tunnist inkubatsiooni lisati varasemalt tsentrifuugitud ja 200 µl lüüsilahuses üles võetud proovile 200 µl kitiga kaasas olnud AL puhvrit. Fuugimata proovi oli koguseliselt kokku 734 µl, nii et sellesse tuubi lisati ka samaväärne kogus puhvrit AL. Pärast seda mindi edasi QIAamp standardprotokolliga ning lisati proovidele etanooli (protokollis punkt 9). Fuugitud tuubi pipeteeriti 200 µl 96% etanooli,

fuugimata proovile lisati 734 µl etanooli. QIAamp kiti standardprotokolli järgiti kuni katse lõpuni. Nii kolme- kui viiepäevaste iFOB tuubidega tehtud katsete tulemused on välja toodud Tabelites 1 ja 2.

#### **2.3.4. Sekveneerimine ja andmete töötlus**

Iga proovi bakterikooslus määrati bakteriaalse DNA 16S rRNA geeni V3-V4 piirkonna sekveneerimise meetodil. Sekveneerimine teostati Tartu Ülikooli Geenivaramu tuumiklaboris Illumina MiSeq sekvenaatoriga. Sekventside edasine töötlemine ja analüüsimine viidi läbi Qiime2 platvormil (versioon 2019.7) (Bolyen *et al.*, 2019). Toored lugemid demultipleksiti (*demultiplexing*) ning seejärel kasutati nende kvaliteedi kontrollimiseks DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) funktsiooni, mis lisaks lugemite korrastamisele (*denoising*) klasterdab need sarnasuse alusel ka taksonoomilisteks ühikuteks (*operational taxonomic unit*, OTU) (Callahan *et al.*, 2016). Demultipleksimise tulemused visualiseeriti veebilehel [view.qiime2.org](http://view.qiime2.org) ja nende põhjal valiti DADA2 funktsiooni parameetrid: `--p-trim-left-f 15; --p-trim-left-r 13; --p-trunc-len-f 250; p-trunc-len-r 250`. Parameetri `--p-n-threads` väärtuseks valiti bioinformaatika juhtivteaduri soovitusel 20. DADA2 funktsiooni tulemusel saadud OTUde tabeli ning representatiivsete lugemite (*representative sequences*) alusel teostati andmetega taksonoomiline analüüs, kasutades selleks Kreete Lüll-i loodud SILVA132 V3-V4 piirkonna lugemitele spetsialiseeritud klassifitseerijat. Taksonoomilise info hulgast eemaldati *singletonid* ehk OTU-d, mida esines ainult üks kord, ning andmed visualiseeriti Qiime2 veebilehel. Qiime2-st saadud taksonoomilised andmed imporditi ka statistikaprogrammi R, kus nende töötlemiseks kasutati mikrobioloogilise info analüüsimiseks mõeldud *phyloseq* paketti (McMurdie and Holmes, 2013).

### **3.3. Tulemused**

#### **3.3.1 DNA eraldamine**

Töö üheks eesmärgiks oli kontrollida, kas iFOB ehk FIT tuubidest on võimalik mikroobset DNA-d eraldada ning samuti teha kindlaks, kas tsentrifuugimine ja dekkrosslinkimine mõjutavad kättesaadava DNA hulka. DNA kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati täpsuse huvides Qubiti fluoromeetrit (Qubit® 2.0 Fluorometre, Invitrogen, Grand Island, USA).

Katseseeria esimesel päeval prooviti värskest proovist QIAamp kitiga eraldatud DNA kontsentratsiooni mõõta ka Thermo Scientific™ NanoDrop™ One spektrofotomeetriga, aga kuna nukleiinhappe kontsentratsioonid olid väga madalad, ei suutnud Nanodrop seda tuvastada.

Proovidest eraldatud DNA kontsentratsioonid varieeruvad kohati üsna drastiliselt (näiteks esimeses katseseerias on kolm päeva seisnud iFOB tuubi DNA kontsentratsioon isegi kõrgem kui värskel proovi puhul), tõenäoliselt tuleneb see sellest, et katses kasutatava väljaheiteproovi täpne kaal oli teadmata, samuti võib tegu olla pisivigadega katse läbiviimisel. Sellegipoolest näitasid katsed, et ilma dekrosslinkimise sammuta on peitveretestit tuubidest kiti protokolliga eraldatud DNA hulk väga väike või üldse mitte tuvastatav. See annab kinnitust, et iFOB tuubidest bakteriaalse DNA eraldamise edukus sõltub tugevalt dekrosslinkimise sammust.

Töös sooviti ka kontrollida, kas tsentrifuugitud proovide DNA kontsentratsioon erineb tsentrifuugimata proovidest. Katsetulemused näitavad, et tsentrifuugitud proovide DNA kontsentratsioonid on madalamad kui tsentrifuugimata proovidel. Sellest saab järeldada, et iFOB tuubis olev lahus lüüsib küll seal leiduvaid bakterirakke, ent osa rakke jääb siiski terveks ning sadestub pärast tsentrifuugimist koos tahke materjaliga, mistõttu on ka supernatanti jääva DNA kontsentratsioon madalam kui fuugimata proovidel.

2019. aasta augustikuus tehtud korduskatsete käigus eraldatud DNA kontsentratsioone mõõdeti samuti Qubiti masinaga ning need tulemused on esitatud Tabelis 2. Korduskatsete käigus võeti samalt doonorilt uus väljaheiteproov, kogumise protseduur ning proovi laborisse toimetamine toimus täpselt samamoodi nagu esimese katseseeria puhul. Korduskatsete eesmärk oli kontrollida, kas tulemused on üldjoontes samad ehk saada kindlust, et pilootkatse tulemused polnud juhuslikud ning bakteriaalse DNA eraldamise protokoll toimib.

**Tabel 1.** DNA kontsentratsioonid esimese katseseeria proovides (Algproov 1).

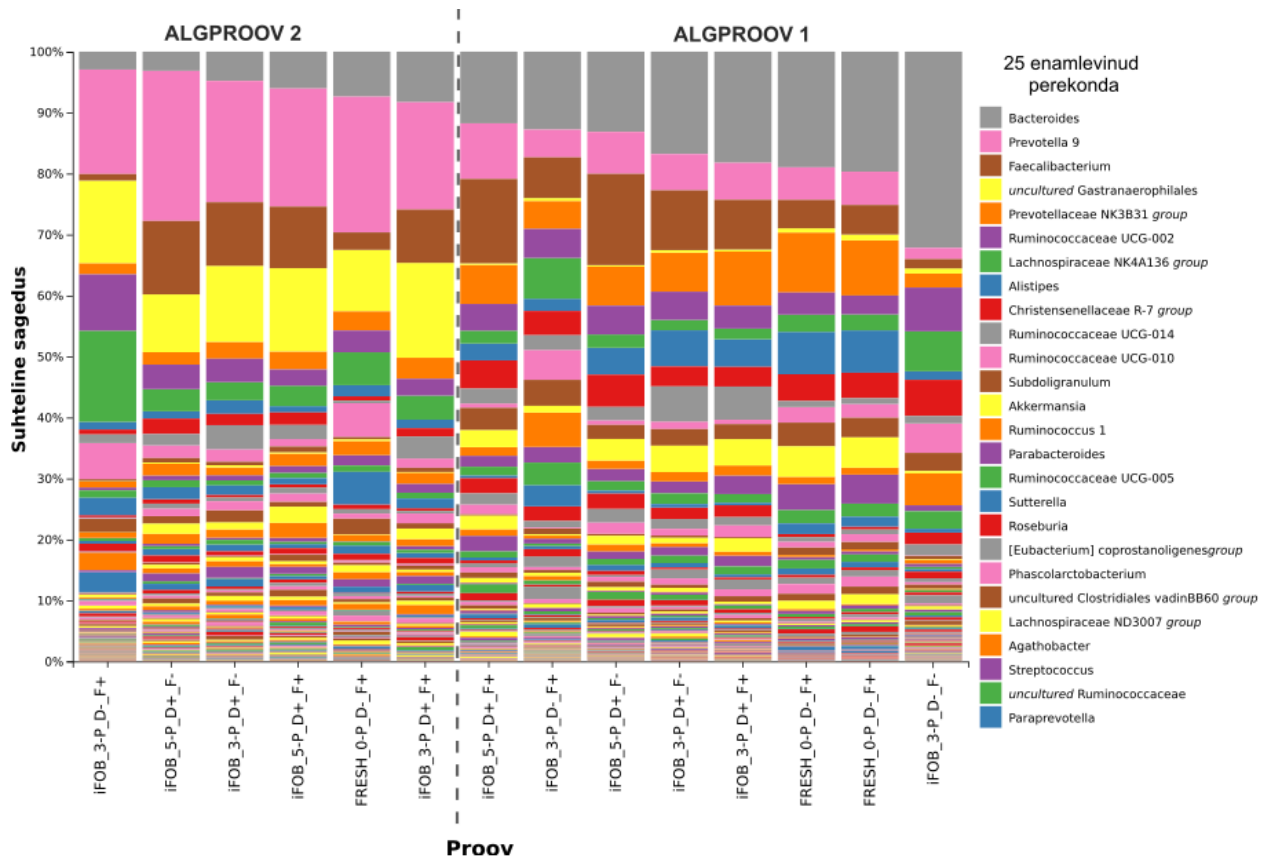
Proovi tüüp	Päev alates kogumise hetkest	Dekrosslinkimine	Tsentrifuug	DNA kontsentratsioon (ng/uL)
Negatiivne kontroll	0	-	+	0.5
Fresh	0	-	+	7.74
Fresh	0	-	+	12.7
iFOB	3	-	+	0.55
iFOB	3	-	-	0.91
iFOB	3	+	+	12.5
iFOB	3	+	-	11.2
iFOB	5	+	-	0.597
iFOB	5	+	+	0.86

**Tabel 2.** DNA kontsentratsioonid teise katseseeria proovides (Algproov 2).

Proovi tüüp	Päev alates kogumise hetkest	Dekrosslinkimine	Tsentrifuug	DNA kontsentratsioon (ng/uL)
Fresh	0	-	+	2.57
iFOB	3	-	+	ei tuvastatud
iFOB	3	+	+	0.496
iFOB	3	+	-	0.882
iFOB	5	+	+	0.358
iFOB	5	+	-	0.415

### 3.3.2. Mikroobikoosluste analüüs

16S rRNA geeni V3-V4 piirkonna sekveneerimise meetodi abil teostati eraldatud DNA proovidele mikroobikoosluste analüüs. Proovides esinenud bakteriperekonnad on visualiseeritud joonisel number 4. Jooniselt on võimalik näha, et kõikidest proovidest suudeti mikroobikooslus tuvastada (Joonis 4).



**Joonis 4. Tuvastatud bakteriperekonnad proovide kaupa.** “Fresh” - värske proov; “iFOB” - peitvere testi tuubis olnud proov; “P” - päevad toatemperatuuril; “D” - dekkrosslinkimine, “F” - tsentrifugimine, “+” - tehti, “-” - ei tehtud.

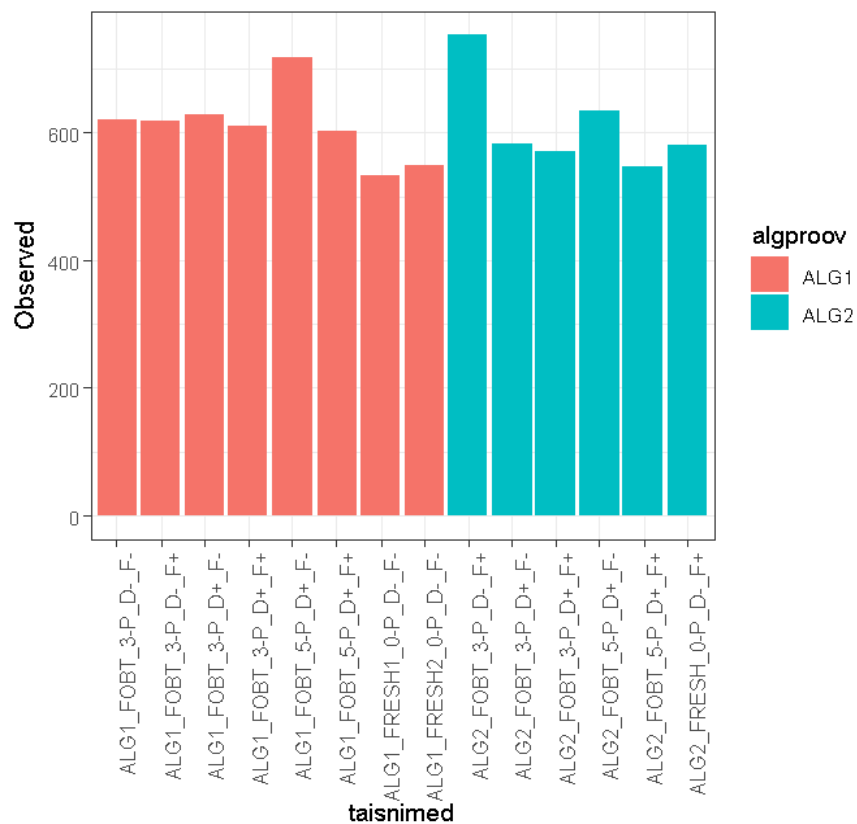
Tulemustest järeldus, et esimese katseseeria proovides esines kõige enam järgmiseid bakteriperekondi ja sugukondi (kahanevas järjekorras): *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotellaceae* NK3B31, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae*, *Alistipes*, *Christensenellaceae* R-7, *Akkermansia*, *Lachnospiraceae*, *Subdoligranulum*.

Teise katseseeria proovides esines kõige enam järgmiseid bakteriperekondi ja sugukondi (kahanevas järjekorras): *Prevotella 9*, *Gastranaerophilales (Cyanobacteria)*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* NKA136, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Ruminococcaceae* UCG-010, *Prevotellaceae* NK3B31, *Sutterella*, *Ruminococcaceae* UCG-014.

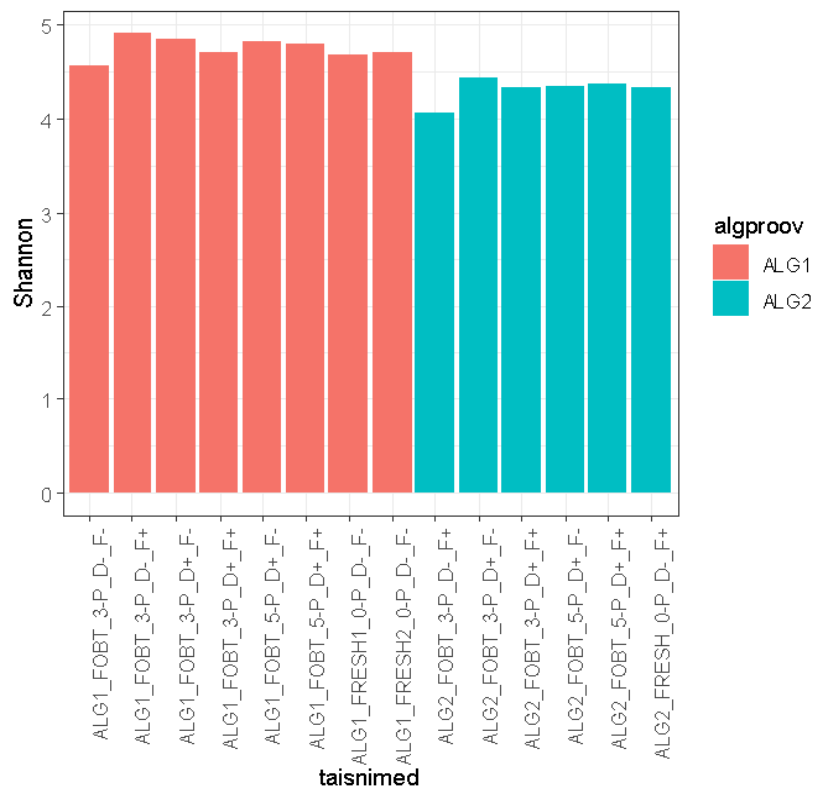
Andmete visualiseerimine näitas, et kui iFOB proovidega on ka dekkrosslinkimine läbi viidud, siis ei esine taksonoomilises koosseisus värske proovi ja iFOB tuubide vahel silmatorkavaid vaadeldavaid erinevusi. See kinnitab, et dekkrosslinkimise samm on määrava tähtsusega peitveretesti tuubist värsele proovile võimalikult ligilähedase tulemuse saamiseks. Ka korduskatsete taksonoomilise info visualiseerimine näitas, et värske proovi bakterikooslusest erines kõige rohkem peitveretesti proov, millega polnud enne DNA eraldamist dekkrosslinkimist läbi viidud.

Qiime2-st saadud taksonoomiliste andmete tulemuste põhjal hinnati programmiga R ka iga proovi bakterikoosluse alfamitmekesisust, mis näitab koosluse liigirikkust ning erinevate taksonoomiliste rühmade jaotuvust (Willis, 2019). Jooniselt 5 nähtub, et mõlema katseseeria proovide liigirikkus ehk nendes leidunud OTU-de hulk on võrdlemisi sarnane, mistõttu saab järeldada, et iFOB tuubidest eraldatud bakterikooslus ei erine vähemalt bakterirühmade hulga poolest eriliselt värsest väljaheiteproovist.

Selleks, et hinnata bakterikoosluse suhtelist mitmekesisust igas proovis, kasutati Shannoni indeksi. Kui Shannoni indeks on erinevate proovide bakterikoosluste vahel sarnane, näitab see, et need kooslused on oma mitmekesisuselt samuti sarnased (Jost, 2006). Joonisel 6 on näidatud Shannoni indeksi väärtus igas proovis ning sellelt nähtub, et kõigi proovide bakterikooslus on sarnase mitmekesisusega. Seetõttu saab järeldada, et iFOB tuubidest eraldatud bakterikoosluse liigiline koosseis on sarnane värse väljaheiteprooviga ning selle põhjal saab mikrobioomi kohta adekvaatseid järeldusi teha.



**Joonis 5. Proovides leidunud vaadeldud OTUde arv (*Observed*).** ALG1 tähistab esimese katseseeria proove ning ALG2 tähistab teise katseseeria proove. “Fresh” - värske proov; “FOBT” - peitvere testi tuubis olnud proov; “P” - päevad toatemperatuuril; “D” - dekkrosslinkimine, “F” - tsentrifuugimine, “+” - tehti, “-” - ei tehtud.



**Joonis 6. Proovide bakterikoosluste Shannoni mitmekesisuse indeks.** ALG1 tähistab esimese katseseeria proove ning ALG2 tähistab teise katseseeria proove. “Fresh” - värske proov; “FOBT” - peitvere testi tuubis olnud proov; “P” - päevad toatemperatuuril; “D” - dekrosslinkimine, “F” - tsentrifuugimine, “+” - tehti, “-” - ei tehtud.

### 3.4. Arutelu

Kolorektaalvähk on maailmas üks enamlevinud vähivorme ning üldiselt seostatakse seda kõrge vanuse ning lääneliku elustiiliga (Slattery *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2017). Viimasel ajal on vähi esinemine aga suurenenud just nooremate inimeste seas (Vuik *et al.*, 2019). Seetõttu on jätkuvalt oluline kolorektaalvähki võimalikult vara avastada, vajadusel ennetada ja varases staadiumis ravida. Soolevähi ennetamiseks ja varaseks avastamiseks kasutatakse sõeluuringuid, milles kasutatakse lisaks koloskoopiale ja sigmoidoskoopiale ka peitvereteste (Männik *et al.*, 2014). Kuigi FIT kasutamine on võrreldes gFOBT-ga veidi kallim, siis on immunokeemiline meetod efektiivsem ning seetõttu kasutatakse seda ka Eesti jämesoolevähi sõeluuringus (Männik *et al.*, 2014). Lisaks sõeluuringutele on viimastel aastatel näidatud ka mikrobioomi olulisi seoseid

soolevähi tekkega (Rubinstein *et al.*, 2013; Zeller *et al.*, 2014; Wirbel *et al.*, 2019). Wirbel *et al.* läbi viidud meta-analüüs tuvastas 29 bakteriliigist koosneva tuumikkoosluse, mida saab kasutada usalusväärse markerina kolorektaalvähi tuvastamisel, mis on määrava tähtsusega edasistes soolevähi uuringutes ja annab kinnitust, et soolestikubakterite koosseisu saab vähi varaseks tuvastamiseks kasutada (Wirbel *et al.*, 2019).

Antud töö soovis anda ülevaate mikrobioomi potentsiaalsest rollist soolevähi väljakujunemisel ning uurida, kas Eestis käimasolevas kolorektaalvähi sõeluuringus kasutatavast peitveretestit tuubist on võimalik ka mikroobset DNA-d eraldada ja sekveneerimise teel ka mikroobikooslus määrata. Kuna on ulatuslikke tõendeid mikrobioomi seostest vähi tekkeprotsessiga, on bakterikoosluse analüüs oluline, et soolevähki varases staadiumis avastada ning selle edasist progresseerumist peatada. Praegu peab soolevähi sõeluuringus osalev patsient andma nii peitveretestit kui ka väljaheiteproovi, et tema mikrobioomi analüüsida saaks. Kui peitveretestit tuubist saaks kvaliteetset mikroobset DNA-d eraldada, muudaks see tulevikus patsiendil proovi andmise oluliselt lihtsamaks, kuna tal tuleks anda ainult üks proov ja sellest saaks tuvastada nii peitverd kui ka uurida mikrobioomi.

Töö eksperimentaalses osas läbi viidud kaks katseseeriat ühe ja sama doonori prooviga näitasid, et peitveretestit tuubist on võimalik kitiga eraldada bakteriaalset DNA-d, kui kiti standardprotokollile on lisatud ka 4-tunnine inkubatsioonitapp. Inkubatsiooni käigus lõhutakse DNA ja valkude vahelised ristsidemed, mis takistaksid muidu bakteriaalse DNA efektiivset eraldamist. Samuti näitasid katsed, et proovide tsentrifugimine enne DNA eraldamist vähendab kättesaadava DNA hulka, millest saab järeldada, et osa baktereid sadestub muu tahke materjaliga ning supernatanti jääva DNA hulk on väiksem kui fuugimata proovidel.

16S rRNA geeni põhjal tehtud bakterite-arhede sekveneerimise andmeanalüüs näitas, et esimese katseseeria proovides esines kõige enam *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotellaceae* NK3B31, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae*, *Alistipes*, *Christensenellaceae* R-7, *Akkermansia*, *Lachnospiraceae* ja *Subdoligranulum* bakteriperekondi ja sugukondi (kahanevas järjekorras). Teise katseseeria proovides esines kõige enam *Prevotella* 9, *Gastranaerophilales* (*Cyanobacteria*), *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* NKA136, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Ruminococcaceae* UCG-010, *Prevotellaceae* NK3B31, *Sutterella* ning *Ruminococcaceae* UCG-014 bakteriperekondi ja sugukondi (kahanevas järjekorras).

Taksonoomilise koosseisu alfamitmekesisust iseloomustav Shannoni indeks oli erinevate proovide vahel sarnane, mistõttu saab järeldada, et proovid on omavahel adekvaatselt võrreldavad ja iFOB testidest eraldatud bakterikooslus sarnaneb värske prooviga.

Töö tulemused näitavad, et modifitseeritud protokolliga on võimalik iFOB peitveretestidest tuubist bakteriaalset DNA-d eraldada ning ka bakterikooslus määrata, kasutades selleks 16S rRNA geeni V3-V4 piirkonna sekveneerimist. Tegu oli pilootkatsega, kus kasutati ühelt doonorilt kogutud proovi, mille täpne kaal oli teadmata. Edasises uurimistöös tuleks proove koguda suuremalt hulgalt inimestelt ja katsed läbi viia täpsemalt kontrollitud tingimustes.

## KOKKUVÕTE

Kolorektaal- ehk jämesoolevähk on maailmas laialt levinud kõrge suremusega vähivorm, mille varaseks tuvastamiseks ning efektiivseks ravimiseks viiakse läbi sõeluuringuid ehk skriininguid. Eestis kasutatakse jämesoolevähi esmaseks tuvastamiseks nii invasiivseid (koloskoopia ja sigmoidoskoopia) kui ka mitteinvasiivseid meetodeid. Mitteinvasiivsetest meetoditest kasutatakse sõeluuringutes peitvere teste, kus patsiendi väljaheitest on võimalik juba väga väikeses koguses verd tuvastada. Arvukad uuringud on näidanud, et jämesoolevähki põdevatel inimeste soole mikroobikooslus erineb tervete inimeste omast märkimisväärselt ning nende väljaheiteproovidest on tuvastatud bakteriperekondi ja -liike, mida tervetel inimeste proovides üldiselt ei esinegi. See annab põhjust järeldada, et soole mikrobioomi analüüsimine on oluline etapp jämesoolevähi varase tuvastamise protsessis. Tulevikus võiks eelistatult ühest ja samast peitvere testist eraldada nii mikrobiaalset DNA-d kui ka peitverd, kuid kuna testtubides sisalduva lahuse üheks komponendiks on formaldehüüd, mis loob DNA molekulide ja valkude vahele ristsidemed, on selle sekveneerimine raskendatud või hoopis võimatu.

Antud töös püüti välja selgitada, kas peitvere testi tuubidest on võimalik mikroobikoosluse DNAd eraldada ning sekveneerida, kui selle jaoks kasutada modifitseeritud DNA eraldamise protokoll. Mikroobikooslused määrati 16S rRNA geeni V3–V4 piirkondade sekveneerimise teel. Katsete käigus selgus, et mikrobiaalse DNA eraldamine ning sekveneerimine on võimalik, kui peitvere testi tuubidega viiakse lisaks tavaprotokollile läbi Tris-HCl-ga dekkrosslinkimine. Kuna katsetes kasutati vaid ühe inimese väljaheiteproovi, siis tulevikus oleks vaja katsetesse kaasata suurem valim, et proovidest tuvastatud mikroobiperekondade ja -liikide kohta saaks teha statistiliselt olulisi järeldusi.

## RESÜMEE / SUMMARY

### **Possibilities for microbiome analysis from fecal occult blood tests used in the screening of colorectal cancer in Estonia**

Johanna Toodu

Summary

Colorectal cancer (colon cancer) is a globally widespread form of cancer with a high rate of mortality. Cancer screening programs are carried out in order to diagnose and treat the cancer effectively at an early stage. In the Estonian colorectal cancer screening program, both invasive (colonoscopy, sigmoidoscopy) and non-invasive methods are used for the initial detection of cancer. As for non-invasive methods, the screening program uses fecal occult blood tests. These tests help detect even the smallest amounts of blood in a patient's stool, and if needed, the patient will be referred for a colonoscopy for further analysis. A significant amount of research has shown that the intestinal microbial community of colorectal cancer patients differs significantly from that of healthy individuals. The stool samples of these people contain specific genera and species of bacteria, which are usually not detected in the stool of healthy individuals. That gives reason to assume that microbiome analysis is an important step in the process of early detection of colorectal cancer. In the future, it would be helpful if both occult blood and microbial DNA could be detected and analysed using the same fecal occult blood test tube, but since the solution in the test tubes contains formaldehyde, which creates cross-links between DNA molecules and proteins, the sequencing of the genetic material may be difficult. The purpose of this study was to find out if it was possible to extract and sequence microbial DNA from a fecal occult blood test tube if a modified extraction protocol was used. The experiments showed that the analysis of microbial DNA was possible if a de-crosslinking step with Tris-HCl was added to the standard protocol of DNA extraction. Since the experiments conducted in this study only used one person's stool sample, a larger sample size should be included in further studies in order to achieve statistically significant results about the genera and species of bacteria found in the stool samples.

## KIRJANDUSE LOETELU

Ahlquist, T. *et al.* (2008) ‘RAS signaling in colorectal carcinomas through alteration of RAS, RAF, NF1, and/or RASSF1A’, *Neoplasia (New York, N.Y.)*. Neoplasia Press Inc., 10(7), pp. 680–686. doi: 10.1593/neo.08312.

Al-Tassan, N. *et al.* (2002) ‘Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors’, *Nature Genetics*, 30(2), pp. 227–232. doi: 10.1038/ng828.

Allen, J. and Sears, C. L. (2019) ‘Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development’, *Genome medicine*. BioMed Central, 11(1), p. 11. doi: 10.1186/s13073-019-0621-2.

Allison, J. E. (2005) ‘Colon Cancer Screening Guidelines 2005: The Fecal Occult Blood Test Option Has Become a Better FIT’, *Gastroenterology*, 129(2), pp. 745–748. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.034>.

Arnold, M. *et al.* (2017) ‘Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality’, *Gut*, 66(4), pp. 683 LP – 691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.

Baas, A. F. *et al.* (2004) ‘Complete Polarization of Single Intestinal Epithelial Cells upon Activation of LKB1 by STRAD’, *Cell*, 116(3), pp. 457–466. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00114-X).

Bäckhed, F. *et al.* (2004) ‘The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp. 15718 LP – 15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101.

Bardhan, K. and Liu, K. (2013) ‘Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis’, *Cancers* . doi: 10.3390/cancers5020676.

Battaglia, P. *et al.* (2014) ‘KRAS Mutations and M2PK Upregulation in Stool Samples from Individuals with Positive Fecal Occult Blood Tests Screened for Colorectal Cancer’, *Tumori Journal*. SAGE Publications Ltd STM, 100(2), pp. 122–127. doi: 10.1177/030089161410000202.

Baxter, N. T. *et al.* (2016) ‘DNA from fecal immunochemical test can replace stool for detection of colonic lesions using a microbiota-based model’, *Microbiome*. BioMed Central, 4(1), p. 59. doi: 10.1186/s40168-016-0205-y.

Beggs, A. D. *et al.* (2010) ‘Peutz–Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management’, *Gut*, 59(7), pp. 975 LP – 986. doi: 10.1136/gut.2009.198499.

Bingham, S. A., Hughes, R. and Cross, A. J. (2002) ‘Effect of White Versus Red Meat on Endogenous N-Nitrosation in the Human Colon and Further Evidence of a Dose Response’, *The Journal of Nutrition*, 132(11), pp. 3522S–3525S. doi: 10.1093/jn/132.11.3522S.

Bolyen, E. *et al.* (2019) ‘Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2’, *Nature Biotechnology*, 37(8), pp. 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.

Bossuet-Greif, N. *et al.* (2018) ‘The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand

Cross-Links in Infected Cells', *mBio*. American Society for Microbiology, 9(2), pp. e02393-17. doi: 10.1128/mBio.02393-17.

Botteri, E. *et al.* (2008) 'Smoking and Colorectal Cancer: A Meta-analysis', *JAMA*, 300(23), pp. 2765–2778. doi: 10.1001/jama.2008.839.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 68(6), pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

Byrd, D. A. *et al.* (2019) 'Reproducibility, stability, and accuracy of microbial profiles by fecal sample collection method in three distinct populations', *PloS one*. Public Library of Science, 14(11), pp. e0224757–e0224757. doi: 10.1371/journal.pone.0224757.

Byrd, D. A. *et al.* (2020) 'Comparison of Methods To Collect Fecal Samples for Microbiome Studies Using Whole-Genome Shotgun Metagenomic Sequencing', *mSphere*. Edited by K. Rao. American Society for Microbiology, 5(1), pp. e00827-19. doi: 10.1128/mSphere.00827-19.

Callahan, B. J. *et al.* (2016) 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature methods*. 2016/05/23, 13(7), pp. 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Carethers, J. M. (2016) 'HEREDITARY, SPORADIC AND METASTATIC COLORECTAL CANCER ARE COMMONLY DRIVEN BY SPECIFIC SPECTRUMS OF DEFECTIVE DNA MISMATCH REPAIR COMPONENTS', *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. American Clinical and Climatological Association, 127, pp. 81–97. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066040>.

Chan, D. S. M. *et al.* (2011) 'Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies', *PloS one*. 2011/06/06. Public Library of Science, 6(6), pp. e20456–e20456. doi: 10.1371/journal.pone.0020456.

Choi, S. W. *et al.* (1998) 'Folate depletion impairs DNA excision repair in the colon of the rat', *Gut*, 43(1), pp. 93–99. doi: 10.1136/gut.43.1.93.

Cross, A. J., Pollock, J. R. A. and Bingham, S. A. (2003) 'Haem, not Protein or Inorganic Iron, Is Responsible for Endogenous Intestinal Nitrosation Arising from Red Meat', *Cancer Research*, 63(10), pp. 2358 LP – 2360. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/10/2358.abstract>.

Cruz-Correa, M. and Giardiello, F. M. (2003) 'Familial adenomatous polyposis', *Gastrointestinal Endoscopy*, 58(6), pp. 885–894. doi: [https://doi.org/10.1016/S0016-5107\(03\)02336-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5107(03)02336-8).

Cuevas-Ramos, G. *et al.* (2010) 'Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010/06/07. National Academy of Sciences, 107(25), pp. 11537–11542. doi: 10.1073/pnas.1001261107.

Cullen, C. M. *et al.* (2020) 'Emerging Priorities for Microbiome Research', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media S.A., 11, p. 136. doi: 10.3389/fmicb.2020.00136.

Czene, K., Lichtenstein, P. and Hemminki, K. (2002) 'Environmental and heritable causes of

cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database’, *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 99(2), pp. 260–266. doi: 10.1002/ijc.10332.

Dancourt, V. *et al.* (2008) ‘Immunochemical faecal occult blood tests are superior to guaiac-based tests for the detection of colorectal neoplasms’, *European Journal of Cancer*, 44(15), pp. 2254–2258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.06.041>.

Das, P., Babaei, P. and Nielsen, J. (2019) ‘Metagenomic analysis of microbe-mediated vitamin metabolism in the human gut microbiome’, *BMC genomics*. BioMed Central, 20(1), p. 208. doi: 10.1186/s12864-019-5591-7.

Dejea, C. M. *et al.* (2014) ‘Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014/12/08. National Academy of Sciences, 111(51), pp. 18321–18326. doi: 10.1073/pnas.1406199111.

Dekker, E. *et al.* (2019) ‘Colorectal cancer’, *The Lancet*. Elsevier, 394(10207), pp. 1467–1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

Duvallet, C. *et al.* (2017) ‘Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses’, *Nature Communications*, 8(1), p. 1784. doi: 10.1038/s41467-017-01973-8.

Faivre, J. *et al.* (2012) ‘Comparison between a guaiac and three immunochemical faecal occult blood tests in screening for colorectal cancer’, *European Journal of Cancer*, 48(16), pp. 2969–2976. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.04.007>.

Flint, H. J. *et al.* (2008) ‘Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis’, *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), pp. 121–131. doi: 10.1038/nrmicro1817.

Fodde, R. *et al.* (2001) ‘Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability’, *Nature Cell Biology*, 3(4), pp. 433–438. doi: 10.1038/35070129.

Goodrich, J. K. *et al.* (2014) ‘Conducting a microbiome study’, *Cell*, 158(2), pp. 250–262. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.037.

Halloran, S., Launoy, G. and Zappa, M. (2012) ‘European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition Faecal occult blood testing’, *Endoscopy*, 44 Suppl 3, pp. SE65-87. doi: 10.1055/s-0032-1309791.

Homann, N., Tillonen, J. and Salaspuro, M. (2000) ‘Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency’, *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 86(2), pp. 169–173. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000415)86:2<169::AID-IJC4>3.0.CO;2-3.

Huttenhower, C. *et al.* (2012) ‘Structure, function and diversity of the healthy human microbiome’, *Nature*, 486(7402), pp. 207–214. doi: 10.1038/nature11234.

Innos, K. *et al.* (2018). “Subsite- and stage-specific colorectal cancer trends in Estonia prior to implementation of screening”. *Cancer Epidemiology*, 52, pp. 112–119. doi: 10.1016/j.canep.2017.12.016

- Jazi, M. S. and Najafi, S. M. A. (2017) 'Beta-catenin Forms Protein Aggregation at High Concentrations in HEK293TCells', *Iranian journal of medical sciences*. Iranian Journal of Medical Sciences, 42(1), pp. 66–72. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28293052>.
- Johnson, C. H. *et al.* (2015) 'Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis', *Cell metabolism*. 2015/05/07, 21(6), pp. 891–897. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.011.
- Johnston, L. and Carey, F. (2020) 'Pathology of colorectal polyps and cancer', *Surgery (Oxford)*, 38(1), pp. 12–17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.10.012>.
- Jost, L. (2006) 'Entropy and diversity', *Oikos*. John Wiley & Sons, Ltd, 113(2), pp. 363–375. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.
- Kamada, N. *et al.* (2013) 'Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota', *Nature immunology*, 14(7), pp. 685–690. doi: 10.1038/ni.2608.
- Kim, Y. I. *et al.* (1997) 'Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1), pp. 46–52. doi: 10.1093/ajcn/65.1.46.
- Kraus, S. and Arber, N. (2009) 'Inflammation and colorectal cancer', *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), pp. 405–410. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.006>.
- Kyrgiou, M. *et al.* (2017) 'Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature', *BMJ (Clinical research ed.)*. BMJ Publishing Group Ltd., 356, pp. j477–j477. doi: 10.1136/bmj.j477.
- Lansdorp-Vogelaar, I. and von Karsa, L. (2012) 'European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition Introduction', *Endoscopy*, 44 Suppl 3, pp. SE15-30. doi: 10.1055/s-0032-1308898.
- Leslie, A. *et al.* (2002) 'The colorectal adenoma–carcinoma sequence', *BJS (British Journal of Surgery)*. John Wiley & Sons, Ltd, 89(7), pp. 845–860. doi: 10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x.
- Lichtenstein, P. *et al.* (2000) 'Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland', *New England journal of medicine*. Mass Medical Soc, 343(2), pp. 78–85.
- Lozupone, C. A. *et al.* (2012) 'Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota', *Nature*, 489(7415), pp. 220–230. doi: 10.1038/nature11550.
- Männik, A. *et al.* (2014) 'Kolorektaalvähi sõeluuringu kulutõhusus: tervisetehnoloogia hindamise raport TTH11'. Tartu.
- McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013) 'phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data', *PLoS ONE*. Edited by M. Watson. Public Library of Science, 8(4), p. e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Mecklin, J.-P. *et al.* (1994) 'Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Taylor & Francis, 29(8), pp. 673–677. doi: 10.3109/00365529409092492.
- Mikita, V. *et al.* (2012) *Päriliku jämesoolevähiga patsientide geneetilise konsulteerimise ja jälgimise juhend*. doi: 10.15157/ea.v0i0.11287.

- Moore, R. A., Derry, S. and McQuay, H. J. (2008) 'Faecal blood loss with aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors: systematic review of randomized trials using autologous chromium-labelled erythrocytes', *Arthritis research & therapy*. 2008/01/17. BioMed Central, 10(1), pp. R7–R7. doi: 10.1186/ar2355.
- Moossavi, S. *et al.* (2019) 'Assessment of the impact of different fecal storage protocols on the microbiota diversity and composition: a pilot study', *BMC microbiology*. BioMed Central, 19(1), p. 145. doi: 10.1186/s12866-019-1519-2.
- Morgan, X. C. *et al.* (2012) 'Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment', *Genome biology*. BioMed Central, 13(9), pp. R79–R79. doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K. and Arends, M. J. (2016) 'Molecular pathological classification of colorectal cancer', *Virchows Archiv*, 469(2), pp. 125–134. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
- Nougayrède, J.-P. *et al.* (2006) '&lt;em&gt;Escherichia coli&lt;/em&gt; Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells', *Science*, 313(5788), pp. 848 LP – 851. doi: 10.1126/science.1127059.
- Patel, P. and De, P. (2016) 'Trends in colorectal cancer incidence and related lifestyle risk factors in 15–49-year-olds in Canada, 1969–2010', *Cancer Epidemiology*, 42, pp. 90–100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.03.009>.
- Peltomaki, P. and Vasen, H. F. (1997) 'Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer', *Gastroenterology*, 113(4), pp. 1146–1158. doi: <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9322509>.
- Peters, U. *et al.* (2013) 'Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis', *Gastroenterology*. 2012/12/22, 144(4), pp. 799-807.e24. doi: 10.1053/j.gastro.2012.12.020.
- Petersen, G. M., Slack, J. and Nakamura, Y. (1991) 'Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage', *Gastroenterology*. Elsevier, 100(6), pp. 1658–1664. doi: 10.5555/uri:pii:0016508591906669.
- Qin, J. *et al.* (2010) 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Rennert, G. *et al.* (2007) 'Detecting K-ras mutations in stool from fecal occult blood test cards in multiphasic screening for colorectal cancer', *Cancer letters*. 2007/03/08, 253(2), pp. 258–264. doi: 10.1016/j.canlet.2007.01.023.
- van Rossum, L. G. *et al.* (2008) 'Random Comparison of Guaiac and Immunochemical Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Cancer in a Screening Population', *Gastroenterology*, 135(1), pp. 82–90. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.040>.
- Round, J. L. and Mazmanian, S. K. (2010) 'Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010/06/21. National Academy of Sciences, 107(27), pp. 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107.

- Rubinstein, M. R. *et al.* (2013) ‘Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin’, *Cell host & microbe*, 14(2), pp. 195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
- Savage, D. C. (1977) ‘MICROBIAL ECOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT’, *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews, 31(1), pp. 107–133. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543.
- Schreuders, E. H. *et al.* (2015) ‘Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes’, *Gut*, 64(10), pp. 1637 LP – 1649. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309086.
- Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016) ‘Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body’, *PLOS Biology*. Public Library of Science, 14(8), p. e1002533. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- Slattery, M. L. *et al.* (1998) ‘Eating Patterns and Risk of Colon Cancer’, *American Journal of Epidemiology*, 148(1), pp. 4–16. doi: 10.1093/aje/148.1.4-a.
- Smith, P. M. *et al.* (2013) ‘The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis’, *Science (New York, N.Y.)*. 2013/07/04, 341(6145), pp. 569–573. doi: 10.1126/science.1241165.
- Sonnenburg, J. L. *et al.* (2005) ‘Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont’, *Science*, 307(5717), pp. 1955 LP – 1959. doi: 10.1126/science.1109051.
- Sutherland, B. W., Toews, J. and Kast, J. (2008) ‘Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions’, *Journal of Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, 43(6), pp. 699–715. doi: 10.1002/jms.1415.
- Taylor, M. *et al.* (2017) ‘Examining the potential use and long-term stability of guaiac faecal occult blood test cards for microbial DNA 16S rRNA sequencing’, *Journal of Clinical Pathology*, 70(7), pp. 600 LP – 606. doi: 10.1136/jclinpath-2016-204165.
- Vasen, H. F. A. *et al.* (2008) ‘Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)’, *Gut*, 57(5), pp. 704 LP – 713. doi: 10.1136/gut.2007.136127.
- Viljoen, K. S. *et al.* (2015) ‘Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between fusobacterium spp., enterotoxigenic Bacteroides fragilis (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer’, *PloS one*. Public Library of Science, 10(3), pp. e0119462–e0119462. doi: 10.1371/journal.pone.0119462.
- Vuik, F. E. R. *et al.* (2019) ‘Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years’, *Gut*, 68(10), pp. 1820 LP – 1826. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317592.
- Wang, T. *et al.* (2012) ‘Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers’, *The ISME journal*. 2011/08/18. Nature Publishing Group, 6(2), pp. 320–329. doi: 10.1038/ismej.2011.109.
- Wang, Z. *et al.* (2018) ‘Comparison of Fecal Collection Methods for Microbiome and Metabolomics Studies’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Frontiers Media S.A., 8, p. 301. doi: 10.3389/fcimb.2018.00301.

Wen, J., Xu, Q. and Yuan, Y. (2018) ‘Single nucleotide polymorphisms and sporadic colorectal cancer susceptibility: a field synopsis and meta-analysis’, *Cancer cell international*. BioMed Central, 18, p. 155. doi: 10.1186/s12935-018-0656-2.

Willis, A. D. (2019) ‘Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics’, *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media S.A., 10, p. 2407. doi: 10.3389/fmicb.2019.02407.

Wirbel, J. *et al.* (2019) ‘Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer’, *Nature Medicine*, 25(4), pp. 679–689. doi: 10.1038/s41591-019-0406-6.

Wolf, A. M. D. *et al.* (2018) ‘Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 68(4), pp. 250–281. doi: 10.3322/caac.21457.

Xu, J. and Gordon, J. I. (2003) ‘Honor thy symbionts’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), pp. 10452 LP – 10459. doi: 10.1073/pnas.1734063100.

Zeller, G. *et al.* (2014) ‘Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer’, *Molecular Systems Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 10(11), p. 766. doi: 10.15252/msb.20145645.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

Haigekassa, 2024. Jämesoolevähi sõeluuringu infomaterjal. Viimati kasutatud 14 mai, 2024.

[https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk\\_jamesoolevahk\\_a5\\_perearstile\\_est\\_10.06.pdf](https://www.haigekassa.ee/sites/default/files/JSV/hk_jamesoolevahk_a5_perearstile_est_10.06.pdf)

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Johanna Toodu:

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Mikroobikoosluse analüüsi võimalikkus Eesti jämesoolevähi sõeluuringus kasutatavatest peitvere testi proovidest“, mille juhendaja on MSc Kertu Liis Krigul, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Johanna Toodu

27.05.2024