TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENOOMIKA INSTITUUT

Suu mikrobioomi seosed jämesoolevähiga

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Linda Sootak

Juhendajad Kertu Liis Krigul *MSc*

Elin Org *PhD*

TARTU 2022

Suu mikrobioomi seosed jämesoolevähiga

Inimese suus on mitmekesine mikrobioomi kooslus, mis avaldab olulist mõju inimese tervisele ja on seotud mitmete haiguste tekkega. Jämesoolevähk on levinud vähivorm, mille levimus on kasvamas ja seda eriti noorte täiskasvanute seas. Selle varajane ja täpne diagnoosimine on tähtis, et tagada kõrge elulemus ja madalad ravikulud. Selleks käivad uuringud mitteinvasiivsete diagnostiliste meetodite leidmiseks. Antud töö käigus uuriti TÜ Kliinikumi riikliku jämesoolevähi sõeluuringus osalejate ja jämesoolevähi patsientide suu mikrobioomi. Uuringu käigus tuvastati olulised erinevused nii uuringugruppide mikrobioomi mitmekesisuses kui ka bakteriperekondade vahel. Tulevikus on vaja kaasata suurem valim ning koguda infot erinevate polüübi- ja vähistaadiumite kohta, et teha kindlamaid järeldusi ja tuvastada vähistaadiumi spetsiiline mikroobikooslus.

Märksõnad: mikrobioom, mikrobiota, 16S rRNA geeni sekveneerimine, jämesoolevähk

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Associations between the oral microbiome and colorectal cancer

The human oral microbiome is a diverse microbial community, which plays a significant role in human health and disease. Colorectal cancer is a complex disease in which incidence is increasing, especially among young adults. The early diagnosis of the cancer is of utmost importance and new specific non-invasive methods are needed. The objective for this dissertation is to analyse the microbial communities of colorectal cancer screening participants and cancer patients from the Tartu University Hospital. The study detected changes in alpha and beta diversities between controls and participants having polyps or cancer. Several genera were changed between the study groups, although further studies need to be done to understand the role of these genera. Future studies should include a larger sample size and include more information about the polyp histologies and cancer stages.

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

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD 3

KASUTATUD LÜHENDID 4

SISSEJUHATUS 6

KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7

1.1. Mikrobiota ja mikrobioom 7

1.1.1 Mikrobiota funktsioon ja mõju inimese tervisele 8

1.1.2 Mikrobioomi uurimismeetodid 10

1.2 Suu mikrobiota ja mikrobioom 11

1.3 Suu mikrobioomi mõju tervisele 13

1.3.1 Suu mikrobiootaga seotud haigused 14

1.4 Jämesoolevähk 17

1.4.1 Jämesoole sõeluuring Eestis 19

1.4.2 Jämesoolevähk ja suu mikrobiota 20

EKSPERIMENTAALNE OSA 24

2.1 Töö eesmärgid 24

2.2 Materjal ja metoodika 24

2.2.1 Proovide kogumine ja hoiustamine 24

2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA sekveneerimine 26

2.2.3 Mikroobikoosluse määramine 27

2.2.4 Statistiline analüüs 27

2.3 Tulemused 28

2.3.1 Sülje mikroobikooslus eri uurmisgruppide vahel 29

2.3.2 Mikrobioomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uurimisgruppide vahel 30

2.3.3 Perekondade võrdlus uurimisgruppide vahel 32

2.4 Arutelu 33

KOKKUVÕTE 37

RESÜMEE / SUMMARY 38

TÄNUSÕNAD 39

KIRJANDUSE LOETELU 40

KASUTATUD VEEBIAADRESSID 51

LISAD 52

LISA 1 52

LISA 2 54

LIHTLITSENTS 55

KASUTATUD LÜHENDID

ALD – alkohoolne maksahaigus (*alcoholic liver disease*)

ASV – amplikonjärjestuste variandid (*amplicon sequence variant*)

CDI – *Clostridium difficile* infektsioon (*Clostridium difficile infection*)

CRC – jämesoolevähk (*colorectal cancer*)

CRA – jämesoole adenoom (*colorectal adenoma*)

GCF – igeme krevikulaarvedelik (*gingival crevicular fluid*)

FAP – perekondlik adenomatoosne polüpoos (familial adenomatous polyposis)

FIT – peitveretest (*Fecal Immunochemical Test*)

HIV – inimese immuunpuudulikkuse viirus (*human immunodeficiency virus*)

HMP – inimese mikrobioomi projekt (*Human Microbiome Project*)

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

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

HSV-1 – lihtherpesviirus (*Herpes simplex virus 1*)

IBD – põletikuline soolehaigus (*inflammatory bowel disease*)

iHMP – integratiivne inimese mikrobioomi projekt (*Integrative Human Microbiome Project*)

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

NAFLD – mittealkohoolne rasvmaksa haigus (*nonalcoholic fatty liver disease*)

NGS – järgmise põlvkonna sekveneerimine (*next generation sequencing*)

NIH – Ameerika ühendriikide Rahvuslik Terviseinstituut (*National Institute of Health*)

PJS – Peutzi-Jeghersi sündroom (*Peutz-Jeghers syndrome*)

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

SISSEJUHATUS

Inimese suu on üks kõige mitmekesisema mikroobikooslusega kehapiirkond (Wade, 2013). Suu mikrobioota mõjutab tervist mitmel moel, näiteks kaitstes suud patogeenide eest ja reguleerides immuunsüsteemi. Mikrobiootat mõjutavad inimese geneetiline taust ja elustiilivalikud, nagu toitumine ja elukoht (Deo ja Deshmukh, 2019). Muutused suu mikrobiootas võivad põhjustada suuhaigusi ja soodustada süsteemsete haiguste, näiteks vähi, väljakujunemist (Caselli *et al*., 2020). Mikrobioomi uurimiseks kasutatakse tänapäeval erinevaid bakteriaalse DNA sekveneerimine viise, millest peamised on, 16S rRNA geeni sekveneerimine ja metagenoomi analüüs (Baker *et al*., 2017). Jämesoolevähk (CRC) on nii maailmas kui ka Eestis kolmas kõige sagedasem vähivorm (*Colorectal screening in Europe*, 2019). Tegemist on jäme- ja käärsooles alguse saanud pahaloomulise kasvajaga, mis tekib astmelise protsessi tulemusena pika aja jooksul. Kuna CRC varajane avastamine on väga oluline, on ülemaailmselt algatatud jämesoolevähi sõeluuringuid, et ennetada CRC tekkimist (Kalda *et al*., 2017). Kuigi sõeluuringud on efektiivsed, kaasnevad sellega ka probleemid, nagu näiteks väike osalejate arv, valepositiivsed tulemused ning märkamata jäänud polüübid koloskoopias (*Colorectal screening in Europe*, 2019, (Kalda *et al*., 2017), Tervise Arengu Instituut, 2022). Seega oleks uute mitteinvasiivsete meetodite leidmine jämesoolevähi varajaseks avastamiseks ja diagnoosimiseks olulise väärtusega, kus suu mikrobioomi määraminevõiks olla üheks potentsiaalseks biomarkeriks.

Sellest tulenevalt on töö eesmärkideks analüüsida riikliku jämesoolevähi sõeluuringu programmi patsientide ja TÜ kliinikumi hematoloogia-onkoloogia osakonna vähipatsientide suu mikrobioomi kooslust kasutades 16S rRNA geeni V3–V4 regiooni sekveneerimist. Lisaks võrrelda mikroobikooslust kontrollgruppide, polüüpidega patsientide ja vähipatsientide 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. Mikrobioota ja mikrobioom

Sõnad „mikrobioota“ ja „mikrobioom“ tekitavad tihtipeale segadust ning neid kasutatakse sünonüümidena, kuigi neil on erinev tähendus. Mikrobiootaks loetakse kindla keskkonna mikroorganismide kooslust, kelle hulka kuuluvad erinevad mikroobid nagu bakterid, viirused, seened ja arhed (Marchesi ja Ravel, 2015). Mikrobioomiks nimetatakse selle koosluse genoomide kogumikku (Merriam-Webster, 2022). Inimese mikrobioota kooslusesse kuuluvad eukarüoodid ehk päristuumsed, arhed, protistid ehk algloomad, viirused, kuid suurema osa mikrobiootast moodustavad bakterid (Breitbart *et al*., 2008; Marchesi, 2010). Inimese mikrobioomi uurimiseks käivitati aastal 2008 inimese mikrobioomi projekt (ingl *Human Microbiome Project*, HMP), mis koosnes kahest faasist: esimene faas (HMP1) uuris, milline on inimese mikrobioomi profiil, ja 2014. aastal algatatud teine faas (iHMP, *Integrative Human Microbiome Project*) keskendus mikrobioomi iseloomustamisele ja selle rollile inimese tervises *(NIH Human Microbiome Project*, 2021). Sekveneeriti terve inimese normaalsesse mikrobioota koosseisu kuuluvate mikroobide genoomid, mille põhjal koostati andmebaas, mis on juba kasutusel meditsiinis *(National Institutes of Health*, 2021). Projekti raames uuriti inimese nina- ja suuõõne, seedetrakti, urogenitaaltrakti ja naha mikroobide kooslust ja olulisust inimese tervisele.

Inimese mikrobioota alla kuulub keskmiselt 39 triljonit mikroobi, kes elavad peamiselt inimese sooletikus (Sender *et al*., 2016b). On arvatud, et inimese rakkude ja mikroobide suhe on ligikaudu 1:10, ja mikroorganismid moodustavad umbes 1–3% inimese kehamassist *(NIH Human Microbiome Project*, 2021). Suhe 1:10 arvatakse olevat ebakorrektne ning parem võrdlus oleks, et ühe inimese raku kohta on 1,3 bakterirakku ehk suhe oleks 1:1,3 (Sender *et al*., 2016a). Võrreldes aga inimese genoomi ja mikrobioomi genoome, siis on nendevaheline erinevus märgatav. Kui arvestada, et umbes 1000 bakteriliiki elab soolestikus ja igal liigil on ligikaudu 2000 geeni, siis on bakterite geene kokku umbes 2 miljonit, mis on aga 100 korda rohkem kui inimese 20000 geeni (Turnbaugh *et al*., 2007). Erinevate inimeste genoomid on umbes 99,9% identsed (Wheeler *et al*., 2008), kuid kui uurida lähemalt inimeste käte või soolestiku mikrobioome, siis võivad need erineda omavahel 80–90% (Fierer *et al*., 2008; Turnbaugh *et al*., 2009).

Igal kehapiirkonnal, kus mikroorganismid elavad, on kindel mikroobide koosseis (Costello *et al*., 2009; Dekaboruah *et al*., 2020). On näidatud, et kõige mitmekesisemad mikroobikooslused on inimesel suus ja soolestikus (Costello *et al*., 2009). Näiteks soolestikus kuulub 90% baktereid kahte hõimkonda (Rinninella *et al*., 2019), milleks on *Firmicutes* ja *Bacteroidetes* (Marchesi, 2010). Nendest hõimkondadest *Firmicutes* alla kuuluvad peamiselt sugukonnad *Lachnospiraceae* ja *Ruminococcaceae* ning sugukonnad *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* ja *Rikenellaceae* on hõimkonnast *Bacteroidetes* (Gosalbes *et al*., 2011).

Mikroobid asuvad koloniseerima inimese keha juba väga varajases eas, täpsemalt juba sünnitusel. On teada, et sünni ajal ja kohe pärast sündi puutub vastsündinu kokku ema ja keskkonna mikroobidega, millest moodustub vastsündinu enda mikrobiota (Mackie *et al*., 1999; Weng ja Walker, 2013). On näidatud, et kui laps sünnib vaginaalselt, siis on esimesed mikroobid pärit sünnituskanalist, mille peamiseks asutajateks on perekondade *Lactobacillus* ja *Prevotella* liigid, kuid keisrilõikega ilmale tulnud vastsündinute mikrobiota on pärit enamjaolt keskkonnast ja ema nahalt, mis koosneb peamiselt perekondade *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ja *Propionibacterium*'i liikidest (Hyman *et al*., 2005; Mackie *et al*., 1999; Zhou *et al*., 2007). Mida aeg edasi, seda rohkem puutub inimene kokku erinevate mikroobidega, millest kujuneb elu jooksul välja indiviidile iseloomulik mikroobikooslus (Crielaard *et al*., 2011).

1.1.1 Mikrobiota funktsioon ja mõju inimese tervisele

Mikroobide mitmekesisust on uuritud juba sajandeid. Üheks mikroorganismide uurimise eestvedajaks oli Antonie van Leewenhoek, kes juba 1680-ndatel võrdles inimese suu ja rooja mikroobe, ning leidis märkimisväärseid erinevusi tervete ja haigete vahel (Ursell *et al*., 2012). Mikrobiota on elav ökosüsteem, mis muutub kogu elu jooksul. Seda koosseisu ja funktsiooni mõjutavad mitmed faktorid, nagu toitumine, tervislik seisund, ravimid, geneetika, füsioloogia, immuunsüsteem, keskkond ja elustiil, mis teatud tingimustel võivad mikrobiota tasakaalust välja viia ja tekitada düsbioosi ehk normaalse mikrobiota koosluse häirumise (David *et al*., 2014; Maier *et al*., 2017; Turnbaugh *et al*., 2007; Vandegrift *et al*., 2017). Peale nende faktorite on näiteks veel olulised ka indiviidi vanus, sugu ja rass (Hollister *et al*., 2014).

Soolestiku mikrobiota on oluline bioloogilistes protsessides nagu näiteks ainevahetuses, soolestiku epiteeli kujunemisel ja immuunsüsteemi mõjutamisel (Chou *et al*., 2015). Inimese soolestiku mikrobiootat on isegi oma keskse rolli tõttu peetud omaette organiks (Ursell *et al*.,

2014). Nimelt aitavad mikroobid kaasa toitainete imendumisele ja kaitsevad oportunistlike patogeenide eest (Macpherson ja Harris, 2004; Round ja Mazmanian, 2009). Inimene sööb mitmeid kiudaineid, milles olevate komplekssete polüsahhariidide jaoks ei ole meil vastavaid lagundavaid ensüüme. Neid polüsahhariide suudavad aga lagundada mitmed erinevad mikroorganismid, kellel on olemas spetsiifilised ensüümid selliste süsivesikute, nagu ksülaani, pektiini ja arabinoosi lagundamiseks (Gill *et al*., 2006).

Väga oluline on ka bakterite roll erinevate vitamiinide sünteesis. Näiteks B_{12} vitamiini ehk kobalamiini peab inimene saama toidust, mille süntees toimub ainult mõnedes bakterites ja arhedes (Fang *et al*., 2017; Watanabe ja Bito, 2018). Peale toitainete imendumise ja vitamiinide sünteesi, suudavad bakterid mõjutada söögiisu ja ka seda, kui palju energiat toidust saadakse, seetõttu on uuritud ülekaalulisuse ja soolestiku mikrobioota vahelist seost (Byrne *et al*., 2015; Turnbaugh *et al*., 2006). Inimese soolestiku optimaalseks tööks on vaja energiat. See energia võib tulla näiteks lühikese ahelaga rasvhapetest (SCFA, *short chain fatty acids*), nagu atsetaat, propionaat ja butüraat, mis on toodetud soolestikus elavate mikroobide poolt (Duncan *et al*., 2009). Need rasvhapped on olulised lipiidide, energia ja vitamiinide sünteesis (Byrne *et al*., 2015). Mikrobioota mõjutab ka soole limaskesta väljaarenemist ja stimuleerib immuunrakkude arengut ning küpsemist, mis omakorda aitab kaasa humoraalse ja rakulise immuunsüsteemi moodustumisele (Bouskra *et al*., 2008). Seetõttu on bakterid olulised toidu seedimiseks, vitamiinide sünteesiks ja immuunsüsteemi kujunemiseks.

Häired mikrobiootas võivad viidata erinevatele haigustele. Selliste haiguste, nagu ülekaalulisus, mõned autismi spektrihäired, põletikulised soolehaigused (*inflammatory bowel diseases*, IBD), suhkurtõbi, metaboolne sündroom, ateroskleroos, erinevad maksahaigused (*alcoholic liver disease*, ALD; *non-alcoholic liver disease*, NAFLD), allergiad, immuunhaigused, tsirroos ja hepatotsellulaarne kartsinoom ning paljude teiste haiguste, puhul on mitmed teadustööd leidnud märkimisväärseid seoseid inimese mikrobiootaga (Halfvarson *et al*., 2017; Knights *et al*., 2014; Lambring *et al*., 2019; McDonald *et al*., 2015; Uusitalo *et al*., 2016; Wang *et al*., 2016). Üheks düsbioosi klassikaliseks näiteks on *Clostridium difficile* põhjustatud infektsioon CDI (*Clostridium difficile infection*). *C. difficile* on anaeroobne, grampositiivne, eoseid moodustav batsill, mis on inimese soolestiku normaalse mikrobioota osa. CDI patsientide soolestiku mikrobioota uurimisel on selgunud, et kooslus on märkimisväärselt muutunud võrreldes tervete kontrollidega (Gu *et al*., 2016; Ling *et al*., 2014). Vaatamata sellele, et antibiootikumid on olnud revolutsioon meditsiinis ja põllumajanduses, on kindel, et antibiootikumid mõjuvad negatiivselt ka inimese mikrobiootat (Dethlefsen ja Relman, 2011; Modi *et al*., 2014). Antibiootikumid on

väga tõhusad ravimid saamaks lahti patogeenidest. Tänapäeval aga kasutatakse ka laiatoimelisi antibiootikume, mille sihtmärgiks on muuhulgas normaalse mikrobioota koosseisu kuuluvad mikroobid, mistõttu nende mitmekesisus väheneb ja tekib potentsiaalne risk põletikuks või infektsiooniks (Modi *et al*., 2014). Bakterite arvukuse languse tõttu saavad patogeenid võimaluse paljuneda ja põhjustada haiguseid. Seega, kui tuvastada bakterid, mis põhjustavad haigusi, saaks neid teadmisi kasutada, et muuta ennetamine, diagnoosimine ja ravi spetsiifilisemaks ja tõhusamaks.

Inimese elukeskkond ja elustiil on väga olulised faktorid, mis mõjutavad tervist ning meie mikrobioota koosseisu. Näiteks linnas elavate inimese naha mikrobioota erineb nende omast, kes elavad maal (Ying *et al*., 2015). Samuti on näidatud stressi, füüsilise aktiivsuse ning koos elavate inimeste, mõju mikrobiootale. Hiljutine uurimistöö näitas, et unevaegus ja mitme stressoriga keskkond, nagu füüsiline ülekoormus, vähene energiatarbimine, lihaskahjustused, põletik, viitavad soolestiku barjääri kahjustustele, mis omakorda mõjub negatiivselt soolestiku mikroobikooslusele ja ainevahetusele (Benedict *et al*., 2016). Elustiili oluline osa on kehaline aktiivsus. On leitud, et inimestel, kes tegelevad regulaarselt spordiga, on madalam põletiku tase ja tugevam immuunsüsteem, mis omakorda mõjuvad positiivselt mikroobide koosseisule (Cook *et al*., 2016). Sellest saab aga järeldada, et inimese mikrobioota on tihedalt seotud tervisega ning sellest sõltuvad mitmed füsioloogilised, biokeemilised ja immunoloogilised protsessid.

1.1.2 Mikrobioomi uurimismeetodid

Esimeseks mikrobioota uurimisvahendiks oli mikroskoop, millega kirjeldati mikroobide kuju ja muid väliseid tunnuseid ning mille põhjal tehti esimesed klassifikatsioonid. Mikrobioomi uurimisel on toimunud suured edasiminekud ning tänu tehnoloogia arengule kasutatakse tänapäeval peamiselt mikroobide geneetilise materjali ehk DNA järjestuse analüüsi ning selle alusel klassifikatsiooni. Lisaks DNA analüüsile uuritakse mikroobide RNAd, metaboliite ja valke. Kaks peamist mikrobioomi DNA alusel läbi viidavat analüüsimeetodit on spetsiifilise geeni ehk amplikoni ja tervikgenoomi ehk metagenoomi sekveneerimine. Amplikoni analüüsis kasutatakse markergeeni, mille kindlad regioonid tuleb amplifitseerida, sekveneerida ja seejärel analüüsida. Üks sagedasemaid markergeene bakteripopulatsiooni uurmiseks on bakteriaalne ribosoomi 16S alaühiku ribosomaalne RNA (16S rRNA) geen. See meetod on hea tuvastamaks, kas teatud organismid on proovis olemas (Kuczynski *et al*., 2012). Amplikoni geeni analüüsis paljundatakse polümeraasi ahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction*, PCR) praimerite abil

konserveerunud regioonide vahele jäävad variaabelregioonid. 16S rRNA geeni puhul esineb 9 hüpervariaabel regiooni (V1–V9), mille mitmekesisuse alusel on võimalik baktereid klassifitseerida (Allaband *et al*., 2019). Seejärel kasutatakse järgmise põlvkonna sekveneerimise (*next generation sequencing*, NGS) meetodeid, et sekveneerida järjestused ja luua andmebaasid vastavate tulemustega. 16S rRNA geeni kasutatakse seepärast, et see esineb peaaegu kõikidel bakteritel, geeni pikkus on 1500bp, mis on piisavalt suur bioinformaatiliseks analüüsiks (Janda ja Abbott, 2007). Lisaks on see geen tugevalt konserveerunud, seega on hea marker, mida referentsina kasutada (Tran *et al*., 2017).

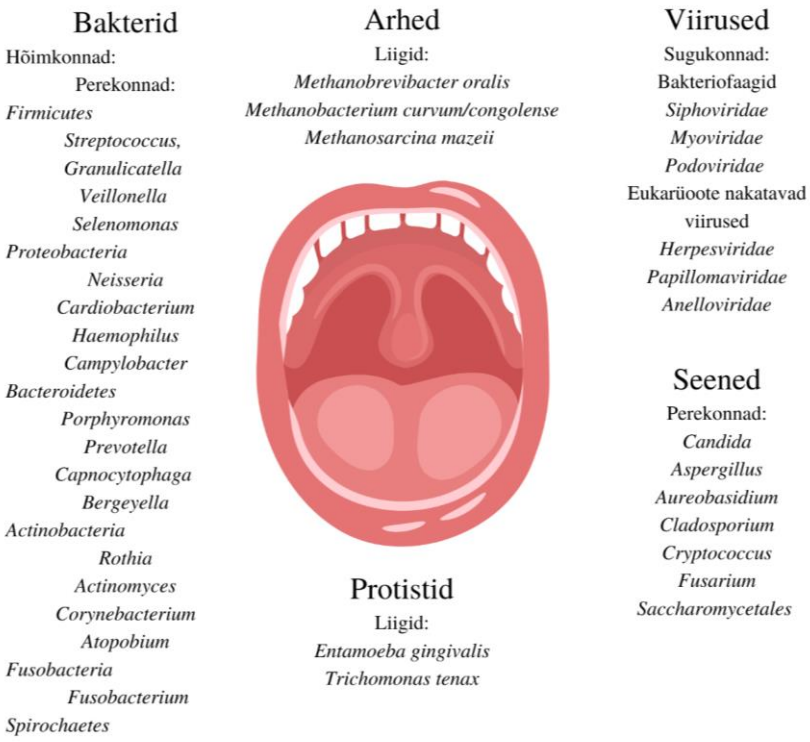
Teiseks uurimismeetodiks on metagenoomi analüüs. Metagenoomi analüüsi korral sekveneeritakse kogu proovis esinev DNA (Baker *et al*., 2017; Deo ja Deshmukh, 2019). Seega on metagenoomi analüüsiga võimalik tuvastada ja analüüsida kõiki mikroobikoosluses esinevaid genoome. Erinevalt 16S rRNA analüüsist, mille puhul tuvastatakse mikroobe perekonna tasemel, saab sügava metagenoomi analüüsiga identifitseerida mikroorganisme liigi ja tüve tasandil ning samuti võimaldab meetod uurida organismide bioloogilisi funktsioone (Janda ja Abbott, 2007; Le Bars *et al*., 2017).

1.2 Suu mikrobioota ja mikrobioom

Suu mikroobikooslus on soole järel üks kõige mitmekesisem kehapiirkond. Kuigi vastsündinu puutub esimeste mikroobidega kokku juba sünnitusel, asustavad esimesed mikroorganismid suu alates esimesest toitmiskorrast (Marsh, 2000). Sarnaselt soolestikule on ka suus kõige levinumateks mikroorganismideks bakterid (Segata *et al*., 2012). Suud asustab üle 700 bakteriliigi (Deo ja Deshmukh, 2019). Mikroobid elavad suus nii kõvadel pindadel kui ka pehmetel kudedel: keelel, huultel, hammastel, igemetel, põskedel, kõvasuulael ja pehmel suulael ja mandlitel (Dewhirst *et al*., 2010; Kilian *et al*., 2016; Zaura *et al*., 2014). Suuõõs on mikroobidele ideaalne elukoht kahel põhjusel. Esiteks on suus püsivalt 37°C, teiseks on suus stabiilne pH vahemikus 6,5–7,0 (Deo ja Deshmukh, 2019). Mõlemad tingimused sobivad väga paljudele mikroobidele. Suu mikrobioomile on iseloomulik biofilmi teke, kus mikroobid elavad kogumitena ja suhtlevad hulgatunnetuse (*quorum sensing*) kaudu (Li ja Tian, 2012).

Suu mikrobioota võib olla väga muutlik ning dünaamiline, sest mitmed faktorid, nagu toitumine, pH, interaktsioonid mikroobide vahel, geenmutatsioonid ja horisontaalne geeniülekanne, mõjutavad mikroobikooslust (McLean, 2014). Suuõõne bakteritest ei ole

suudetud umbes pooli laboris kultiveerida, mis raskendab bakterikoosluste uurimist (Wade, 2004). Suu mikrobioomi kaardistamiseks loodi aastal 2010 andmebaas HOMD (*The Human Oral Microbiome Database*), mis sisaldab bakterite genoomijärjestusi ja taksonite kirjeldusi *(Expanded Human Oral Mircobiome Datavase V3*, 2022). Peamised hõimkonnad on *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes* ja *Fusobacteria*, mis moodustavad 96% kõikidest suu mikrobioota taksonitest (Dewhirst *et al.*, 2010). Suus elavatele bakteritele on omane hapnikutundlikkus (Kilian *et al*., 2016)). Suus elavad peamiselt fakultatiivsed anaeroobid ehk bakterid, kes suudavad elada nii hapnikuga kui ka hapnikuta keskkonnas, nagu näiteks perekonnad *Streptococcus* ja *Actinomyces* (Wade, 2013). Viimased suudavad end lülitada ümber aeroobsele hingamisele, kui toimub biofilmi moodustamine. Suus leidub ka üksikuid aeroobe, nagu perekonna *Neisseria* ja *Rothia* liigid, kes on esimesed hambapinna asustajad (Diaz *et al*., 2006). Enamlevinud suud koloniseerivad mikroorganismid on välja toodud Joonisel 1.



Joonis 1. Inimese suus elavad mikroorganismid

Lisaks bakteritele on suus olulisel kohal ka viirused ja protistid. Terve inimese suu viroom koosneb enamjaolt bakteriofaagidest, kuid vähesel määral esineb ka eukarüoote nakatavaid viiruseid (Baker *et al*., 2017). Eukarüoote nakatavate viiruste hulka kuuluvad mumpsi tekitav viirus, marutõveviirus, hepatiidiviirused, inimese immuunpuudulikkuse viirus (HIV, ingl

human immunodeficiency virus), inimese papilloomiviiruse (HPV, *Human Papillomavirus*) ja *Herpes simplex*'i viirus (täpsemalt HSV-1, *Herpes simplex virus 1*) (Wade, 2013). Protistide esindajad on peamiselt saprofüütsed ehk organismide laguproduktidest toitujad (Deo ja Deshmukh, 2019). Suu mikrobioota alla kuuluvad ka seened, millest *Candida* on kõige levinum (Bandara *et al*., 2019). Arhed ei moodusta suu mikrobiootast suurt osa. Kõik suu mikrobioota arhed on metanogeenid ehk nad tekitavad anaeroobse lagundamise käigus kõrvalproduktina metaani. Arhesid seostatakse peamiselt suuhaigustega, eelkõige periodontiidiga (Belmok *et al*., 2020).

Suu mikrobioomi uurimiseks kasutatakse erinevaid proovivõtmise variante, mille valik sõltub uuringu eesmärgist. Suus jaotuvad erinevad nišid laias laastus kaheks – limaskestade kude ja hammaste kõvakude (Faust *et al*., 2012). Seega universaalset proovitüüpi suu mikrobioomi uurimiseks ei ole ning proovide võtmine sõltub uuringu hüpoteesidest (Zaura *et al*., 2021). Sülg on hea materjal suu mikrobioomi uurimiseks, sest ühest milliliitrist on võimalik tuvastada ligikaudu 10^8 mikroobi, mis pärinevad enamjaolt suu limaskestadelt (Marsh *et al*., 2016). Samuti on süljeproovi võtmine lihtne ja mitteinvasiivne protseduur, mistõttu on suu mikrobiootat hästi ja palju uuritud (Shaw *et al*., 2017). Lisaks süljele kasutatakse suu mikrobioomi uurimiseks veel põse-, keele- mandli- ja suulaekaape proove, suuloputusproove, erinevaid igemealuse hambakivi proove, erinevaid hambapinnaproove ja limaskesta biopsiaid (Zaura *et al*., 2021). Proovide erinevuste väljatoomiseks on uuritud sama indiviidi süljeproove ja põsekaapeproove, mille tulemused oli erinevad (Kaan *et al*., 2022). Nimelt leiti, et süljeproovides on mikroobide mitmekesisus võrreldes põsekaapeproovidega suurem, millest järeldati, et põsekaabe ei ole adekvaatne alternatiiv süljeproovile (Kaan *et al*., 2022). Põsekaape puhul on mikrobioota iseloomulik suu limaskestale ehk selles esineb rohkem *Haemophilus*'st, ning süljeproovid on iseloomulikud hammaste ja igemete mikroobikooslustele ehk *Veillonella* ja *Prevotella* rohked (Consortium *et al*, 2012). Süljeproovides esinevat suuremat mikroobide mitmekesisust selgitab mikroobide pärinemine mitmelt erinevalt suupinnalt (Kaan *et al*., 2022).

1.3 Suu mikrobioomi mõju tervisele

Inimese erinevaid kehapiirkondi, sealhulgas suud, asustavad mikroorganismid võivad olla kas patogeenid (peremeesorganismi kahjustavad), sümbiondid (nii peremehele kui ka mikroorganismile kasulikud) või kommensaalid (ühele kasulik, kuid teisele neutraalne). Kuigi suu mikroobide mõju tervisele on võrreldes soolestiku mikroobidega uuritud oluliselt vähem,

on teada, et suus on mikroobid olulised suu tervise kujunemisel ja säilitamisel (Deo ja Deshmukh, 2019; Devine *et al*., 2015; Kilian *et al*., 2016). Suu mikrobioomi rollid on välja toodud Joonisel 2. Täpsemalt on suu mikroobid vajalikud kaitseks suupatogeenide eest, suu limaskesta ning immuunsüsteemi kujunemiseks ja säilitamiseks, toidu seedimiseks, energia tootmiseks, metaboolseks regulatsiooniks, rasvade talletamiseks ning väliskeskkonnast pärit ühendite detoksifitseerimiseks (Kilian *et al*., 2016).

Joonis 2. Suu mikrobioomi rollid

Suu mikrobioota moodustab tavaliselt biofilmi, mis võib olla kaitseks hambakaariese eest ja ennetada teiste infektsioonide teket (Deo ja Deshmukh, 2019). Mikroobid kasutavad elutegevuseks energiaallikana enamjaolt sülge ja igeme krevikulaarvedelikku (GCF, *gingival crevicular fluid*) (Wickström *et al*., 2009).

1.3.1 Suu mikrobiootaga seotud haigused

Kommensaalid katavad suurema osa suu pinnast, mistõttu on patogeenidel vähe ruumi. Seega muutuvad mikroobid patogeenideks alles siis, kui kommensaalid ei suuda neid enam kontrolli all hoida, ja see toob kaasa kas infektsioonid või haigused (Avila *et al*., 2009). Üldiselt on infektsioonidel üks kindel faktor, mis viib haiguste tekkeni, kuid suuhaiguste puhul on iseloomulikuks mitmed haigustekitajatest mikroorganismid ja nendevaheline koostöö (Alcaraz *et al*., 2012). Suurenenud suhkrurikaste ja happeliste jookide tarvitamine ning suitsetamine on mõjutanud inimeste suu mikroobikooslust (Adler *et al*., 2013), mis omakorda on korrelatsioonis

erinevate suuhaiguste sagenemisega. Veel on uuritud suuhügeeni indeksit (*oral hygiene index*, OHI), mis on negatiivselt seostatud bakteriperekondadega *Alloprevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* ja *Prevotella*, kus esines ka korrelatsioon vanemate inimeste puhul (Wang *et al*., 2021). Sellest võib järeldada, et vanematel inimestel, antud juhul >50, võib esineda nimetatud patogeenseid perekondi rohkem.

Suus elavate mikroobidega on seostatud järgmised suuhaigused: hambasisesed nakkused, hambakaaries ning igeme- ehk periodontaalhaigused, nagu igemepõletik ja periodontiit (Saygun *et al*., 2011; Zaura *et al*., 2021). Endodontilised infektsioonid on põhjustatud ravimata hambakahjustustest. Täpsemalt kujunevad infektsioonid, kui kahjustus liigub dentiini ehk hambaluusse ning areneb edasi pulpi ehk säsisse, mis infektsiooni tõttu sureb (Wade, 2013). Infektsioon kahjustab säsirakke, mistõttu lähevad need apoptoosi ehk programmeeritud rakusurma ning säsi hävineb. Sellised infektsioonid on enamjaolt seostatud anaeroobsete proteolüütiliste bakteritega, nagu *Enterococcus faecalis*, mis ei kuulu suu mikroorganismide normaalsesse koosseisu (Stuart *et al*., 2006). Mainitud bakter on tõenäoliselt pärit nii pastöriseeritud kui ka pastöriseerimata piimatoodetest, täpsemalt juustust, ning sattudes juurekanalisse läbi mikroavauste, võib ta seal elada puhkeseisundis või tekitada infektsioone (Razavi *et al*., 2007).

Hambakaaries on hamba lagunemine, mille põhjustab suubakterite süsivesikute fermenteerimise käigus moodustunud hape (Kidd, 2010; Schwendicke *et al*., 2016). Normaalsel emailil elavad streptokokid ja *Actinomyces*, mille happetootmine on madal ja harva esinev, kuid mida rohkem süüa süsivesikuid, seda suuremaks muutub ka happe tootmine (Takahashi ja Nyvad, 2011). Mida aeg edasi, seda enam mõjutab hape demineralisatsiooni/remineralisatsiooni tasakaalu mineraalide kao suunas, mis viib omakorda hambakaariese tekkeni (Takahashi ja Nyvad, 2011). Seega, mida kauem hapet toodetakse ja mida intensiivsemaks see muutub, seda happelisem on keskkond, ning eelise saavad bakterid, kellele on sellised tingimused soodsad. Sellisteks bakteriteks on näiteks *Streptococcus mutans* ja laktobatsillid, mille happetootmine süvendab hamba lagunemist (Lemos *et al*., 2019; Takahashi ja Nyvad, 2011). Hambakaariesega on seostatud ka perekondade *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* ja *Scardovia* liike (Downes *et al*., 2011; Kaur *et al*., 2013; Munson *et al*., 2004). Homöostaasi hoidmiseks on olemas bakterid, mis suudavad toota uureast ja arginiinist ammooniumi, mis omakorda tõstab suu pH-d (Burne ja Marquis, 2000). See suudab tasakaalustada liigse happe tootmist, kuid mitte täielikult.

Igemehaigused on infektsioonid ja põletikud igemetes ja luudes, mis ümbritsevad hammast (Kinane *et al*., 2017). Seda jaotatakse kaheks faasiks: varajane faas ehk gingiviidit ja hiline faas ehk periodontiit. Varajases faasis ehk gingiviidis muutuvad igemed punaseks, lähevad paiste ning võivad hakata veritsema. Gingiviidi arengule aitavad kaasa biofilmi moodustavad grampositiivsed aeroobid ja fakultatiivsed anaeroobid, nagu streptokokid ja *Actinomyces* liigid (Kolenbrander *et al*., 2006). Kui gingiviit on aga edasi arenenud, siis domineerivad anaeroobsed gramnegatiivsed bakterid, nagu *Fusobacterium*, *Treponema* ja *Synergistetes* perekonna bakterid (Zijnge *et al*., 2010). Ülemaailmselt on võetud kasutusele mitmed suuhügieeni meetmed, nagu hammaste harjamine, hambaniit, närimiskumm, mis aitavad ennetada hambakatu kogunemist. Kui aga suuhügieen ei ole regulaarne, saavad gramnegatiivsed ja anaeroobsed bakterid paljuneda ja eritada toksilisi ensüüme, mis võivad sattuda igemetesse, ning see võib esile kutsuda ärritust ja põletikku ning areneb välja gingiviit (Wade, 2013).

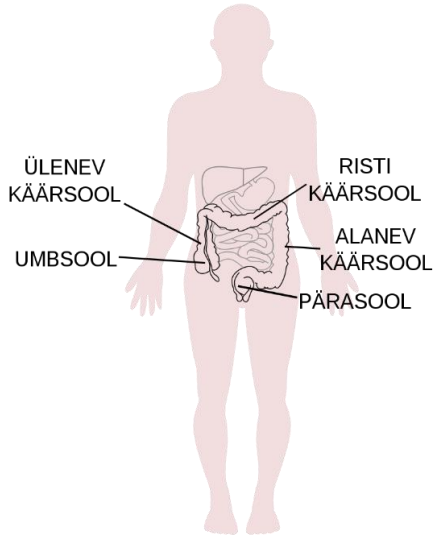
Teises ehk periodontiidi staadiumis hakkavad igemed hambast eemalduma ja moodustub tasku, mille asustavad tihedalt anaeroobsed bakterid (Wade, 2013). Peremehe enda proteaasid süvendavad igemekahjustust (Darveau, 2010) ning alveolaarluu, mis toetab hambaid, resorbeerub, mistõttu hammas tuleb igemest lahti (Wade, 2013). Hambakaariesega seotud periodontiit jaotatakse kaheks: krooniline ja agressiivne (Armitage, 1999). Periodontiidiga on seostatud liigid *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* ja *Tannerella forsythia* (Socransky *et al*., 1998) ja uuemad uuringud on lisanud veel *Eubacterium saphenum, Filifactor alocis, Porphyromonas endodontalis* ja *Prevotella denticola*, kuid ei ole leitud ühte kindlat mikroobi või mikroobide gruppi, mis oleksid periodontiidi põhjustajaks (Kumar *et al*., 2003). Peamisteks riskiteguriteks, mis soodustavad haiguse arengut, on tubaka suitsetamine, I ja II tüüpi diabeet (Van Dyke ja Dave, 2005).

Kuna suus elavatel bakteritel on kerge pääseda vereringe või igemelõhede kaudu keha eri osadesse, nagu näiteks hingamis- ja seedesüsteemi, võivad mikroobid potentsiaalselt põhjustada muid süsteemseid haigusi (Wade, 2013; Willis ja Gabaldón, 2020). Sellest tulenevalt on leitud, et suu mikrobiootal on roll süsteemsete haiguste, nagu südame–veresoonkonna haigused, reumatoidartriit, raseduse katkemine, insult, põletikuline soolehaigus ja jämesoolevähk, hingamisteede infektsioonid, meningiit või ajuabstsessid, kopsu-, maksa- või põrnaabstsessid, pimesoolepõletik, kopsupõletik ja diabeet, kujunemises (Kilian *et al*., 2016). Näiteks on leitud suule iseloomulikke baktereid tsüstilise fibroosi patsientide kopsudest (Rogers *et al*., 2006). Samuti on leitud, et inimesel, kellel on mõni periodontaalne haigus, on suurem risk haigestuda vähki (Ahn *et al*., 2012), ja leitud on ka seoseid kõhunäärmevähi ja suu

mikrobioomi vahel (Farrell *et al*., 2012). Suu mikrobioom võib olla mõnede haiguste põhjuseks või hoopis peegeldada süsteemset muutust kindlates kehapiirkondades, mistõttu võiks suu mikrobioom olla teatud haiguste biomarker. (Ahn *et al*., 2012; Farrell *et al*., 2012; Wade, 2013; Willis ja Gabaldón, 2020).

1.4 Jämesoolevähk

Jämesoolevähk ehk kolorektaalvähk (ladina keeles *carcinoma coli* või *carcinoma recti*, CRC, *colorectal cancer*) on healoomulisest kasvajast ehk polüübist alguse saanud pahaloomuline kasvaja, mis tekib umb-, käär- või pärasooles (Joonis 3).



Joonis 3. Jämesoole ehitus (joonise autor: Kertu Liis Krigul)

Jämesoolevähi teke on astmeline protsess, kus aja jooksul kuhjuvad mutatsioonid, millest võib areneda vähk (Kalda *et al*., 2017). 2020. aastal oli jämesoolevähk rinnavähi ja kopsuvähi järel ülemaailmselt kolmas sagedaseim vähiliik nii meestel kui ka naistel (*Global Cancer Observatory*, 2020). Ka Eestis on jämesoolevähk kolmas kõige sagedasem vähk, aastas diagnoositakse ligikaudu 1000 uut jämesoolevähi juhtu ja sellesse sureb umbes 560 inimest (*Global Cancer Observatory*, 2020). Samuti on täheldatud Euroopas noorte täiskasvanute hulgas diagnooside kasvu (Vuik *et al*., 2019).

Jämesoolevähi riskitegureid on palju. Peamisteks on aga ülekaalulisus, vähene füüsiline aktiivsus, suitsetamine, geneetiline eelsoodumus, ebatervislik toitumine, kuid ei ole täpselt teada, miks on juhtumite arv aastatega suurenenud (Dekker *et al*., 2019). Samuti on suurenenud

risk inimestel, kel on varem esinenud adenoome ehk näärmeepiteelist alguse saanud healoomulisi kasvajaid, kui peres on inimestel diagnoositud jämesoolevähk või esineb pikaajaline põletikuline soolehaigus (Brenner *et al*., 2011; Cottet *et al*., 2012; Jess *et al*., 2012). Jämesoolevähki haigestumist mõjutab oluliselt ka vanus – mida vanem on inimene, seda kauem on olnud mutatsioonidel aega kuhjuda (Simon, 2016).

Olenevalt mutatsiooni päritolust, saab jämesoolevähk olla kas pärilik või juhuslik. Umbes 95% jämesoolevähi juhtudest on juhuslikud ning ei ole seotud geneetilise eelsoodumusega, seega on mutatsioonid elu jooksul kuhjunud ning mõjutanud inimese rakke (Mori ja Pasca, 2021). Mori ja Pasca *et al* näitasid ka, et umbes 5% juhtudest on seotud geneetilise eelsoodumisega ehk pärilikud (Mori ja Pasca, 2021). Perekondlik kolorektaalvähk esineb umbes 15%–30% kõikidest jämesoolevähi juhtudest (Mikita *et al*., 2012). Kõige enam levinud päriliku jämesoolevähi vormid on järgmised: Lynchi sündroom ehk pärilik mittepolüpoosne kolorektaalvähk (HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), perekondlik adenomatoosne polüpoos (FAP, *familial adenomatous polyposis*), MUTYH–seoseline polüpoos (MAP, *MUTYH–associated polyposis*), Peutzi-Jeghersi sündroom (PJS, *Peutz-Jeghers syndrome*). Lynchi sündroom ja FAP on mittepolüpoossed sündroomid ning nende puhul ei esine palju polüüpe ja neid on raske tuvastada (Dekker *et al*., 2019). Nende kahe vähivormi puhul võib kolorektaalvähi eluaegne risk suureneda vastavalt 80%-ni ja 100%-ni (Smith *et al*., 2008; Vasen *et al*., 2007).

Tihtipeale pöörduvad inimesed arsti poole alles siis, kui on tekkinud tõsised sümptomid. Umbes kolmandikul juhtudest on vähk selleks ajaks levinud teistesse elunditesse, mis teeb ravi oluliselt keerulisemaks (Kalda *et al*., 2017). Jämesoolevähki saab kindlalt diagnoosida vaid kasutades soole visualisatsioonil põhinevat uuringut ehk koloskoopia. Koloskoopia käigus saab arst lähemalt vaadelda jämesoolt toruja uurimisvahendi ehk endoskoobiga, eemaldada polüüpe ja võtta koeproove ehk biopsiaid histoloogiliseks analüüsiks. Väga oluline on panna õige diagnoos, et haigust saaks hoida kontrolli all ja alustada kindla raviplaaniga. Kuigi ideaalset jämesoolevähi ravi ei eksisteeri, on väga oluline tagada organismi normaalselt funktsioneerivate kudede minimaalne kahjustus ehk ravi selektiivsus (Suuroja, 2009). Tihtipeale kombineeritakse erinevad raviviise (kirurgiline, kiiritus-, keemia- ja süsteemne ravi), et saada lokaalselt efektiivseim tulemus (Suuroja, 2009). Siinkohal on oluline läheneda individuaalselt, arvestades inimese geneetilist profiili ja muid tervisega seotud aspekte.

1.4.1 Jämesoole sõeluuring Eestis

Üle maailma on jämesoolevähi varajaseks tuvastamiseks võetud kasutusele sõeluuringud. Sõeluuring koosneb kahest osast: peitveretest ja koloskoopia. Esmalt võetakse väljaheiteproov FIT (*Fecal Immunochemical Test*) testi tegemiseks, millega määratakse peitvere hulk väljaheites. Peitveri on veritsus seedetraktist, mille kogus määrab olukorra tõsiduse. Eestis algatati jämesoolevähi sõeluuring aastal 2016, mille eesmärgiks on tuvastada varases staadiumis olev jämesoolevähk või ennetada selle tekkimist, kui inimesel leidub madala või kõrge riskiga polüüpe. Eestis saavad osaleda jämesoolevähi sõeluuringus iga kahe aasta tagant 60–69 aasta vanused ravikindlustatud mehed ja naised.

õeluuringutes kasutatakse peitveretesti, mille abil on võimalik leida väljaheites leiduvat verd. Selle leidumisel on testi tulemus positiivne ja inimene saadetakse edasi koloskoopiauuringule. Teadusuuringud on kinnitanud, et sõeluuringud on efektiivsed ja edukas jämesoolevähi sõeluuring suudab ära hoida kolmandiku jämesoolevähi surmadest ning ennetada vähi väljaarenemist (Kalda *et al*., 2017). Saksamaal näidati, et jämesoolevähi sõeluuringud aitasid aastatel 2003–2012 ennetada enam kui 180000 vähijuhtumit (*Colorectal screening in Europe*, 2019). On selgeks tehtud, et kui diagnoosida jämesoolevähk I staadiumis, saaks päästa aastas umbes 130000 inimest ja 3 miljardit eurot (*Colorectal screening in Europe*, 2019).

Kuigi sõeluuringud on efektiivsed, on mitmeid takistusi, mille tõttu ei ole suudetud sõeluuringuid täiuslikkuseni viia ning päästa märkimisväärselt suurt hulka inimesi jämesoolevähist. Nimelt on probleemiks patsientidega seotud psühholoogilised faktorid, nagu ärevus, tervishoiutöötajate vähene suunamine sõeluuringutesse ja tervishoiusüsteem üldiselt, sealhulgas ebaadekvaatsed sõeluuringusüsteemid (*Colorectal screening in Europe*, 2019). Näiteks saadakse FIT testiga tihti valepositiivseid tulemusi ja inimene suunatakse asjatult koloskoopiauuringule (Amitay *et al*., 2019). Samuti võib arstil märkamata jääda mõni kõrge riskiga polüüp või lausa vähk, seega on väga oluline meedikute asjatundlikkus. Märkamata polüüpe või vähki võib põhjustada ka patsiendipoolsed tegurid või halvasti ettevalmistatud sool. Muutused sooles võivad jääda märkamata kahel korral 100 protseduuri kohta (Kalda *et al*., 2017). Samuti on probleemiks jämesoolevähi sõeluuringutes osalejate väike hulk. Kuigi Eestis on osalejate arv aastatega tõusnud, jääb see ikkagi madalaks, uuringus osaleb alla 60% sihtgrupist (Tervise Arengu Instituut, 2022). Igasugune haiguste ravi on kallis ning mida hiljem vähk avastatakse, seda kallimaks muutub selle ravi. On hinnatud, et keskmiselt on varajase ja hilise staadiumi ravi maksumus kümnekordne (*Colorectal screening in Europe*, 2019). Alates

aastast 2009, mil CRC ravi maksis 13,1 miljardit eurot, on hind tõusnud ning aastal 2019 oli ravi maksumus üle 15 miljardi euro (*Digestive Cancers Europe*, 2019). Erinevate staadiumite ravi on väga varieeruv: I staadiumi CRC puhul umbes 3000 eurot, hilise staadiumi korral aga kuni 170000 eurot (*Digestive Cancers Europe*, 2019). Nendele probleemidele vaatamata on jämesoolevähi sõeluuringud õigustatud ja väga efektiivsed nii tervishoiu kui ka majanduslikust aspektist.

1.4.2 Jämesoolevähk ja suu mikrobioota

Mitmed uuringud viitavad sellele, et soolestiku mikrobioota on seotud jämesoolevähi arenguga, seda läbi põletiku indutseerimise või mikroobsete metaboliitide (Bultman, 2014; Song *et al*., 2015; Yang, Misra, *et al*., 2019). Samuti näitavad uuringud, et suu mikrobioomil on potentsiaalne seos mitmete haiguste tekkega, nagu hambakatt ja periodontaalsed haigused, mis omakorda võivad viia süsteemsete haiguste tekkeni, näiteks kasvajad ja diabeet (He *et al*., 2015). Sellest tulenevalt on hakatud uurima ka suu mikrobioomi ja selle potentsiaalset seost jämesoolevähiga.

Jämesoolevähiga on seostatud mitmeid suu mikrobiootasse kuuluvaid mikroobe, mis viib arvamuseni, et suu mikrobioota võib olla osa jämesoolevähi tumorigeneesist (Flemer *et al*., 2018; Han *et al*., 2016; Kato *et al*., 2016; Koliarakis *et al*., 2019; Mai *et al*., 2016; Russo *et al*., 2018; Schmidt *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2020; Wang *et al*., 2021; Yang, Misra, *et al*., 2019). Arvatakse, et CRC puhul on pigem tegemist mitme bakteri koosmõjuga, mitte ainult ühe patogeeniga, mis võiks osaleda CRC tekkes (Chen *et al*., 2019). Tabel 1 iseloomustab suu mikrobiootasse kuuluvaid baktereid, mida on seostatud jämesoolevähiga (Tabel 1).

Tabel 1. Jämesoolevähi uuringutes leitud muutused CRC patsientide suu mikrobioomis

Analüüsimeetod	Populatsioon	n=Patsiendid + n=Kontrollid	Proovitüüp	Staadium	Muutused CRC patsientidel	Viide
16S rRNA V3–V4 qPCR	Itaalia	10 + 10	sülg	CRC	*Fusobacterium nucleatum*↑	Russo et al
Metagenoomi sekveneerimine	Prantsusmaa	25 + 259	sülg	CRC	*Fusobacterium nucleatum* ↑	Schmidt et al
16S rRNA V4	Hiina	30 + 30	sülg, limaskest	CRC	*Firmicutes* ↑	Wang et al
16S rRNA V4	Eurooopa-Ameerika	231 + 462	suuloputus	CRC	*Porphyromonas, Tannerella, Prevotella, Peptococcus, Treptonema* ↑ *Solobacterium*↓	Yang et al
16S rRNA V3–V4	USA	68 + 122	suuloputus	CRC	*Lactobacillus, Rothia, Fusobacterium nucleatum* ↑	Kato et al
16S rRNA V3–V4	Hiina	161 (CRC) + 34 (CRA) + 58	põsekaabe	CRC, CRA	*Fusobacterium*; *Prevotella, Veillonella* ↑	Zhang et al
16S rRNA V3–V4	Iirimaa	99 (CRA) + 32 (polüübid) + 103	põsekaabe	CRC, polüübid	*Fusobacterium nucleatum*; *Peptostreptococcus stomatitis Parvimonas micra* ↑	Flemer et al
16S rRNA V2–V4	Hiina	90 + 100	keelekaabe	CRC	*Prevotella, Streptococcus* ↑	Han et al

CRA – jämesoole adenoom, CRC – jämesoolevähk, qPCR: kvantitatiivne PCR

Jämesoolevähi ja jämesoole adenoomide korral on täheldatud suupatogeene *Fusobacterium*, *Treponema* ja *Porphyromonas* ning biofilmi moodustajaid *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, and *Rothia* (Zhang *et al*., 2020). *Fusobacterium*'i on täheldatud ka teiste suuhaiguste ja vähkide korral (Castellarin *et al*., 2012; Flanagan *et al*., 2014; Komiya *et al*., 2019; Kostic *et al*., 2012; Mima *et al*., 2015; Yamaoka *et al*., 2018). Zhang *et al* pakkusid välja, et *Fusobacterium*'i suurenenud arvukus suus võib viidata bakteri migreerumisele jämesoolde ja osaleda vähi arengus (Zhang *et al*., 2020). Veel on näidanud Flemer *et al*, et suu mikrobioota võib olla potentsiaalne biomarker jämesoolevähi korral (Flemer *et al*., 2018). Nende töös võetud põsekaapeproovides erines CRC patsientide suu mikrobioota oluliselt tervete indiviidide suu mikrobiootast (Flemer *et al*., 2018). Wang *et al* uuringust tuli välja, et *Bacteroides*, *Streptococcus* ja *Desulfovibrio* perekondi esines CRC patsientidel rohkem kui tervetel (Wang *et al*., 2021). Kuigi Yang *et al* töös tulid esile neli suupatogeeni *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola* ja *Prevotella intermedia*, millega seostati kõrgem jämesoolevähi risk ning millest ainult viimased kaks olid statistiliselt olulised (Yang, Cai, *et al*., 2019).

Lisaks on uuritud suupatogeene, keda on leitud jämesoolevähi patsientide väljaheidetest ja jämesoole limaskesta proovidest. Üks kõige olulisematest suu mikroobidest, mida jämesoolevähiga seostatakse, on *Fusobacterium nucleatum*, mida on tihti leitud CRC patsientide väljaheitest ja limaskestaproovidest (Castellarin *et al*., 2012; Flanagan *et al*., 2014; Kostic *et al*., 2012). *Bacteroidaceae* hõimkonda kuuluv *Fusobacterium nucleatum* on gramnegatiivne anaeroobne põletikku soodustav bakter, mis on tuntud hambakaariese biofilmi ja periodontiidi tekitaja (Signat *et al*., 2011). *Fusobacterium nucleatum*'i seost jämesoolevähiga on kinnitanud mitmed uuringud (Ahn *et al*., 2013; Castellarin *et al*., 2012; Flanagan *et al*., 2014; Kostic *et al*., 2012; Mima *et al*., 2016; Rubinstein *et al*., 2013; Signat *et al*., 2011). Kaks uuringut (Yamaoka *et al*., 2018; Yu *et al*., 2017), mis toetasid teineteise leidusid, tegid kindlaks, et *F. nucleatum* on seotud KRAS mutatsiooni, kasvaja suuruse, kaasasündinud immuunsuse signaalradade reguleerimise, autofaagia ja CRC kemoresistentsuse moduleerimisega, mistõttu tahetakse bakterit kasutada vähiprognoosiks ja sõeluuringutes (Yamaoka *et al*., 2018) ning arendada välja *F. nucleatum*-spetsiifiline antimikroobne teraapia, mis aitaks koos keemiaraviga jämesoolevähi patsiente (Yu *et al*., 2017). Seega võivad mitmed suupatogeenid hakata soolestiku düsbioosi korral vohama ning teiste mikroobidega interakteerudes soodustada jämesoolevähi arengut. Sellest tulenevalt võiks see bakter olla potentsiaalne mitteinvasiivne biomarker jämesoolevähi sõeluuringutes.

Ka teiste suumikroobide puhul on leitud seoseid CRC-ga. Näiteks suumikroobide perekonna *Prevotella* liikide rohkust on seostatud interleukiin 17 (IL-17, *interleukin* 17) tootvate rakkude indutseerimisega jämesoolevähi patsientidel (Sobhani *et al*., 2011). Lisaks on näiteks bakter *P. gingivalis* puhul näidatud, et ta indutseerib koos *F. nucleatum*'iga tuumori teket (Rubinstein *et al*., 2013).

Ei ole täpselt teada, kuidas suumikroobid soolestikku kanduvad, kuid välja on pakutud kaks varianti. Üheks viisiks on pidev suumikroobide allaneelamine (Nakajima *et al*., 2015). Inimene toodab ööpäevas 0,75 kuni 1,5 l sülge, mis sisaldab palju mikroobe, kaasa arvatud tuntud kroonilise periodontiidi patogeeni *P. gingivalis* (Benn ja Thomson, 2014). Suumikroobid, nagu *P. gingivalis,* kes suudavad vastu panna madalale pH-le, saaksid happelise keskkonna maos üle elada ja koloniseerida soolestiku (Walker *et al*., 2018). Selleks et aga madala pH juures ellu jääda, on näidatud *P. intermedia, P. gingivalis* ja *F. nucleatum* puhul kasvu stimuleerimist nekrotroofiliselt ehk toitumist surnud bakteritest (Rodriguez Herrero *et al*., 2017). Eelnevalt on *Porphyromonas spp*. (*P. gingivalis and P. intermedia*) ja *F. nucleatum*'i kasvu tõusu seostatud surnud rakkude olemasoluga (Rodriguez Herrero *et al*., 2017). Kuigi *P. gingivalis* on võimeline

elama madalama pH juures (Walker *et al*., 2018), ei ole bakterit väljaheidetest isoleeritud, mis viitab sellele, et *P. gingivalis* ei suuda efektiivselt soolestikku migreeruda ja seal elada (Geva-Zatorsky *et al*., 2017).

Teine viis võib olla aga mikroobide levimine soolestikku läbi vereringe ja süsteemse tsirkulatsiooni kaudu. On näidatud, et mikroobid suudavad migreeruda vereringesse läbi suus olevate haavade, hambapesu ja närimise ajal (Parahitiyawa *et al*., 2009). Elujõuliste bakterite esinemine vereringes ehk baktereemia võib esineda põletikuliste tingimuste korral, nagu periodontiit ja muud kroonilised infektsioonid, mida on näidatud patogeenide *F. nucleatum* ja *P. gingivalis* korral (Hajishengallis, 2015). Mikroobid, nagu *P. gingivalis*, suudavad ellu jääda ka immuunrakkudes ning levida nii üle kehar (Carrion *et al*., 2012).

Kuigi suu mikrobioota potentsiaali on jämesoolevähi diagnoosimisel vähe uuritud ja ei ole leitud kindlaid baktereid vähi ennustamiseks, siis on suu mikrobioota kui uudse biomarkeri uurimine paljulubav ja võimalik mitteinvasiivne meetod jämesoolevähi tuvastamiseks (Chen *et al*., 2019).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Töö eksperimentaalse osa eesmärk on analüüsida Eesti jämesoolevähi sõeluuringu käigus koloskoopia protseduuril käinud patsientide ja Tartu Ülikooli kliinikumi hematoloogia-onkoloogia osakonna vähipatsientide käest saadud süljeproovide mikroobikooslust suus.
Seega on töö eesmärgid järgnevad:

1) Määrata süljeproovide mikroobide kooslus, kasutades 16S rRNA geeni V3-V4 piirkondade sekveneerimist;
2) Võrrelda omavahel tervete inimeste (kontrollide) , polüüpidega patsientide ja vähipatsientide süljeproovide mikroobikoosluste erinevusi

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Proovide kogumine ja hoiustamine

Bakalaureusetöö jaoks vajalikud süljeproovid koguti TÜ kliinikumi kahest osakonnast. Kõik uuringus osalemisega nõus olnud uuritavad andsid 2 ml süljeproovi 15 ml tuubi, mis külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Proovid märkega “CRC” tulid Tartu Ülikooli Kliinikumi sisekliinikust, gastroenteroloogia osakonnast üleriigilise jämesoolevähi sõeluuringu patsientidelt, mis koguti aastatel 2019–2021. Sõeluuringusse kaasatakse riiklikult 60–69 aastased mehed ja naised. Antud töö valimisse kaasati patsiendid, kellelt võetud peitveretesti tulemus oli positiivne ja kes olid saadetud TÜ Kliinikumi koloskoopiauuringule. Süljeproovid on võetud enne koloskoopia teostamist. Proovid märkega “oCRC” koguti TÜ Kliinikumi hematoloogia-onkoloogia kliinikus 2021. aastal. Süljeproovid võeti esmase jämesoolevähi diagnoosi saanud patsientidelt.

Valimist jäeti välja patsiendid,

1. kellel oli varem diagnoositud soole ärritussündroom (IBS), Crohni tõbi (CD), haavandiline koliit (UC) või mikroskoopiline koliit;
2. kellel oli diagnoositud perekondlik adenomatoosne polüpoos (FAP);
3. kes tarvitas antibiootikume kuni 3 nädalat enne proovi kogumist;
4. kes oli saanud kemoteraapiat.

Kokku kaasati töösse proovid 63-lt inimeselt. Proovide vanuste ja sugude jaotus on toodud Tabelis 2.

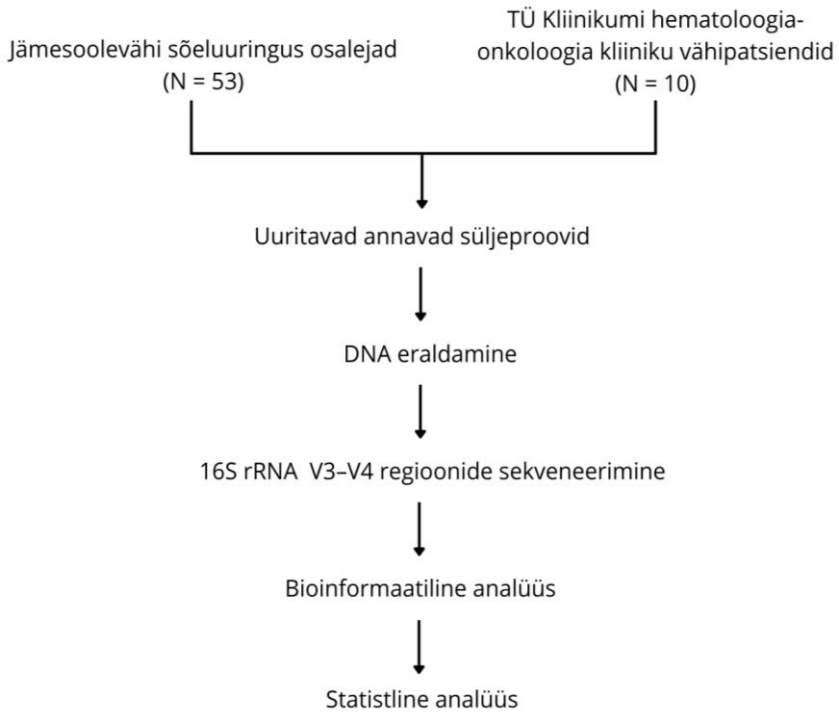
Tabel 2. Uuritavate keskmine vanus ja sugude jaotus

Proovi tüüp	Keskmine vanus	Sugu (N/M)
Kontrollid	65 (vahemik 60–69)	7/9
Polüüpidega patsiendid	63 (vahemik 59–75)	12/24
Vähipatsiendid	78 (vahemik 60–95)	5/6

Uuritavad jaotusid kolme rühma:

1) uuritavad, kellelt leiti koloskoopiauuringu käigus polüübid (N = 36),
2) uuritavad, kellel tuvastati koloskoopiauuringu käigus võetud proovidest jämesoolevähk (N = 11)
3) uuritavad, kellel koloskoopial ei tuvastatud polüüpe ega vähkkasvajaid (kontrollid; N = 16).

Uuringus osalejad on andnud kirjaliku nõusoleku ja uuringu teostamiseks on antud Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt nõusolek (loa number 292/T-17). Töö metoodika etapid on toodud Joonisel 4.



Joonis 4. Töö metoodika etapid

2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA sekveneerimine

Uuringu käigus saadud süljeproovidest eraldati bakteriaalne DNA 63 proovilt, kasutades firma Qiagen DNA eralduskomplekti DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Venlo, Madalmaad). Lisaks eraldati DNA ka negatiivselt kontrollilt, mis süljeproovi ei sisaldanud. DNA eraldamine käis kitiga kaasas olnud protokolli järgi väikeste modifikatsioonidega. Esmalt pidi süljeproovid sulatama ja eraldamiseks võeti 200 µl. Seejärel lisati lahus CD1 ja inkubeeriti proove 65°C 10 minutit, et tagada korralik lüüsimine ka raskesti lüüsitavatele bakteritele ja edaspidi ka kõrgem DNA kontsentratsioon. Sellele järgnes rakkude lõhustamine Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretinneux, Prantsusmaa) koepurustiga, mis oli seadistatud järgnevalt: 2500 rpm pöörded, kestvusega 2 x 30 sekundit, 30 sekundit pausi tsüklite vahel. Ülejäänud protokoll teostati vastavalt tootja juhistele. Lisaks uuringuks kogutud proovide DNAle tehti eraldusprotokoll läbi ka negatiivse kontrolliga. Peale DNA eraldamist mõõdeti DNA kontsentratsioon koguses 2 µl NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Lõpuks hoiustati DNAd sisaldavad katsutid -20°C külmkapis. Proovide DNA kontsentratsioonid on välja toodud tabelis Lisa 1.

Seejärel viidi läbi teise põlvkonna sekveneerimiseks vajalik DNA raamatukogu tegemine, mis teostati Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris, kus viidi läbi ka DNA sekveneerimine. Lisaks uuritavate proovidele ja negatiivsele kontrollile DNA eraldusprotokollist kaasati sekveneerimisse lisa negatiivne kontroll ja ka positiivne kontroll, mis oli proovi CRC42 koopia. Järgmises etapis viidi läbi DNA amplifikatsioon (PCR), kus kasutati praimereid 337F ehk 16S_F (5’ - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3’) ja 805R ehk 16S_R (3’ -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHV GGGTATCTAATCC - 5’), millega amplifitseeriti prokarüootse 16S rRNA geeni V3–V4 regioonide järjestused. Sekveneerimisel kasutati standardset protokolli. Amplikoni raamatukogu koostati mõlemasuunalisest järjestustest (2 x 301 bp), milleks kasutati teise põlvkonna Illumina (Illumina, San Diego, USA) MiSeq süsteemi koos MiSeq reagentide komplektiga (MiSeq Reagent Kit versioon v3). Kõik 66 proovi (patsientide süljeproovid, 1 positiivne kontroll ja 2 negatiivset kontrolli) sekveneeriti üheaegselt ehk kasutati *multiplex*-režiimi koos spetsiaalsete ribakoodi järjestustega. Toorandmete järjestustele pandi vastavusse ka kindel proovi nimi, mille jaoks kasutati Illumina bcl2fastq2 Conversion tarkvara (versioon 2.20).

2.2.3 Mikroobikoosluse määramine

Bioinformaatiliseks analüüsiks kasutati programmi QIIME2 (versioon 2021.11.0). Enne programmiga tööle asumist, loodi *manifest* dokument, mis annab QIIME 2 ette, missuguste sekveneerimisandmetega on tegu. Edasi sai andmed viia QIIME 2 programmi keskkonda PairedEndFastqManifestPhred33 formaadis, kasutades kasutades *qiime tools import* skripti.

Järgmiseks oli vaja läbi viia kvaliteedikontroll (QC, *quality control*), filtreerida välja mürarikkad piirkonnad (sh adapterid) ja ühendada nii päri- kui ka vastassuunalised lugemid. Kvaliteedikontrolliks kasutati QIIME 2 keskkonnas olevat tarkvara DADA2, mis andis tulemuseks lugemite kvaliteediskoori ning võimaldas valida ebasobivad piirkonnad väljalõikamiseks. Pärisuunalised lugemid lõigati positsioonidest 23 ja 245. Vastassuunaliste lugemite kvaliteediskoorid ei olnud sobivad ning jäid seetõttu analüüsist välja. Lisaks eraldati osaliselt kattuvad lugemid ehk kimäärid, milleks kasutati konsensusfiltrit. DADA2 töö tulemusel toimus ka lugemite ühendamine amplikonjärjestuste variantideks (ASV). Järgnevalt kasutati ASVde taksonoomiliseks klassifitseerimiseks QIIME2 programmi skripti q2-feature-table-classifier koos Bayes'i klassifitseerijaga, mis töötas referentsjärjestuse SILVA 16S V3–V4 v132_99 andmebaasidest 99% sarnasuslävendiga. Kasutatud klassifitseerija oli koostatud Tartu Ülikooli biomeditsiini magistrandi Annabel Raudsepa poolt. Fülogeneetilise puu koostamiseks kasutati FASTTREE skripti. Kõik proovid läbisid kvaliteedikontrolli edukalt, peale DNA eraldusprotokolli ja DNA sekveneerimise negatiivse kontrolli, millel oli 0 lugemit, mis oli ka oodatud tulemus.

2.2.4 Statistiline analüüs

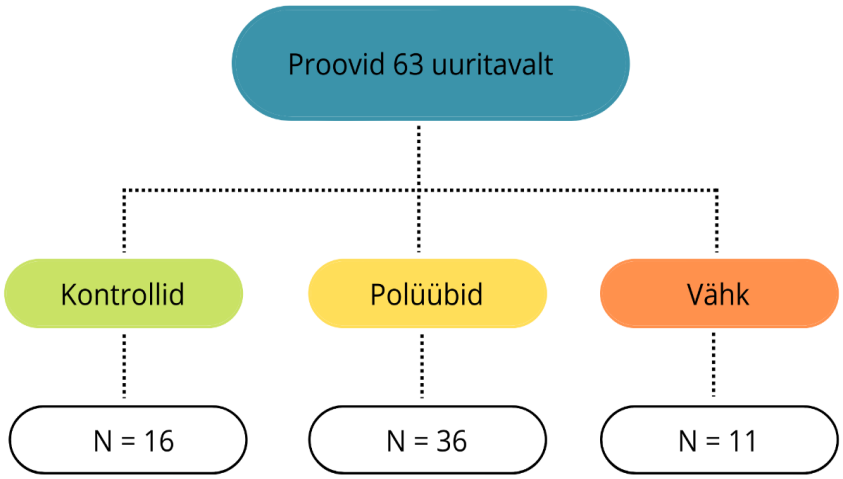
Andmeanalüüsiks kasutati programmi Rstudio (versioon 2022.2.0.443) ja R (versioon 4.1.3) baasprogrammi koos lisapakettide *phyloseq* (versioon 1.38.0), *dplyr* (versioon 1.0.8), *microbiome* (versioon 1.16.0), *vegan* (versioon 2.5-7), *ALDEx2* (1.26.0). Jooniste tegemiseks kasutati *ggplot2* (versioon 3.3.5) paketti. Andmeanalüüs teostati 63 süljeprooviga.

Süljeproovide taksonoomilist mitmekesisust kirjeldati nii alfa- kui ka beetamitmekesisuse abil. Alfamitmekesisuse saamiseks arvutati välja Shannoni mitmekesisuse indeks ja vaadeldud perekondade arv. Shannoni mitmekesisuse indeksi ja vaadeldud perekondade arvu väärtusi võrreldi kontrollgrupi ja polüüpidega patsientide süljeproovide vahel ning kontrollide ja vähipatsientide süljeproovide vahel. Need väärtused arvutati bakteriperekondade tasemel,

milleks kasutati RStudio ja R baasprogrammi paketti *phyloseq* (verisoon 1.38.0). Samuti kasutati t-testi, et leida statistiliselt olulised ja erinevate gruppide vahelised muutused. Mitmesel testimisel korrigeeriti p-väärtused Benjamin-Hochbergi meetodil ja korrigeeritud p-väärtused <0,05 loeti statistiliselt oluliseks (Benjamini ja Hochberg, 1995). Beetamitmekesisuse illustreerimiseks koostati CLR-transformeeritud andmetele peakomponentanalüüs (PCA, *principal component analysis*).

2.3 Tulemused

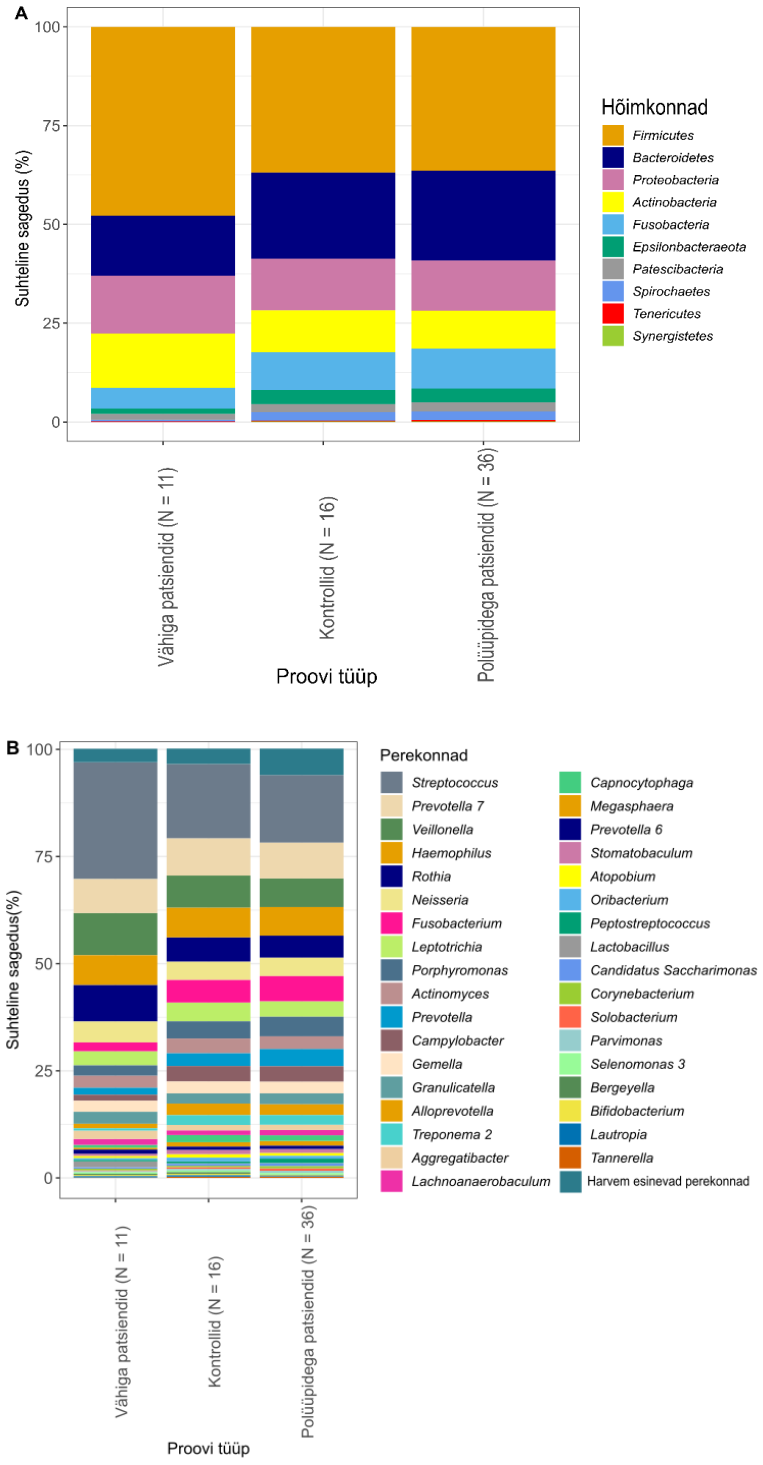
Uuringus analüüsiti kokku 63 inimese süljeproovid. Kontrollgruppi kuuluvad inimesed (N = 16), kellele teostatud koloskoopia käigus ei tuvastatud polüüpe ega vähkkasvajaid. Vähipatsiente oli kokku 11 ja polüüpidega patsiente oli 36. Kontrollide DNA kontsentratsiooni keskmine tuli 94,72 (+/-79,61) ng/µl (vahemik 7,6 ng/ul – 245 ng/ul), polüüpidega patsientidel keskmine 104,07 (+/-72,17) ng/µl (vahemik 2,70–249,80) ja vähiga patsientidel keskmine DNA kontsentratsioon oli 39,41 (+/- 45,30) ng/µl (3,30–133,70). Kõikide 65 sekveneeritud proovide (63 süljeproovi, negatiivne kontroll ja positiivne kontroll) saadi kokku 4 818 248 DNA lugemit. Peale kahe kontrolli väljafiltreerimist oli lugemeid kokku 4 757 554, millest kontrollide keskmine lugemite arv oli 77 190, polüüpidega proovidel 77 036 ja vähiga proovidel 75 450 lugemit. Kuna positiivse kontrolli taksonoomiline jaotus oli identne CRC42-le, siis jäeti see analüüsist välja. Analüüsi kaasatud proovide jaotus on toodud Joonisel 5.



Joonis 5. Töös analüüsitavate süljeproovide jaotus

2.3.1 Sülje mikroobikooslus eri uurmisgruppide vahel

Kõikides uuritavates proovides kokku leiti 15 hõimkonda, 27 klassi, 55 seltsi, 107 sugukonda, 243 perekonda. Enimlevinud hõimkonnad ja perekonnad uurimisgruppide kaupa koos esinemissagedustega on toodud Joonisel 6.



Joonis 6. Enamlevinud hõimkondade (A) ja perekondade (B) suhtelised sagedused erinevates süljeproovide tüüpides

Kõigil kolmel uuringugrupil olid sagedasemad hõimkonnad samad: *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria* ja *Actinobacteria* (Joonis 6A, Lisa 2). Vähipatsientidel esines *Firmicutes* aga keskmiselt 10% rohkem kui teisel kahel uurimisgrupil (Joonis 6A). Perekonnad jaotusid samuti peaaegu võrdselt uurimisgruppide vahel (Joonis 6B). Domineerivaks perekonnaks oli *Streptococcus*, mida esines taaskord vähipatsientidel keskmiselt 10% rohkem kui teistel uurimisgruppidel.

Suhtelised esinemissagedused on välja toodud Lisa 2. Lisaks viiele kõige sagedasemale perekonnale vaadeldi ka levinud jämesoolevähiga seostatud suupatogeenide *Fusobacterium* ja *Porphyromonas* suhtelist esinemissagedust. Vastavad väärtused on samuti toodud Lisa 2.

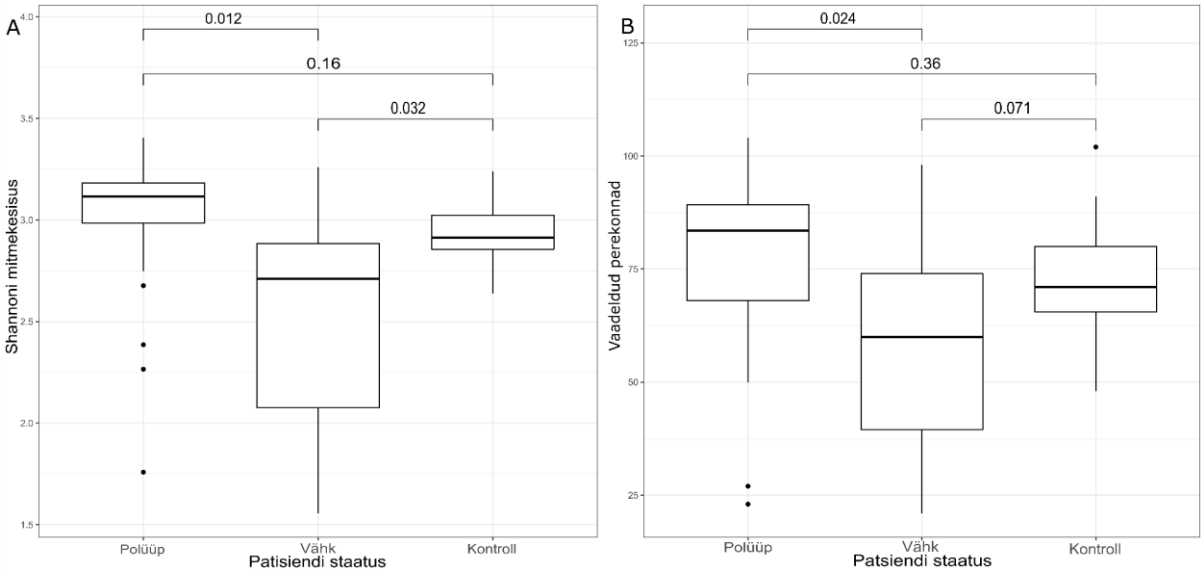
2.3.2 Mikrobioomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uurimisgruppide vahel

Kõigepealt vaadeldi alfamitmekesisust ehk grupisisest mitmekesisust uuringugruppide kaupa ning seejärel võrreldi beetamitmekesisust, ehk nende gruppide omavahelisi mikroobikoosluste erinevusi. Alfamitmekesisust hinnati nii vaadeldud perekondade arvu kui ka Shannoni mitmekesisuse indeksi abil.

Kontrollide puhul on vaadeldud perekondade arvukuse keskväärtus 72,56 (+/- 14,08, vahemik 48,00–102,00) ja Shannoni mitmekesisus tuli 2,93 (+/- 0,16, vahemik 2,64–3,24) (Joonis 7).

Polüübidega patsientide süljeproovide mikroobikoosluse mitmekesisuse analüüsimisel oli keskmine vaadeldud perekondade arvukus 76,97 (+/- 18,99, vahemik 23,00–104,00) ja Shannoni mitmekesisus tuli 3,023 (+/- 0.32, vahemik 1,76–3,40) (Joonis 7).

Vähiga patsientide süljeproovide mikrobioota uurimisel oli keskmine vaadeldud perekondade arv 56,9 (+/- 24,01, vahemik 21,0–98,0) ja Shannoni mitmekesisus 2,51 (+/- 0,55, vahemik 1,56–3,26). Kontrollide puhul on vaadeldud perekondade arvukus suurem, keskväärtusega 72,6 (+/- 14,08, vahemik 48,00–102,00) ja Shannoni mitmekesisuse indeks tuli 2,9 (+/- 0,16, vahemik 2,64–3,24) (Joonis 7).

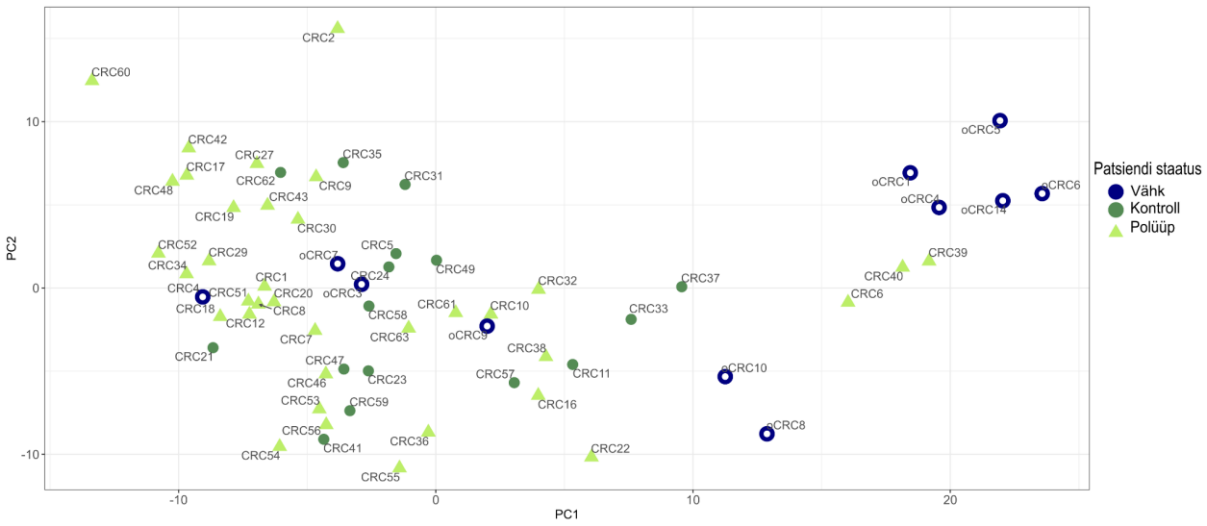


Joonis 7. Alfamitmekesisust väljendavate väärtuse karpdiagrammid polüüpidega patsientide (N=36), vähi (N=11), ja kontrollide (N=16) süljeproovide korral. A – proovitüübi ja patsiendi staatuse ning Shannoni mitmekesisuse indeksi vaheline seos; B – proovitüübi ning patsiendi staatuse ja vaadeldud perekondade arvukuse vaheline seos

Võrreldes polüüpidega patsientide ja kontrollide süljeproove, on näha, et vaadeldud perekondade arvukus ja Shannoni mitmekesisus ei erine märkimisväärselt ning on peaaegu samad. Samuti ei olnud vaadeldud perekondade ja Shannoni mitmekesisuse muutused statistiliselt olulised (vaadeldud perekondade arvukus p = 0,36; Shannoni mitmekesisus p = 0,16). Vähipatsientidel (N = 11) oli keskmine vaadeldud perekondade arv 20 võrra väiksem võrreldes kontrollidega (N = 16). Shannoni mitmekesisuse indeks tuli peaaegu sama. Vaadeldud perekondade arv (p = 0,071) näitab küll trendi, kuid ei ole statistiliselt oluline, kuid Shannoni mitmekesisuse (p = 0,032) keskväärtused on erinevad (korrigeeritud p-väärtus < 0,05).

Võrreldes polüüpidega patsiente (N = 36) ja vähipatsiente (N = 11), on polüüpidega patsientide vaadeldud perekondade arvukus 20 võrra suurem ning Shannoni mitmekesisuse indeks on vähipatsientidel keskmiselt 0,4 võrra väiksem. Samuti olid vaadeldud perekondade ja Shannoni mitmekesisuse muutused statistiliselt olulised (vaadeldud perekondade arvukus p = 0,024; Shannoni mitmekesisus p = 0,012).

Järgnevalt hinnati beetamitmekesisust. Beetamitmekesisust vaadeldi kõigi 63 proovi puhul. Analüüsiks tehti peakomponentanalüüs, mille tulemustest on näha, et polüüpidega proovid ja kontrollid klasterduvad kokku, kuid esineb ka polüüpidega proove, mis eralduvad kõikidest teistest proovidest (Joonis 8).



Joonis 8. Beetamitmekesisuse analüüsiks tehtud peakomponentanalüüs (PCA, ingl k *principal component analysis*).

Beetamitmekesisust võrreldes on näha mitme vähiproovi klasterdumist ja teistest eraldi paigutumist. Kontrollid on aga eemale klasterdunud (Joonis 8). Uurimisgruppide mikrobioomi kooslus oli üksteisest oluliselt erinev (R2 = 0,091, p < 0,001).

2.3.3 Perekondade võrdlus uurimisgruppide vahel

Järgmisena võrreldi erinevate perekondade arvukust erinevates uuringugruppides. Polüüpidega patsientide ja kontrollide puhul oli *Peptoclostridium* ainuke bakteriperekond, mille esinemissagedus oli statistiliselt erinev polüüpidega patsientide ja kontrollide vahel (p = 0,025; FDR < 0,05). Vähipatsientide ja kontrollide vahel ei esinenud ühtegi bakteriperekonda, mis oleksid olnud statistiliselt olulised peale p-väärtuste korrigeerimist (korrigeeritud p-väärtus < 0,05). Vähi ja polüüpidega patsientide puhul võrreldi nende suhtelist mitmekesisust. Nende vahel leidus üks statistiliselt oluline perekond, milleks oli bakteriperekond *Faucicola* (korrigeeritud p väärtus = 0,018).

Töös vaadati ka baktereid, keda on varem seostatud jämesoolevähiga. Nendeks olid *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*. Kontrollide ja polüüpide patsientide puhul olid korrigeerimata p-väärtused järgmised: *Fusobacterium* (p-väärtus = 0,762), *Porphyromonas* (p-väärtus = 0,803), *Prevotella* (p-väärtus = 0,480) (p-väärtus < 0,05). Vähipatsientide ja kontrollide vahel olid korrigeerimata p-väärtused järgmised: *Fusobacterium* (p-väärtus = 0,018), *Porphyromonas* (p-väärtus = 0,088), *Prevotella* (p-väärtus = 0,067) (p-väärtus < 0,05).

Polüüpidega patsientidega ja vähipatsientide puhul olid korrigeerimata p-väärtused järgnevad: *Fusobacterium* (p-väärtus = 0,022), *Porphyromonas* (p-väärtus = 0,120), *Prevotella* (p-väärtus = 0,085) (p-väärtus < 0,05). Ainult vähipatsientide ja kontrollide ning polüüpidega patsientide ja vähipatsientide vahel oli üks perekond statistiliselt olulise korrigeerimata p-väärtusega.

2.4 Arutelu

Töö eesmärgiks oli määrata Eesti jämesoolevähi sõeluuringu programmi raames kogutud ja TÜ Kliinikumi hematoloogia-onkoloogia kliinikust saadud vähipatsiendite süljeproovide mikroobikooslus, sekveneerides 16S rRNA geeni V3–V4 regiooni. Töös analüüsiti süljeproovidest saadud mikrobioomi kooslusi ja võrreldi kontrollide ehk ilma polüüpideta ja vähkkasvajateta patsiente, polüüpidega patsiente ja vähiga patsientide süljeproovide kooslusi.

Kontrollgrupis leidus hõimkondadest kõige enam *Firmicutes, Bacteroideres, Proteobacteria* ja *Actinobacteria*. Need neli hõimkonda kuuluvad ka normaalse mikrobioota alla ning kuuluvad tavapäraselt suu nelja enimtuvastatud hõimkonna alla, mistõttu oli tulemus kontrollidel ootuspärane (Dewhirst *et al*., 2010; Zaura *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2020; Verma *et al*., 2018). Antud töös moodustasid kontrollidest leitud suu mikrobioomi 6 põhilist hõimkonda *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes* ja *Fusobacteria* kokku 94,16%, mida näitasid ka Dewhirst *et al*, kus need hõimkonnad olid esindatud 96% kogu mikrobioomi hõimkondadest (Dewhirst *et al*., 2010). *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria, Actinobacteria* domineerisid ka polüüpidega patsientide ja vähiga patsientide puhul. Zhang *et al* näitasid, et hõimkond *Firmicutes* esineb CRC korral vähem kui kontrollidel ja adenoomiga patsientidel (Zhang *et al*., 2020), kuid antud töös tuli vastupidine tulemus – vähipatsientidel esines *Firmicutes* rohkem kui kontrollide ja polüüpidega patsientidel. Viimast näitas Russo *et al*, kes samuti täheldas suuremat *Firmicutes* arvukust vähipatsientidel süljeproovides võrreldes kontrollidega, kuid nende töös ei olnud see tulemus statistiliselt oluline (Russo *et al*., 2018). Lisaks näidati samas töös, et *Bacteroidetes* ja *Fusobacteria* esineb rohkem kontrollides kui vähipatsientidel (Russo *et al*., 2018), mis tuli ka välja antud töös, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline korrigeeritud p-väärtuse korral.

Perekondadest esines nii kontrollides kui ka teises kahes uurimisgrupis kõige enam S*treptococcus, Prevotella 7, Veillonella, Haemophilus* ja *Rothia,* mis jällegi on suu normaalse mikrobioota osa ja mida kinnitavad ka eelnevad uuringud (Bassis *et al*., 2015; Dewhirst *et al*.,

2010; Flemer *et al*., 2018; Segata *et al*., 2012). *Streptococcus* arvukus oli kõikide uurimisgruppide puhul suurim, mida on näitanud ka Flemer *et al* töö, kus analüüsiti samasuguseid uurimisgruppe (Flemer *et al*., 2018). Käesolevas töös esines *Streptococcus* kõige enam vähipatsientidel, umbes 10% rohkem võrreldes teiste gruppidega, kuid antud tulemus ei olnud statistiliselt oluline peale p-väärtuse korrigeerimist. Töös välja tulnud hõimkonnad ja perekonnad kontrollide puhul on ootuspärased tulemused, aga polüüpidega patsientide ja vähipatsientide tulemuste võrdlemiseks ei ole piisavalt uuringuid.

Perekondade arvukuste võrdluses leidsime vastupidiselt Chen *et al* tulemustele, et vähipatsientidel esineb perekonda *Streptococcus* kõige enam ning sagedustest rohkem kui kahes teises uuritavas grupis (Chen *et al*., 2019). Lisaks oli *Fusobacterium*'i arvukus madalam kui polüüpidega patsientide ja kontrollide puhul, mis on erinev varasematest uuringutest, kus on täheldatud vastupidist (Flanagan *et al*., 2014; Mima *et al*., 2015; Signat *et al*., 2011; Yamaoka *et al*., 2018). Yang *et al* tulemuste puhul ei olnud samuti suurt *Fusobacterium* erinevust vähipatsientide ja kontrolli vahel (Yang, Cai, *et al*., 2019). Kuigi erinevused olid antud töös väiksed, oli kontrollides *Haemophilus, Fusobacterium* ja *Porphyromonas* sagedused kõrgemad kui vähipatsientidel ning enne p väärtuse korrigeerimist oli ainult *Fusobacterium* arv statistiliselt oluline ($p = 0{,}018$). Sarnane tulemus oli ka Han *et al* töös, kus *Haemophilus, Fusobacterium* ja *Porphyromonas* esines kontrollides märgatavalt rohkem, kuid selles töös täheldati ka *Neisseria* rohkust kontrollides, mis antud töös oli vastupidi (Han *et al*., 2016). Kuna vähipatsientide suu mikrobioomi ja selle erinevust normaalse suu mikrobioomiga on vähe uuritud, ei ole piisavalt töid, et antud töös saadud tulemusi põhjalikumalt võrrelda ning vähipatsientide arv on antud uuringus lõplike järelduste tegemiseks väga väike.

Polüüpidega patsientide ja kontrollide vahel oli vaadeldud perekondade arvukuse ja Shannoni mitmekesisuse erinevus väike ning statistiliselt ebaoluline. Üks perekond, mis erines statistiliselt oluliselt polüübi patsientide ja kontrollide vahel, oli *Peptoclostridium*. *Peptoclostridium* (*Clostridium*) on grampositiivne bakter, kelle hulka kuuluvad mitmed inimesele patogeensed liigid, nagu *Peptoclostridium difficile* (*Clostridium difficile*). *Peptoclostridium difficile* põhjustatud CDI on seostatud eakate inimeste puhul soolestiku düsbioosiga, kui on tarvitatud antimikroobseid ravimeid (Smits *et al*., 2016). Kuna valimi hulgast jäeti välja patsiendid, kes olid hiljuti tarvitanud antibiootikume, siis on võimalik, et *Peptoclostridium*'i perekonna muutused on seotud patsientide pikemaajalise antibiootikumide tarvitamisega. *Peptoclostridium*'i on seostatud ka mitmete kasvajate eristaadiumitega ning seda

on leitud jämesoolevähi korral inimese soolestikus koos *Fusobacterium*'iga, kuid see bakter ei näidanud pärast p-väärtuse korrigeerimist statistiliselt olulist seost (Zwinsová *et al*., 2020).

Vähipatsientide ja kontrolligrupi võrdlusel leiti, et vähipatsientide vaadeldud perekondade arvukus oli madalam kui kontrollidel. Shannoni mitmekesisuse indeks oli peaaegu sama. Ainult Shannoni mitmekesisuse indeks oli statistiliselt oluline. Need tulemused on kooskõlas Flemer *et al* tööga, kus leiti samuti, et suu mikrobioota kooslus erines tervete kontrollide ja jämesoolevähi haigetel. (Flemer *et al*., 2018).

Beetamitmekesisuse analüüsi põhjal on näha, et polüübi- ja kontrolluuringugrupi proovid klasterduvad sarnaselt. Leidus ka polüübiproove, mis olid eraldi seisvad või pigem vähiproovidega koos esinevad. Varieeruvuse analüüs näitas, et uurimisgrupp oli statistiliselt oluline faktor, kirjeldamaks mikrobioomi koosluste erinevusi ($R2 = 0{,}091$, $p<0{,}001$). Polüüpide klasterdumist kontrollidega ja vähipatsientide eraldi klasterdumist näitas ka Flemer *et al* (Flemer *et al*., 2018). Kuna kõik polüübid ei ole pahaloomulised, siis antud sarnasus võib olla tingitud sellest, et suu düsbioosi ei ole tekkinud, sest kasvaja ei ole veel piisavalt arenenud, et süsteemseid muutusi põhjustada. Beetamitmekesisuse võrdluses klasterdusid mõned vähiproovid eraldi. Leidus ka proove, mis olid kontrolli- ja polüübiproovide keskele kogunenud. Kahjuks puudus uuringu läbiviimise hetkel info patsientide vähistaadiumite kohta, mis võiks aidata vastata küsimusele, kas näiteks need proovid võiksid olla varajase staadiumiga vähipatsiendid, kes võivad olla polüübipatsientide ja kontrollidega sarnasemad. Selleks et teha põhjalikke järeldusi ja näha selgemat eristumist uuringugruppide vahel, oleks vaja suuremat valimit ning täpsemat kliinilist analüüsi, mis võimaldaks klassifitseerida polüüpe ja vähki täpsemateks alamtüüpideks.

Lõpus võrreldi antud töös ka suhtelist mitmekesisust vähi- ja polüübipatsientide vahel, kus leiti üks perekond, mis oli statistiliselt oluline. Selleks oli perekond *Faucicola*, mis on *Gammaproteobacteria* klassi kuuluv gramnegatiivne aeroob. Perekond esines vähipatsientide proovides rohkem kui polüüpidega patsientide omades. Tegemist on võrdlemisi uue perekonnaga, mille kohta on vähe teadustöid (Humphreys *et al*., 2015). *Faucicola*'t leidub inimese kõris, mille järgi on bakter ka perekonnanime saanud. Tüüpesindajaks on *Faucicola mancuniensis*. Bakteri kliiniline olulisus on aga veel teadmata. *Faucicola* on leitud hiljuti ka jakkide nina limaskestast, kus see oli üks domineerivamaid perekondi (Liu *et al*., 2021). Kuna tegemist on võrdlemisi uue bakteriperekonnaga, mille kohta puuduvad põhjalikud uurimustööd inimestel, siis ei ole võimalik seletada selle esinemist antud töös ja seost jämesoolevähiga.

Erinevates töödes saadud tulemuste võrdlemine on mikrobioomi puhul keeruline, kuna tulemused sõltuvad väga mitmetest parameetritest. Tulemusi mõjutab see, milliseid proove suust võetakse, kuidas eraldatakse bakteriaalne DNA, millist piirkonda 16S rRNA geenis analüüsitakse ning lõpetuseks, kuidas analüüsid läbi viiakse. Kõik need faktorid võivad väga suurel määral mõjutada tulemusi ning teeb tööde võrdlused keeruliseks. Suu mikrobioomi uurimiseks on võimalik võtta proove väga erinevat moodi. Peamiselt tehakse seda kas keele- või põsekaapest või süljeproovi näol. Antud töös kasutati süljeproove, kuna on arvatud, et süljeproovid võivad olla kõige optimaalsemad suubakterite uurimiseks vähi korral (Chen *et al*., 2019). Kuid kuna suu erinevad piirkonnad võivad anda erinevaid tulemusi, siis kindlasti tuleks terviklikuma pildi saamiseks analüüsida erinevaid suuproove ning viia läbi suuremamahulisemaid uuringuid (Zaura *et al*., 2021). Antud töö oli pilootprojektiks, mille käigus analüüsiti suurema teadusuuringu jaoks kogutud esimesi proove. Selleks et selgitada välja mikroobioomi mõju jämesoolevähi tekkimises, tuleks võtta proove erinevas staadiumis patsientidelt ning analüüsida mikrobioomi erinevatest kehaosades (suust, terve ja polüüpidega/vähi patsiendi sooleepiteelist). See võimaldaks tuvastada mikrobioomil põhinevaid biomarkereid, mis aitaks tulevikus määrata vähi tekkimise riski, varasemat diagnoosi ja/või täpsemat ravi.

KOKKUVÕTE

Inimese suu mikrobioota on üks mitmekesisemaid kehapiirkondi, mis avaldab inimese tervisele mõju nii selle toetamisel kui ka haiguste tekkes. Üheks haiguseks võib olla jämesoolevähk (CRC), mis on jäme- ja käärsoolest alguse saanud pahaloomuline kasvaja. CRC varajaseks avastamiseks ja diagnoosimiseks on loodud sõeluuringud, mis võeti kasutusele Eestis aastal 2016. Selleks tehakse peitveretest (*fecal immunochemical test*, FIT), mille positiivse tulemuse puhul suunatakse inimene koloskoopiauuringule. Kuigi sõeluuringud on efektiivsed, leidub ka puuduseid, nagu valepositiivsed peitveretestid ja koloskoopiauuringul polüüpide märkamata jäämine, mistõttu on hakatud otsima uusi mitteinvasiivseid meetodeid tuvastamaks jämesoolevähki võimalikult varakult. Mikrobioomi on uuritud kui potentsiaalset biomarkerit jämesoolevähi ennetamiseks ja varajaseks diagnoosimiseks. Uurima on hakatud ka suu mikrobioomi ja jämesoolevähi vahelisi seoseid.

Antud bakalaureusetöö eesmärk on analüüsida Eesti riikliku jämesoolevähi sõeluuringu käigus koloskoopial käinud osalejate ja Tartu Ülikooli Kliinikumi hematoloogia-onkoloogia osakonna vähipatsientide süljeproovide mikroobikooslust, kasutades bakteriaalse DNA 16S rRNA geeni V3–V4 piirkonna sekveneerimist.

Töö tulemused näitasid, et uuritavate suu mikrobioomi mitmekesisus on üsna sarnane, kuid vähipatsientide oma eristub polüüpidega patsientide ja kontrollide omast. Suu mikrobioomi neli kõige sagedasemat hõimkonda, *Firmicutes, Bacteroideres, Proteobacteria* ja *Actinobacteria*, esinesid kõikidel proovidel peaaegu võrdselt. Perekonna tasemel oli *Streptococcus* kõige sagedasem ning seda esines vähipatsientidel kõige enam. Antud tulemused ei olnud aga statistiliselt olulised. Statistiliselt oluline erinevus tuli välja *Peptoclostridium*'i puhul polüüpidega patsientide ja kontrollide vahel ning *Faucicola* vähipatsientide ja kontrollide vahel. Beetamitmekesisuse võrdlemisel klasterdusid vähipatsiendid eraldi polüüpidega patsientide ja kontrollidest. Kogu mikrobioomi kooslus erines oluliselt uuringugruppide vahel. Tulevikus on vaja kaasata suurem valim ja koguda infot polüübi- ja vähistaadiumite kohta, et teha paikapanevamaid järeldusi ja tuvastada vähistaadiumi spetsiifiline mikroobikooslus.

RESÜMEE / SUMMARY

Associations between the oral microbiome and colorectal cancer

Linda Sootak

Summary

The human oral microbiota is one of the most diverse areas of the human body, which presents a significant impact on human health by improving it, or contributing to development of disease. One of these diseases can be colorectal cancer (CRC), which is a malignant tumour originating from the colorectum. Detecting CRC in early stages is crucial, which is why screening programmes have been developed around the world, including Estonia. Though screening programmes are effective, they still present some issues like false positive FIT results, and missed polyps during colonoscopy. A lot of research has been dedicated to finding non-invasive methods to detect and diagnose CRC as early as possible.

In this dissertation, the aim is to analyse the oral microbiome of Estonian National colorectal cancer screening participants and cancer patients from the Tartu University Hospital haematology and Oncology Clinic, through bacterial DNA 16S rRNA V3–V4 region sequencing.

The results show a taxonomical differences in cancer patients compared to healthy controls and patients with polyps. Four common oral microbiome phyla, *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria* and *Actinobacteria* were detected in all samples. Genus *Streptococcus* was most common among all samples though it was more abundant in cancer patients, although the result was not significant. Two genera differed between study groups. Namely *Peptoclostridium* was significantly different between patients with polyps and controls, and *Faucicola* differed between cancer patients and patients with polyps. A statistically significant difference in alpha diversity was shown between controls and patients with polyps and cancer patients and controls. Beta diversity indicated that the microbiome can be different between study groups. For future studies a bigger sample size and information about polyp and cancer stages is required to make more substantial conclusions.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Kertu Liis Krigulit ja Elin Orgi, kelle toetus ja tagasiside olid tohutult suureks abiks minu bakalaureusetöö kirjutamisel. Olen tänulik ka teistele mikrobioomi töörühma liikmetele – Annabel Raudsepp, Kreete Lüll, Oliver Aasmets. Nende töö ja vaev aitasid mul teha bioinformaatilisi ja statistilisi analüüse. Viimaseks tahan tänada molekulaar- ja rakubioloogia instituudi biotehnoloogia labori liikmeid, kes olid nõus mind abistama ja nõustama eksperimentaalse osaga.

KIRJANDUSE LOETELU

Adler, C. J., Dobney, K., Weyrich, L. S., Kaidonis, J., Walker, A. W., Haak, W., Bradshaw, C. J., Townsend, G., So\ltysiak, A., Alt, K. W. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. Nature genetics, 45(4), 450–455.

Ahn, J., Chen, C. Y., Hayes, R. B. (2012). Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. Cancer Causes ja Control, 23(3), 399–404.

Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J. J., Hayes, R. B., Yang, L. (2013). Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. Journal of the National Cancer Institute, 105(24), 1907–1911.

Alcaraz, L., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, Á., Pignatelli, M., Mira, A. (2012). Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. Clinical Microbiology and Infection, 18, 54–57.

Allaband, C., McDonald, D., Vázquez-Baeza, Y., … Knight, R. (2019). Microbiome 101: Studying, analyzing, and interpreting gut microbiome data for clinicians. Clinical gastroenterology and hepatology, 17(2), 218–230.

Amitay, E. L., Cuk, K., Niedermaier, T., Weigl, K., Brenner, H. (2019). Factors associated with false-positive fecal immunochemical tests in a large German colorectal cancer screening study. International journal of cancer, 144(10), 2419–2427.

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Annals of periodontology, 4(1), 1–6.

Avila, M., Ojcius, D. M., Yilmaz, Ö. (2009). The oral microbiota: Living with a permanent guest. DNA and cell biology, 28(8), 405–411.

Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W., He, X. (2017). Ecology of the oral microbiome: Beyond bacteria. Trends in microbiology, 25(5), 362–374.

Benedict, C., Vogel, H., Jonas, W., Woting, A., Blaut, M., Schürmann, A., Cedernaes, J. (2016). Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals. Molecular metabolism, 5(12), 1175–1186.

Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature, 456(7221), 507–510.

Breitbart, M., Haynes, M., Kelley, S., … Rohwer, F. (2008). Viral diversity and dynamics in an infant gut. Research in microbiology, 159(5), 367–373.

Brenner, H., Chang-Claude, J., Seiler, C. M., Rickert, A., Hoffmeister, M. (2011). Protection from colorectal cancer after colonoscopy: A population-based, case–control study. Annals of internal medicine, 154(1), 22–30.

Burne, R. A., Marquis, R. E. (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS microbiology letters, 193(1), 1–6.

Byrne, C., Chambers, E., Morrison, D., Frost, G. (2015). The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. International journal of obesity, 39(9), 1331–1338.

Carrion, J., Scisci, E., Miles, B., Sabino, G. J., Zeituni, A. E., Gu, Y., Bear, A., Genco, C. A., Brown, D. L., Cutler, C. W. (2012). Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. The Journal of Immunology, 189(6), 3178–3187.

Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., … Holt, A. R. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome research, 22(2), 299–306.

Chou, H.-H., Chien, W.-H., Wu, L.-L., … Chen, D-S. (2015). Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(7), 2175–2180.

Cook, M. D., Allen, J. M., Pence, B. D., Wallig, M. A., Gaskins, H. R., White, B. A., Woods, J. A. (2016). Exercise and gut immune function: Evidence of alterations in colon immune cell homeostasis and microbiome characteristics with exercise training. Immunology and cell biology, 94(2), 158–163.

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. science, 326(5960), 1694–1697.

Cottet, V., Jooste, V., Fournel, I., Bouvier, A.-M., Faivre, J., Bonithon-Kopp, C. (2012). Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: A population-based cohort study. Gut, 61(8), 1180–1186.

Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A. A., Huse, S. M., Montijn, R. C., Keijser, B. J. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. BMC medical genomics, 4(1), 1–13.

Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. Nature Reviews Microbiology, 8(7), 481–490.

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., … Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature, 505(7484), 559–563.

Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., Verma, A. K. (2020). Human microbiome: An academic update on human body site specific surveillance and its possible role. Archives of microbiology, 202(8), 2147–2167.

Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. The Lancet, 394(10207), 1467–1480.

Deo, P. N., Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP, 23(1), 122.

Dethlefsen, L., Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(Supplement 1), 4554–4561.

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. Journal of bacteriology, 192(19), 5002–5017.

Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer Jr, R. J., Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. Applied and environmental microbiology, 72(4), 2837–2848.

Downes, J., Mantzourani, M., Beighton, D., Hooper, S., Wilson, M. J., Nicholson, A., Wade, W. G. (2011). *Scardovia wiggsiae sp. Nov*., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia* inopinata. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61(1), 25–29.

Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. Environmental microbiology, 11(8), 2112–2122.

Farrell, J. J., Zhang, L., Zhou, H., Chia, D., Elashoff, D., Akin, D., Paster, B. J., Joshipura, K., Wong, D. T. (2012). Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. Gut, 61(4), 582–588.

Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(46), 17994–17999.

Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., … Hughes, D. J. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. European journal of clinical microbiology ja infectious diseases, *33*(8), 1381–1390.

Flemer, B., Lynch, D. B., Brown, J. M., Jeffery, I. B., Ryan, F. J., Claesson, M. J., O'Riordain, M., Shanahan, F., O'Toole, P. W. (2017). Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. Gut, 66(4), 633–643.

Flemer, B., Warren, R. D., Barrett, M. P., Cisek, K., Das, A., Jeffery, I. B., Hurley, E., O'Riordain, M., Shanahan, F., O'Toole, P. W. (2018). The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. Gut, 67(8), 1454–1463.

Geva-Zatorsky, N., Sefik, E., Kua, L., … Kasper, D. L. (2017). Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms. Cell, 168(5), 928–943.

Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. science, 312(5778), 1355–1359.

Gosalbes, M. J., Durbán, A., Pignatelli, M., Abellan, J. J., Jimenez-Hernandez, N., Pérez-Cobas, A. E., Latorre, A., Moya, A. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. PloS one, 6(3), e17447.

Gu, S., Chen, Y., Zhang, X., Lu, H., Lv, T., Shen, P., Lv, L., Zheng, B., Jiang, X., Li, L. (2016). Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population. Microbes and infection, *18*(1), 30–38.

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature reviews immunology, *15*(1), 30–44.

Halfvarson, J., Brislawn, C. J., Lamendella, R., Jansson, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. Nature microbiology, *2*(5), 1–7.

Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. Gastroenterology, *146*(6), 1449–1458.

Han, S., Yang, X., Qi, Q., Pan, Y., Chen, Y., Shen, J., Liao, H., Ji, Z. (2016). Potential screening and early diagnosis method for cancer: Tongue diagnosis. International journal of oncology, 48(6), 2257–2264.

Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences, *102*(22), 7952–7957.

Janda, J. M., Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, *45*(9), 2761–2764.

Jess, T., Rungoe, C., Peyrin–Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population-based cohort studies. Clinical gastroenterology and hepatology, 10(6), 639–645.

Kalda, R., Kullik, T., Salupere, R., Suuroja, T., Tomberg, K. (2017). Jämesoolevähi sõeluuringu infomaterjal. Eesti Haigekassa.

Kato, I., Vasquez, A. A., Moyerbrailean, G., Land, S., Sun, J., Lin, H. S. Ram, J. L. (2016). Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer. Journal of epidemiological research, 2(2), 92–101.

Kaur, R., Gilbert, S. C., Sheehy, E. C., Beighton, D. (2013). Salivary levels of *Bifidobacteria* in caries-free and caries-active children. International journal of paediatric dentistry, *23*(1), 32–38.

Kilian, M., Chapple, I., Hannig, M., Marsh, P., Meuric, V., Pedersen, A., Tonetti, M., Wade, W., Zaura, E. (2016). The oral microbiome–an update for oral healthcare professionals. British dental journal, *221*(10), 657–666.

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. Nature reviews Disease primers, *3*(1), 1–14.

Knights, D., Silverberg, M. S., Weersma, R. K., … Xavier, R. J. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. Genome medicine, *6*(12), 1–11.

Kolenbrander, P. E., Palmer Jr, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontology 2000, 42(1), 47–79.

Koliarakis, I., Messaritakis, I., Nikolouzakis, T. K., Hamilos, G., Souglakos, J., Tsiaoussis, J. (2019). Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. International journal of molecular sciences, 20(17), 4146.

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.

Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., Knight, R. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Current protocols in microbiology, 2*7*(1), 1E – 5.

Kumar, P., Griffen, A., Barton, J., Paster, B., Moeschberger, M., Leys, E. (2003). New bacterial species associated with chronic periodontitis. Journal of dental research, *82*(5), 338–344.

Lambring, C. B., Siraj, S., Patel, K., Sankpal, U. T., Mathew, S., Basha, R. (2019). Impact of the Microbiome on the Immune System. Critical Reviews™ in Immunology, 39(5).

Le Bars, P., Matamoros, S., Montassier, E., Le Vacon, F., Potel, G., Soueidan, A., Jordana, F., de La Cochetière, M.-F. (2017). The oral cavity microbiota: Between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. Canadian journal of microbiology, 63(6), 475–492.

Li, Y.-H., Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors, 12(3), 2519–2538.

Ling, Z., Liu, X., Jia, X., … Xiang, C. (2014). Impacts of infection with different toxigenic *Clostridium difficile* strains on faecal microbiota in children. Scientific reports, *4*(1), 1–10.

Mackie, R. I., Sghir, A., Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. The American journal of clinical nutrition, 69(5), 1035s–1045s.

Macpherson, A. J., Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nature Reviews Immunology, 4(6), 478–485.

Maier, T. V., Lucio, M., Lee, L. H., … Jansson, J. K. (2017). Impact of dietary resistant starch on the human gut microbiome, metaproteome, and metabolome. MBio, 8(5), e01343-17.

Marchesi, J. R. (2010). Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. Advances in applied microbiology, 72, 43–62.

Marsh, P. D. (2000). Role of the oral microflora in health. Microbial Ecology in Health and Disease, 12(3), 130–137.

Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontology 2000, 70(1), 80–92.

McDonald, D., Hornig, M., Lozupone, C., Debelius, J., Gilbert, J. A., Knight, R. (2015). Towards large-cohort comparative studies to define the factors influencing the gut

microbial community structure of ASD patients. Microbial ecology in health and disease, 26(1), 26555.

McLean, J. S. (2014). Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. Frontiers in cellular and infection microbiology, 4, 98.

Mikita, V., Joost, K., Laidre, P., Toome, K., Tõnisson, N., Soplepmann, J., Rebane, E., Kostina, O., Roomere, H. (2012). Päriliku jämesoolevähiga patsientide geneetilise konsulteerimise ja jälgimise juhend. Eesti Arst.

Mima, K., Cao, Y., Chan, A. T., … Ogino, S. (2016). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location. Clinical and translational gastroenterology, 7(11), e200.

Modi, S. R., Collins, J. J., Relman, D. A.. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. The Journal of clinical investigation, 124(10), 4212–4218.

Mori, G., Pasca, M. R. (2021). Gut microbial signatures in sporadic and hereditary colorectal cancer. International Journal of Molecular Sciences, 22(3), 1312.

Munson, M., Banerjee, A., Watson, T., Wade, W. (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. Journal of clinical microbiology, *42*(7), 3023–3029.

Nakajima, M., Arimatsu, K., Kato, T., Matsuda, Y., Minagawa, T., Takahashi, N., Ohno, H., Yamazaki, K. (2015). Oral administration of *P. gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. PloS one, 10(7), e0134234.

Parahitiyawa, N., Jin, L., Leung, W., Yam, W., Samaranayake, L. (2009). Microbiology of odontogenic bacteremia: Beyond endocarditis. Clinical microbiology reviews, *22*(1), 46–64.

Razavi, A., Gmür, R., Imfeld, T., Zehnder, M. (2007). Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. Oral microbiology and immunology, *22*(4), 248–251.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. Microorganisms, 7(1), 14.

Rodriguez Herrero, E., Boon, N., Pauwels, M., Bernaerts, K., Slomka, V., Quirynen, M., Teughels, W. (2017). Necrotrophic growth of periodontopathogens is a novel virulence factor in oral biofilms. Scientific reports, *7*(1), 1–10.

Rogers, G., Carroll, M., Serisier, D., Hockey, P., Jones, G., Kehagia, V., Connett, G., Bruce, K. (2006). Use of 16S rRNA gene profiling by terminal restriction fragment length

polymorphism analysis to compare bacterial communities in sputum and mouthwash samples from patients with cystic fibrosis. Journal of clinical microbiology, *44*(7), 2601–2604.

Round, J. L., Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews immunology, 9(5), 313–323.

Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell host ja microbe, 1*4*(2), 195–206.

Russo, E., Bacci, G., Chiellini, C., Fagorzi, ... Amedei, A. (2018). Preliminary Comparison of Oral and Intestinal Human Microbiota in Patients with Colorectal Cancer: A Pilot Study. Frontiers in microbiology, 8, 2699.

Saygun, I., Nizam, N., Keskiner, I., Bal, V., Kubar, A., Açıkel, C., Serdar, M., Slots, J. (2011). Salivary infectious agents and periodontal disease status. Journal of periodontal research, 46(2), 235–239.

Segata, N., Haake, S. K., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., Izard, J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. Genome biology, 13(6), 1–18.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016a). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. Cell, 164(3), 337–340.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016b). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS biology, 14(8), e1002533.

Shaw, L. P., Smith, A. M. Roberts, A. P. (2017). The oral microbiome. Emerging Topics in Life Sciences, 1(4), 287–296.

Signat, B., Roques, C., Poulet, P., Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. Current issues in molecular biology, 13(2), 25–36.

Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. Clinical interventions in aging, 11, 967.

Smith, R. A., Cokkinides, V., Brawley, O. W. (2008). Cancer Screening in the United States, 2008: A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Cancer Screening Issues. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 58(3), 161–179.

Schmidt, T. S., Hayward, M. R., Coelho, L. P., … Bork, P. (2019). Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. eLife, 8, e42693.

Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Van Nhieu, J. T., Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PloS one, 6(1), e16393.

Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., Kent Jr, R. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology, 25(2), 134–144.

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. Journal of endodontics, 32(2), 93–98.

Suuroja, T. (2009). Jämesoolevähi käsitlus. Eesti Arst.

Zaura, E., Nicu, E. A., Krom, B. P., Keijser, B. J. (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: Current perspective. Frontiers in cellular and infection microbiology, 4, 85.

Zhang, S., Kong, C., Yang, Y., Cai, S., Li, X., Cai, G., Ma, Y. (2020). Human oral microbiome dysbiosis as a novel non-invasive biomarker in detection of colorectal cancer. Theranostics, 10(25), 11595–11606.

Zhou, X., Brown, C. J., Abdo, Z., Davis, C. C., Hansmann, M. A., Joyce, P., Foster, J. A., Forney, L. J. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. The ISME journal, 1(2), 121–133.

Zijnge, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., M. Harmsen, H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. PloS one, 5(2), e9321.

Takahashi, N., Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. Journal of dental research, 90(3), 294–303.

Tran, Q., Pham, D.-T., Phan, V. (2017). Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. BMC bioinformatics, 18(14), 155–161.

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., … Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. nature, 457(7228), 480–484.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. Nature, 449(7164), 804–810.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. nature, 444(7122), 1027–1031.

Ursell, L. K., Haiser, H. J., Van Treuren, W., Garg, N., Reddivari, L., Vanamala, J., Dorrestein, P. C., Turnbaugh, P. J., Knight, R. (2014). The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host. Gastroenterology, 146(6), 1470–1476.

Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. Nutrition reviews, 70(suppl_1), S38–S44.

Uusitalo, U., Liu, X., Yang, J., … Virtanen, S. M(2016). Association of early exposure of probiotics and islet autoimmunity in the TEDDY study. JAMA pediatrics, 170(1), 20–28.

Van Dyke, T. E., Dave, S. (2005). Risk factors for periodontitis. Journal of the International Academy of Periodontology, 7(1), 3.

Vandegrift, R., Bateman, A. C., Siemens, K. N., Nguyen, M., Wilson, H. E., Green, J. L., Van Den Wymelenberg, K. G., Hickey, R. J. (2017). Cleanliness in context: Reconciling hygiene with a modern microbial perspective. Microbiome, 5(1), 1–12.

Vasen, H. F., Möslein, G., Alonso, A., … Wijnen. J. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). Journal of medical genetics, 44(6), 353–362.

Vuik, F. E., Nieuwenburg, S. A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M. J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M. F., … Spaander, M. C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. Gut, 68(10), 1820–1826.

Wade, W. G. (2004). Non-culturable bacteria in complex commensal populations. Advances in applied microbiology, 54(54), 93–106.

Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. Pharmacological research, 69(1), 137–143.

Walker, M. Y., Pratap, S., Southerland, J. H., Farmer-Dixon, C. M., Lakshmyya, K., Gangula, P. R. (2018). Role of oral and gut microbiome in nitric oxide-mediated colon motility. Nitric Oxide, 73, 81–88.

Wang, B., Jiang, X., Cao, M., Ge, J., Bao, Q., Tang, L., Chen, Y., Li, L. (2016). Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease. Scientific reports, 6(1), 1–11.

Weng, M, Walker, W. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. Journal of developmental origins of health and disease, 4(3), 203–214.

Wang, Y., Zhang, Y., Qian, Y., Xie, Y. H., Jiang, S. S., Kang, Z. R., Chen, Y. X., Chen, Z. F., Fang, J. Y. (2021). Alterations in the oral and gut microbiome of colorectal cancer patients and association with host clinical factors. International journal of cancer.

Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., … Rothberg, J. M. (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. nature, 452(7189), 872–876.

Wickström, C., Herzberg, M. C., Beighton, D., Svensäter, G. (2009). Proteolytic degradation of human salivary MUC5B by dental biofilms. Microbiology, 155(Pt 9), 2866.

Willis, J. R., Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. Microorganisms, 8(2).

Yang, Y., Cai, Q., Shu, X. O., Steinwandel, M. D., Blot, W. J., Zheng, W., Long, J. (2019). Prospective study of oral microbiome and colorectal cancer risk in low-income and African American populations. International journal of cancer, 144(10), 2381–2389.

Yamaoka, Y., Suehiro, Y., Hashimoto, S., … Yamasaki, T. (2018). *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. Journal of gastroenterology, 53(4), 517–524.

Ying, S., Zeng, D.-N., Chi, L., Tan, Y., Galzote, C., Cardona, C., Lax, S., Gilbert, J., Quan, Z.-X. (2015). The influence of age and gender on skin-associated microbial communities in urban and rural human populations. PloS one, 10(10), e0141842.

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.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

National Institutes of Health koduleht: https://www.nih.gov/ (kasutatud 27.11.2021)

NIH Human Microbiome Project koduleht: https://hmpdacc.org/ (kasutatud 27.11.2021)

Global Cancer Observatory koduleht: https://gco.iarc.fr/ (kasutatud 05.03.2022)

Tervise Arengu Instituut. Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas: https://statistika.tai.ee/pxweb/et/Andmebaas/Andmebaas__02Haigestumus__07Soeluuringud/VSR21.px/chart/chartViewColumn/ (kasutatud 09.03.2022)

Merriam-Webster koduleht: https://www.merriam-webster.com/dictionary/microbiome (kasutatud 20.05.2022)

Colorectal screening in Europe: https://www.digestivecancers.eu/wp-content/uploads/2020/02/466-Document-DiCEWhitePaper2019.pdf (kasutatud 20.05.2022)

Expanded Human Oral Mircobiome Datavase V3 koduleht: https://www.homd.org/ (kasutatud 21.05.2022)

LISAD

LISA 1

Tabel 1. Süljeproovide mõõdetud DNA kontsentratsioonid

Proovi kood	Patsiendi staatus	DNA kontsentratsioon (ng/µl)
CRC005	Kontroll	210,7
CRC011	Kontroll	7,60
CRC021	Kontroll	68,3
CRC023	Kontroll	34,40
CRC024	Kontroll	93,1
CRC031	Kontroll	239,6
CRC033	Kontroll	86,5
CRC035	Kontroll	13
CRC037	Kontroll	63,1
CRC041	Kontroll	15,80
CRC047	Kontroll	169,3
CRC049	Kontroll	245
CRC057	Kontroll	87,1
CRC058	Kontroll	104,6
CRC059	Kontroll	46,9
CRC062	Kontroll	30,5
CRC001	Polüüp	178,2
CRC002	Polüüp	156,6
CRC006	Polüüp	10,9
CRC007	Polüüp	133,5
CRC008	Polüüp	102,8
CRC009	Polüüp	90,3
CRC010	Polüüp	41,6
CRC012	Polüüp	249,8
CRC016	Polüüp	16,1
CRC017	Polüüp	114,7
CRC018	Polüüp	85,8
CRC019	Polüüp	81,6
CRC020	Polüüp	176,2
CRC022	Polüüp	87,3
CRC027	Polüüp	168,8
CRC029	Polüüp	49,1
CRC030	Polüüp	195,1
CRC032	Polüüp	18,6
CRC034	Polüüp	224,5
CRC036	Polüüp	95,2
CRC038	Polüüp	30,8
CRC039	Polüüp	5,7
CRC040	Polüüp	2,7
CRC042	Polüüp	242,9
CRC043	Polüüp	220,8
CRC046	Polüüp	129,4

LISA 1 jätkub järgmisel lehel.

CRC048	Polüüp	46,8
CRC051	Polüüp	112
CRC052	Polüüp	130
CRC053	Polüüp	28,5
CRC054	Polüüp	62,2
CRC055	Polüüp	61,5
CRC056	Polüüp	127,8
CRC060	Polüüp	186,3
CRC061	Polüüp	30,5
CRC063	Polüüp	51,8
CRC004	Vähk	109,5
oCRC001	Vähk	18,7
oCRC003	Vähk	31
oCRC004	Vähk	38,8
oCRC005	Vähk	68,2
oCRC006	Vähk	9,1
oCRC007	Vähk	133,7
oCRC008	Vähk	4,6
oCRC009	Vähk	11,5
oCRC010	Vähk	5,1
oCRC014	Vähk	3,3

LISA 2

Tabel 2. Suurima esinemissagedusega hõimkonnad ja perekonnad kolme uuritava grupi vahel.

Proovitüüp	Hõimkond	Suhteline esinemissagedus (%)	Perekond	Suhteline esinemissagedus (%)
Kontrollid (N = 16)	*Firmicutes*	36,88	*Streptococcus*	17,39
	Bacteroidetes	21,84	*Prevotella 7*	8,65
	Proteobacteria	13,02	*Veillonella*	7,51
	Actinobacteria	10,66	*Haemophilus*	6,91
			Rothia	5,68
			Fusobacterium	5,25
			Porphyromonas	4,01
Polüüpidega patsiendid (N = 36)	*Firmicutes*	36,40	*Streptococcus*	15,79
	Bacteroidetes	22,70	*Prevotella 7*	8,34
	Proteobacteria	12,74	*Veillonella*	6,67
	Actinobacteria	9,55	*Haemophilus*	6,67
			Fusobacterium	5,85
			Rothia	5,16
			Porphyromonas	4,56
Vähipatsiendid (N = 11)	*Firmicutes*	47,77	*Streptococcus*	27,26
	Bacteroidetes	15,18	*Veillonella*	9,86
	Proteobacteria	14,62	*Rothia*	8,55
	Actinobacteria	13,74	*Prevotella 7*	7,92
			Haemophilus	6,91
			Porphyromonas	2,42
			Fusobacterium	2,04

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Linda Sootak,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Suu mikrobioomi seosed jämesoolevähiga“, mille juhendajad on Kertu Liis Krigul *MSc* ja Elin Org *PhD*, 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.

Linda Sootak

25.05.2022